

**UNIVERSIDAD NACIONAL**

**Sistema de Estudios de Posgrado (SEPUNA)**

**Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT)**

**Maestría en Apicultura Tropical (MAT)**

**Establecimiento de un método en cromatografía en capa fina de alto desempeño (HPTLC)  
para cuantificar metilglioxal (MGO) en mieles de abejas sin aguijón**

Ing. Zoot. Carmen Patricia Torres Figueredo

Trabajo presentado para optar al grado de Máster en Apicultura Tropical. Cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional.

Heredia. Costa Rica.

**Heredia, noviembre, 2023**

Profesores de la Asignatura APA 711 - Práctica Profesional 2:

- ❖ PhD. Gabriel Zamora Fallas.
- ❖ PhD. Johan van Veen.
- ❖ MSc. Eduardo Herrera.

Profesores Asesores:

- ❖ PhD. Gabriel Zamora.
- ❖ MSc. Eduardo Umaña Rojas.

Este trabajo se realizó bajo el auspicio del Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales  
(CINAT), de la Universidad Nacional.

## **Agradecimientos**

A mi querida familia, quienes han sido base de mi formación, cada uno de ustedes ha contribuido de manera significativa a mi desarrollo personal y académico.

Al PhD. Gabriel Zamora, por su invaluable guía, paciencia y apoyo durante todo el proceso de realización de este trabajo. Así mismo, deseo extender mi gratitud al MSc. Eduardo Umaña Rojas por sus consejos y asesorías en la elaboración del trabajo.

A los profesores MSc. Mario Gallardo y MSc. Eduardo Herrera por sus aportes tanto en el ámbito de la enseñanza como también en su colaboración con la colecta de muestras analizadas.

A las profesoras MSc. Paola Hernández Ching y MSc. Natalia Fallas por sus consejos y orientaciones constantes a lo largo de este hermoso proceso.

Quiero expresar mi agradecimiento al Fondo de Apoyo para estudiantes de posgrado de la Vicerrectoría de Investigación (UNA), por el respaldo financiero brindado a lo largo de la elaboración del Trabajo Final de Graduación.

Al plantel docente y administrativo del Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT-UNA), especialmente al Comité de Gestión Académica por otorgarme una beca del 50% de exoneración para el pago de matrículas y cursos.

A la Sra. Vera Elizondo y su familia, por brindarme la calidez de un hogar durante mi estadía por Costa Rica.

A Kemly Arias por su valiosa colaboración y ayuda en el procesamiento de las muestras para este trabajo.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mis amigos, que siempre me han prestado un gran apoyo moral, necesarios en los momentos difíciles de este trabajo.

### **Dedicatoria**

A mis dos mamás: Delia y Esperanza, por el apoyo incondicional a lo largo de esta travesía. Han sido un pilar fundamental en mi vida, impulsándome siempre a superarme y alcanzar con éxito esta maestría.

A mi hermana Lourdes, por estar siempre presente, acompañándome y brindándome su apoyo incondicional durante cada etapa de este proceso.

A Carlos Ozuna, por siempre confiar en mis capacidades, así como sus palabras de aliento diarias, recordándome que podía lograrlo, han sido un motor importante en mi camino hacia el éxito.

A Candy, mi fiel compañera, su amor y compañía me han motivado a nunca rendirme.

A mis queridos abuelos, Daniel (+) y Migdonia (+), les agradezco por sus valiosos consejos que me brindaron. Sus enseñanzas perdurarán en mi memoria para siempre, y su influencia siempre ha estado presente en mi camino.

## Resumen

El Metilglioxal (MGO) es una molécula formada en la etapa de maduración de la miel, el cual contribuye a las propiedades antimicrobianas y cicatrizantes de la misma. El MGO se encuentra presente en la miel de Manuka, extraída del árbol Manuka o árbol de té (*Leptospermum scoparium*). La concentración de MGO puede conferir a la miel de Manuka la cualidad de poder emplearse en aplicaciones médicas. Varios estudios in vitro han demostrado que la miel de abejas sin aguijón tiene características fisicoquímicas distintas a la miel de *Apis mellifera*, además reporta un potencial antibacteriano y antibiofilm superior en comparación con la miel de Manuka. Es importante realizar estudios analíticos más precisos para identificar y cuantificar los compuestos presentes en la miel de abejas sin aguijón que contribuyen a sus efectos antimicrobianos. El objetivo general de este trabajo fue establecer un método en cromatografía en capa fina de alto desempeño (HPTLC) para cuantificar metilglioxal (MGO) en mieles de abejas sin aguijón. Para dicho análisis se utilizaron mieles de dos especies de meliponinos: 10 muestras de *Tetragonisca angustula* y 10 muestras de *Melipona beecheii*. Así mismo, se analizó una muestra de miel de Manuka. Las cromatografías se realizaron empleando el sistema HPTLC de CAMAG® del Laboratorio de Microbiología y Química Medicinal del CINAT-UNA. Se estableció un método de cuantificación de MGO mediante HPTLC, el mismo se encuentra validado mediante los procedimientos establecidos por el ICH Guideline teniendo en cuenta parámetros de desempeño tales como linealidad, ámbito, especificidad, límite de detección y cuantificación, entre otros. Se logró la optimización del método realizando una extracción en fase sólida a las muestras de mieles analizadas posterior a la reacción de 1,2-fenilendiamina, incluyendo la adición de estándar interno en condición estándar de HPTLC y mejorando la resolución del analito mediante la utilización de una fase móvil compuesta de acetato de etilo : acetonitrilo : ácido fórmico (84.5:14.5:1). Con el método propuesto, se logró cuantificar MGO en las muestras de mieles de meliponinos. Así mismo, algunas de las muestras analizadas muestran valores iguales o superiores al contenido de MGO presente en la miel de Manuka de Medihoney®. Los resultados de este trabajo brindaron un aporte importante sobre la composición química de las mieles de las abejas sin aguijón, así como de los posibles mecanismos de acción que les confieren las propiedades antimicrobianas a estas mieles.

**Palabras claves:** HPTLC, Metilglioxal, Abejas sin aguijón, miel, Manuka.

### Mombyky

Metilglioxal (MGO) ha'e peteĩ mba'e michĩ oikóva oġuajêvo ikagytãme oipytyvôva mba'erekopy oñemoĩva mymbachu'i ha tesaĩra orekóvape. MGO oĩ Manuka eĩrape, ojepe'áva Manuka vyramata terã vyramatagui (*Leptospermum scoparium*). Pe jehechaukave MGO rehegua ikatu ome'ê eĩra Manuka-pe iporãve haġuã ikatúva ojeporu opa tesaĩrame ġuarã. Heta jeporeka oĩva in vitro ohechauka eĩra oúva káva ñande jopi'ýva oguereko rupi hekoitéva físicoquímica iñambuéva eĩra *Apis mellifera*-gui, ha avei oreko rupi mbarete ojeporúva mymba chu'i ha antibiofilm yvateve oñembojojávo eĩra Manuka rehe. Tuicha mba'e ojejapo haġuã jevichea analíticamente ikatu haġuáicha peichaite ojekuaa ha oñecuantifika haġuã umi oguerekó ha oĩva eĩra káva ñande jopi'ývape oipytyvô haġuã mymba chu'i ñembyao orekóva. Ko tembiapo hembipotaitepe omopyenda cromatografía de capa fina de alto rendimiento rupive (HPTLC) ocuantifika haġuã metilglioxal (MGO) eĩra oúva káva ndo porojopívaigui. Ko jevicheape ojeporu eĩra mokõi especie meliponino-gui: 10 techaukarã *Tetragonisca angustula* ha 10 techaukarã *Melipona beecheii*. Péicha avei ojevichea peteĩ techaukarã eĩra Manuka rehegua. Umi cromatografía ojejapo ojeporúvo sistema CAMAG® HPTLC Laboratorio de Microbiología y Química Medicinal CINAT-UNA-pegua. Oñemoañete ojeporúvo umi jejapopyrã oñemopyendáva oñecuantifika haguã MGO ojeporúvo HPTLC; oñemoañete ojeporúvo avei umi omopyendáva Directriz ICH, ojeġuerekóva tesa renondépe mba'éichaitépa ha'eháicha jepyso, jehupyty, jerekoite ha avei moġpevépa ohupyty pe cuantificación oġuahe ambue apytépe oiko pe derivatización rire oĩmeháme ñemoĩvepe estándar interno HPTLC ha omohenda porãve resolución analito ojeporúvo fase móvil jehe'ápe acetato de etilo: acetonitrilo: ácido fórmico (84.5:14.5:1). Pe mba'e ojehechaukaséva rupive, ikatu oñecuantifika MGO umi jehechauka eĩra meliponina rehegua. Upéicha avei, oĩ umi jehechapyrã ojejeporekáva mba'éichapa ojoajuva terã yvateve oguerekóva MGO oĩva eĩra Medihoney® Manuka-pe. Ko jehecha tembiapo rupive ome'ê peteĩ ñeme'ê mba'e guasu pe composición química eĩra oúva káva ñande jopi'ývagui ha avei mba'épa ikatúva ome'ê ikatuhaġuaicha oñemombarete mba'e ome'êva mymba chu'i ko eĩra.

**Ñe'ê tenondegua:** HPTLC, Metilglioxal, káva ñandejopi'ýva, eĩra, Manuka.

## Índice

	<b>pág.</b>
Agradecimientos .....	3
Dedicatoria .....	4
Resumen.....	5
Mombyky (Resumen en guaraní).....	6
Índice.....	7
Lista de Tablas .....	9
Lista de Figuras.....	10
Lista de Abreviaturas .....	11
1. Introducción .....	13
1.1 Justificación.....	14
1.2 Objetivos .....	15
1.2.1 <i>Objetivo General</i> .....	15
1.2.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	15
2. Marco Teórico.....	16
2.1 Metilglioxal (MGO).....	16
2.2 Características fisicoquímicas de las mieles de las abejas sin aguijón .....	17
2.3 Cromatografía en capa fina de alto desempeño (HPTLC) .....	18
2.4 Extracción en fase sólida.....	20
3. Metodología .....	22
3.1 Muestras de mieles de abejas sin aguijón .....	22
3.2 Preparación de solución estándar .....	23
3.3 Preparación de muestras.....	23
3.4 Extracción en fase sólida de las muestras .....	23
3.5 Adición de estándar a las muestras .....	24
3.6 Método de Cromatografía en capa fina de alto desempeño (HPTLC).....	24
3.7 Validación del método .....	25
3.7.1 <i>Estabilidad del analito</i> .....	25
3.7.2 <i>Linealidad</i> .....	26

3.7.3 Limite de detección (LD) y Limite de cuantificación (LC) .....	26
3.7.4 <i>Ámbito</i> .....	26
3.7.5 <i>Especificidad</i> .....	26
3.7.6 <i>Precisión</i> .....	27
3.7.7 <i>Repetitividad</i> .....	27
3.7.8 <i>Exactitud</i> .....	27
3.8 Interpretación de resultados .....	28
4. Resultados y Discusión .....	29
4.1 Optimización de las condiciones de la cromatografía.....	29
4.2 Validación de la metodología de cuantificación de MGO en mieles de abejas sin aguijón mediante HPTLC .....	33
4.2.1 <i>Estabilidad del analito</i> .....	34
4.2.2 <i>Parámetros de desempeño</i> .....	35
4.3 Evaluación de la presencia y cuantificación el contenido de MGO por HPTLC en muestras de mieles de abejas sin aguijón.....	37
5. Conclusiones .....	42
6. Recomendaciones .....	43
7. Referencias Bibliográficas .....	44
8. Anexos .....	49

## Lista de Tablas

	pág.
<b>Tabla 1.</b> Variables evaluadas en condiciones estándar de HPTLC en las muestras de miel y en la solución estándar.....	29
<b>Tabla 2.</b> Porcentajes de recuperación obtenidos en cada variable teniendo en cuenta las muestras de miel y de la solución estándar .....	31
<b>Tabla 3.</b> Validación del método de cuantificación de MGO en mieles de Meliponinos mediante HPTLC .....	35
<b>Tabla 4.</b> Repetitividad del método establecido .....	36
<b>Tabla 5.</b> Pruebas de exactitud del método establecido.....	36
<b>Tabla 6.</b> Resultados obtenidos en muestras de mieles de <i>T. angustula</i> con un CV de 0.50% ..	38
<b>Tabla 7.</b> Resultados obtenidos en muestras de mieles de <i>M. beecheii</i> con un CV de 0.98% ..	39
<b>Tabla 8.</b> Identificación de muestras utilizadas .....	49
<b>Tabla 9.</b> Valores obtenidos de MGO mediante HPTLC en condición estándar .....	50

## Lista de Figuras

	<b>pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura molecular del metilglioxal .....	16
<b>Figura 2.</b> Partes de los cartuchos utilizados en SPE .....	20
<b>Figura 3.</b> Esquema del proceso de SPE .....	21
<b>Figura 4.</b> Origen geográfico de las muestras .....	22
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de reacción del MGO y 1,2-fenilendiamina .....	23
<b>Figura 6.</b> Disposición de la aplicación del analito en la placa.....	25
<b>Figura 7.</b> Separación del analito utilizando diferentes tipos de fase móvil en el desarrollo de la cromatografía .....	33
<b>Figura 8.</b> Prueba de estabilidad en 2 dimensiones para 2-metilquinoxalina en luz visible .....	34

## Lista de Abreviaturas

### Organizaciones – Instituciones

- ❖ CINAT: Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales.
- ❖ FDA: Food and Drug Administration - Administración de Alimentos y Medicamentos.
- ❖ ICH: International Conference on Harmonization.
- ❖ UNA: Universidad Nacional.

### Unidades de medida

- ❖  $\mu\text{g}$ : microgramos.
- ❖  $\mu\text{L}$ : microlitros.
- ❖  $\mu\text{m}$ : micrómetros.
- ❖ g: gramos.
- ❖ Kg: kilos.
- ❖ mg: miligramos.
- ❖ mL: mililitros.
- ❖ ng: nanogramos.
- ❖ nm: nanómetros.
- ❖ pg: picogramos.
- ❖ rpm: revoluciones por minuto.

### Técnicas Analíticas

- ❖ HPTLC: High Performance Thin-layer Chromatography - Cromatografía en capa fina de alto desempeño.
- ❖ SPE: Solid Phase Extraction – Extracción en fase sólida.

**Compuestos químicos y moléculas**

- ❖ MGO: Metilglioxal.
- ❖ PBS: Phosphate buffered saline – Solución amortiguadora de fosfatos.
- ❖ TABDFs: *Tetragonisca angustula* Biofilm Destruction Factors – Factores de destrucción de biofilm de *Tetragonisca angustula*.

**Términos utilizados en análisis químicos y estadísticos**

- ❖ %: porcentaje - por ciento.
- ❖ Cn: Concentración.
- ❖ CV: Coeficiente de variación.
- ❖ ND: No detectado.
- ❖ R: Coeficiente de correlación.
- ❖ Rf: Factor de retención.
- ❖ SD: Desviación Estándar.
- ❖ SOP: Standard Operation Procedure – Procedimiento de Operación Estándar.
- ❖ V: volumen.

**Otras abreviaturas utilizadas**

- ❖ ANSAS: Abejas nativas sin agujón.

## 1. Introducción

Desde tiempos ancestrales, la miel se ha utilizado en la medicina popular. A lo largo del tiempo, se ha determinado que esta sustancia producida por las abejas, ya sea de la especie *Apis mellifera* (Apidae: Apini) o de las abejas nativas sin aguijón (Apidae: Meliponini), posee propiedades beneficiosas para la salud; como por ejemplo su gran poder antimicrobiano, antioxidante, así como la capacidad antiinflamatoria y efectos cicatrizantes. Es por estas razones que han sido utilizadas por la humanidad para la curación de heridas, úlceras, quemaduras y otros problemas de la piel (Zamora y Arias, 2011; Johnston et al., 2018; Encalada y Orellana, 2019).

Las abejas utilizan el néctar de las plantas como materia prima principal para la elaboración de la miel. En el caso de la miel monofloral de Manuka, las abejas extraen el néctar de la flor del árbol *Leptospermum scoparium*. La composición química de esta miel es casi similar a las de las mieles que se comercializan en el mercado, pero se diferencia en el alto contenido de Metilglioxal (MGO) (Johnston et al., 2018; Burholt et al., 2022), y por esta razón se le considera como miel de grado médico (Álvarez, 2018). Lo anterior, debido a que su actividad antimicrobiana se asocia con el contenido de MGO y otros componentes químicos presentes en esta miel, las cuales se ven avalados por diversos estudios científicos (Johnston et al., 2018).

Con el desarrollo de nuevos productos de medicina alternativa a base de compuestos orgánicos, han surgido varios productos elaborados con la miel de Manuka. Tal es el caso de la marca Medihoney<sup>®</sup>, a la cual se le atribuyen propiedades antibacterianas, cicatrizantes y posee certificaciones de la FDA (Zamora et al., 2015; Álvarez, 2018; Qu et al., 2020).

La información de la composición química de las mieles de los meliponinos es muy limitada. Por lo tanto, es necesario realizar estudios mediante técnicas analíticas de gran

precisión; para así poder identificar y cuantificar nuevos compuestos que forman parte de la miel de las ANSAS. Dichos compuestos podrían estar asociados a los efectos antimicrobianos que se han comprobado en las mieles de las abejas sin aguijón.

El MGO está asociado con la actividad antimicrobiana de la miel de Manuka y a los productos elaborados a partir de la misma (Cokcetin et al., 2020; Burholt et al., 2022). La presencia de MGO hasta el presente, aún no ha sido evaluada en las mieles de las abejas sin aguijón.

### **1.1 Justificación**

En diversas investigaciones como las de Zamora y Arias (2011); Zamora et al. (2015) y Arguedas (2021), han sido comprobadas las propiedades antimicrobianas de las mieles de abejas sin aguijón. Dichas propiedades son equiparables a los productos elaborados con miel de Manuka, como por ejemplo Medihoney<sup>®</sup>. El principal componente activo de este producto, así como la de la miel de Manuka, es el MGO (Álvarez, 2018; Burholt et al., 2022).

Las propiedades antimicrobianas de las mieles de los meliponinos se deben a diversos factores como la cantidad de azúcares, la humedad, la acidez libre, compuestos fenólicos y proteínas como los TABDFs (Zamora et al., 2017; Umaña et al., 2021).

El MGO influye en la actividad antimicrobiana en las mieles de *A. mellifera*, principalmente en la miel de Manuka (Johnston et al., 2018; Burholt et al., 2022). Este compuesto, podría estar presente en las mieles de las abejas nativas sin aguijón, en concentraciones que influyen en la actividad antimicrobiana.

Debido a estas interrogantes, es importante desarrollar y validar un método analítico mediante la cromatografía en capa fina de alto desempeño (HPTLC). Lo anterior, con la finalidad de analizar sustancias tales como el MGO en las mieles de abejas sin aguijón. En la

actualidad, no se ha establecido un método de análisis para la cuantificación del MGO en las mieles de los meliponinos.

## **1.2 Objetivos**

### ***1.2.1 Objetivo General***

- ❖ Establecer un método en cromatografía en capa fina de alto desempeño (HPTLC) para cuantificar metilglioxal (MGO) en mieles de abejas sin aguijón.

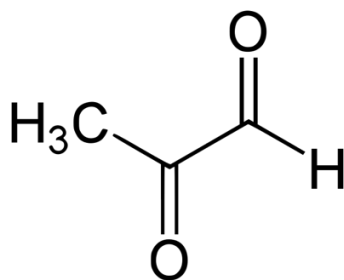
### ***1.2.2 Objetivos Específicos***

- ❖ Adaptar la metodología descrita en literatura a las condiciones y equipo disponible en el laboratorio a fin de desarrollar el método de cuantificación propuesto.
- ❖ Validar la metodología de cuantificación de MGO en mieles de abejas sin aguijón mediante HPTLC para establecer sus parámetros de desempeño.
- ❖ Evaluar la presencia y cuantificar el contenido de MGO por HPTLC en muestras de mieles de abejas sin aguijón de varias especies.

## 2. Marco Teórico

### 2.1 Metilglioxal (MGO)

El Metilglioxal (MGO) también conocida como 2-oxopropanal es una molécula bicarbolina que se forma a partir de la dihidroxiacetona (ver figura 1). El cuerpo humano produce naturalmente esta molécula como subproducto de actividades metabólicas, en el caso de la miel, la formación del MGO se da en la etapa de maduración (San José-Rodríguez y San José, 2015; Cokcetin et al., 2020; Szczepanik, 2020).



**Figura 1**

*Estructura molecular del metilglioxal*

Fuente: Szczepanik (2020).

La función del MGO en el organismo ha sido investigada a lo largo de los años, interviniendo en la formación del piruvato en la vía glucolítica y regulando la división celular (Sartori & Henriques, 2010). La función del MGO en la miel es inhibir el crecimiento de bacterias siendo así un poderoso compuesto antibacterial (Cokcetin et al., 2020; Samaniego-Rojas y Campos-Murillo, 2022).

Con referencia a lo anterior, la actividad del MGO en el organismo causa una opinión contradictoria para los especialistas, puesto que también genera efectos negativos en la salud causando afectaciones fisiológicas y cognitivas. Sartori & Henriques (2010) y Szczepanik (2020), señalan que el MGO está asociado a diversos problemas de metabolismo en el ser

humano tales como diabetes, enfermedades cardiovasculares, cáncer, envejecimiento y otros, debido a que esta sustancia reacciona con las proteínas y diversas investigaciones mencionan sus efectos inhibidores en las células del cuerpo humano.

## **2.2 Características fisicoquímicas de las mieles de las abejas sin aguijón**

Zepeda (2018), destaca el uso milenario de la miel de abejas sin aguijón en las civilizaciones antiguas, en donde se utilizaba como ingrediente para la elaboración de algunos alimentos y como medicamento alternativo para diversas afecciones.

Las características fisicoquímicas que brindan la actividad antimicrobiana en las mieles son su alta osmolaridad (la cual deshidrata los microorganismos) y su acidez (que influye en la inhibición de los microorganismos). Cabe mencionar, que las mieles de los meliponinos son más ácidas que la miel de *A. mellifera*. Estas mieles también brindan un efecto antimicrobiano debido a su contenido de peróxidos de hidrógeno y fitoquímicos como flavonoides, ácidos fenólicos y carotenoides. El contenido de los anteriores dependerá del néctar de las flores utilizadas por las abejas. A esto, se le deben de adicionar otros factores que influyen en la actividad antimicrobiana de las mieles, como la botánica de la flor, la especie de abeja, la geografía del lugar y el manejo postcosecha de la miel. Todas estas características, a su vez, influyen en que las mieles de las ANSAS tengan un sabor diferente y sean más líquidas que las mieles de *A. mellifera* (Zepeda, 2018; Ramírez, 2022; Campo e Hincapié, 2023).

Ramírez (2022), relaciona el almacenamiento de las mieles en los potes de cerumen de las abejas sin aguijón con el contenido de fitoquímicos; lográndose así una mayor capacidad antibacteriana en estas mieles. Arguedas (2021), reportó que las mieles de abejas sin aguijón de *Tetragonisca angustula* y *Scaptotrigona pectoralis* pueden emplearse como principio activo en la formulación de un medicamento de uso veterinario. Lo anterior, debido a su gran potencial

antibacteriano y antibiofilms. En estos ensayos in vitro, las formulaciones con estas mieles lograron superar a Medihoney® y a otro producto elaborado a partir de miel de Manuka llamado Kruuse Manuka G®, el cual es de uso veterinario. Por otro lado, Espinoza (2019), estudió la capacidad antimicrobiana y antioxidante de la miel de *Melipona costaricensis*. La autora, determinó que la miel de esta especie no presentaba una actividad antimicrobiana de amplio espectro. Lo cual indica que cada miel de meliponinos es diferente respecto a su composición química y por ende a sus propiedades.

Umaña et al. (2021), analizaron las mieles de *Tetragonisca angustula* y *Melipona beecheii*, que son las especies de mayor relevancia en Costa Rica (en términos comerciales) con el fin de diferenciar fisicoquímicamente estas mieles. Con esta investigación, se pudo determinar que la composición fisicoquímica de las mieles de estos meliponinos es diferente entre sí con relación a los niveles de azúcares (glucosa y fructosa) y la cantidad de cenizas. A la vez, se detectaron diferencias significativas en el contenido de aminoácidos (por ejemplo, en el contenido de prolina), la humedad, la acidez libre en las mieles de estas dos especies estudiadas y esto se ve asociado al néctar de las flores utilizadas por las abejas sin aguijón.

Hasta la fecha, no se han registrado investigaciones relacionadas con la evaluación del contenido de MGO en las mieles de abejas sin aguijón (G. Zamora, comunicación personal, 6 de setiembre, 2023).

### **2.3 Cromatografía en capa fina de alto desempeño (HPTLC)**

La cromatografía en capa fina de alto desempeño o HPTLC es una técnica analítica de separación de diferentes componentes de muestras líquidas, lo cual hace que sea utilizado principalmente en industrias farmacéuticas, alimentarias y ambientales. Esta técnica consta de una fase estacionaria y una fase móvil, en donde se utiliza tecnología de punta y una metodología

estandarizada, lo que facilita la identificación y determinación cuantitativa de uno o varios compuestos que pueden encontrarse en una muestra (Reich & Schibli, 2007; Suárez y Venegas, 2016; Báez Pérez et al., 2017).

Los procedimientos de validación de un método de HPTLC constan de un análisis de estabilidad del analito y la determinación de parámetros de desempeño tales como linealidad, exactitud, robustez, especificidad, ámbito, precisión, límites de detección y cuantificación. Con la realización de estos ensayos, se asegura que un procedimiento analítico sea reproducible y fiable, además de brindar resultados consistentes al analista. Existen diferentes procedimientos de validación de organismos tales como los de la FDA, el ICH y la World Health Organization, entre otros (Renger et al., 2011; Hernández Falcón et al., 2015; Ahumada et al., 2023).

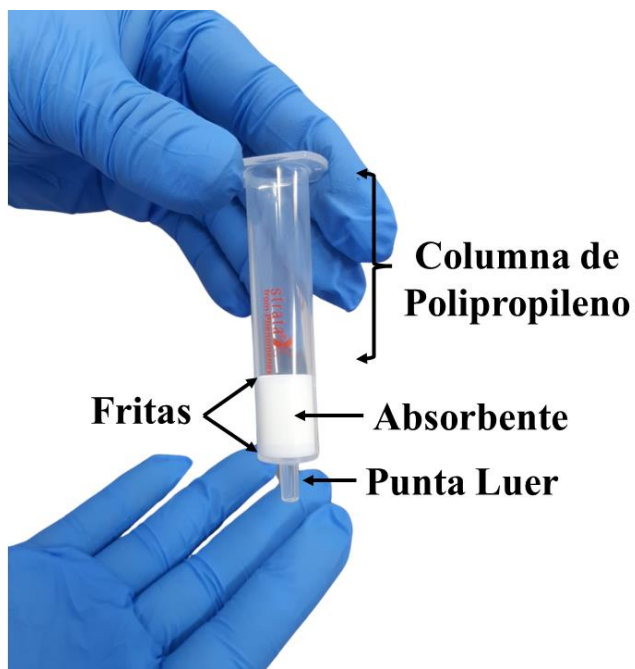
Burholt et al. (2022) establecieron un método de análisis y cuantificación de metilglioxal mediante HPTLC en mieles de *A. mellifera*, específicamente en miel de Manuka. Los autores indicaron que la solución acuosa de MGO en combinación con 1,2-fenilendiamina en su forma estable produce una nueva molécula conocida como 2-metilquinoxalina. Adicionalmente, realizaron diversas pruebas con las muestras para confirmar resultados reproducibles. En este experimento, los equipos de HPTLC empleados fueron de CAMAG® y para el desarrollo de la cromatografía se utilizó una cámara de Twin Trough.

Las muestras fueron aplicadas en un volumen entre 0.3 y 9.0  $\mu\text{L}$  en 27 espacios dentro de la placa y utilizando una curva de calibración de tres (3) puntos. Se obtuvo un porcentaje de recuperación de 90% para el estándar de MGO y la cantidad reportada de MGO en las mieles de Manuka analizadas presentaron un valor de 50.0 a 600.0 mg / Kg, los cuales se asemejan a los valores reportados de MGO en mieles de Manuka de Nueva Zelanda (Burholt et al., 2022).

## 2.4 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida o Solid Phase Extraction (SPE), es una metodología que tiene como objetivo la separación selectiva de componentes de interés presentes en la matriz o eliminar interferencias que puedan existir en una muestra líquida mediante un absorbente sólido, lo cual contribuye significativamente a mejorar la sensibilidad del método utilizado al concentrar la muestra que pasa por este proceso (Peña, 2011; Fuentes López et al., 2020).

En este tipo de extracción, se utilizan cartuchos o columnas que tienen una presentación similar a una jeringa, la cual consta de un material absorbente entre dos fritas con poros de 10 a 20  $\mu\text{m}$ . La muestra es colocada en el recipiente y es forzada a atravesarlo mediante un émbolo, centrifugación o la aplicación de vacío (Carmona, 2006; Peña, 2011; Fuentes López et al., 2020).



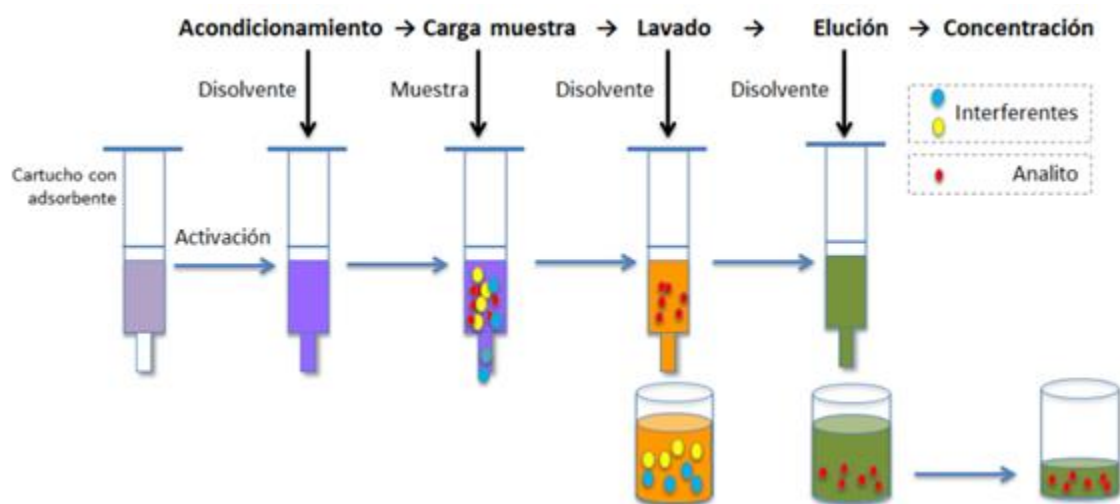
**Figura 2**

*Partes de los cartuchos utilizados en SPE*

*Nota:* Adaptado de Carmona (2006) y Fuentes López et al. (2020).

Mediante esta metodología de trabajo se pueden destacar tres utilidades: la retención y extracción de un analito específico, la retención de interferencias y el fraccionamiento de la muestra. Adicionalmente, este proceso puede combinarse en sistemas cromatográficos u otros sistemas de extracción (Fuentes López et al., 2020).

El procedimiento de extracción comienza con el acondicionamiento del cartucho mediante la aplicación de un disolvente para activarlo. Luego, se agrega la cantidad deseada de la muestra, la cual pasa por una etapa de limpieza para eliminar cualquier sustancia que pueda interferir con la muestra original. Una vez que la muestra está concentrada, se procede a la elución de los analitos utilizando un disolvente compatible con la técnica analítica utilizada (Peña, 2011; Fuentes López et al., 2020).



**Figura 3**

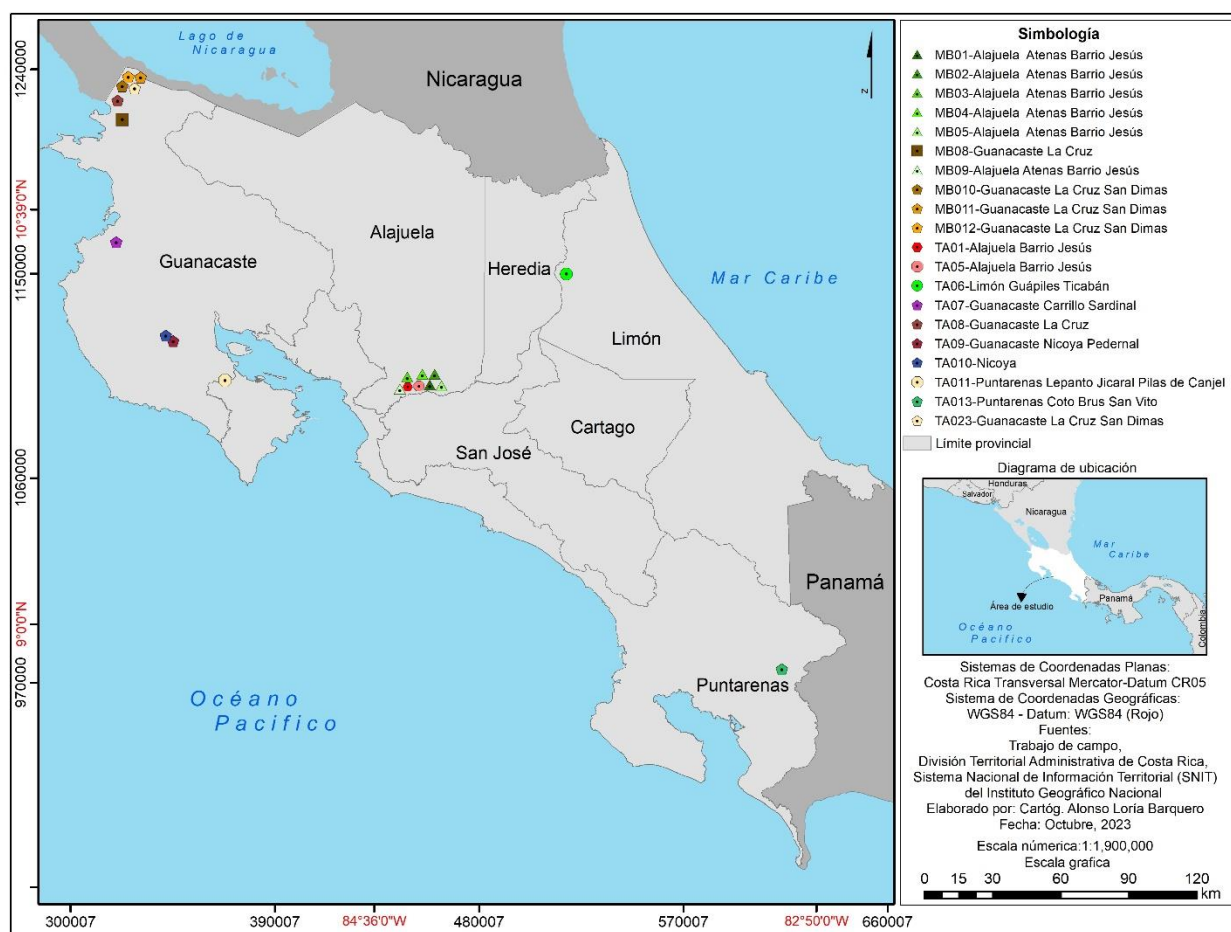
*Esquema del proceso de SPE*

Fuente: Fuentes López et al. (2020).

### 3. Metodología

#### 3.1 Muestras de mieles de abejas sin aguijón

Se emplearon muestras de mieles pertenecientes a dos especies de meliponinos: 10 muestras de *Tetragonisca angustula* y 10 muestras de *Melipona beecheii*, dando un total de 20 muestras analizadas. Adicionalmente se analizó una muestra de miel de Manuka de *Apis mellifera*. Estas muestras se encontraban almacenadas en el inventario de muestras del Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT) de la Universidad Nacional y procedían de investigaciones realizadas anteriormente. Cada muestra tuvo una masa mínima de 5 gramos.

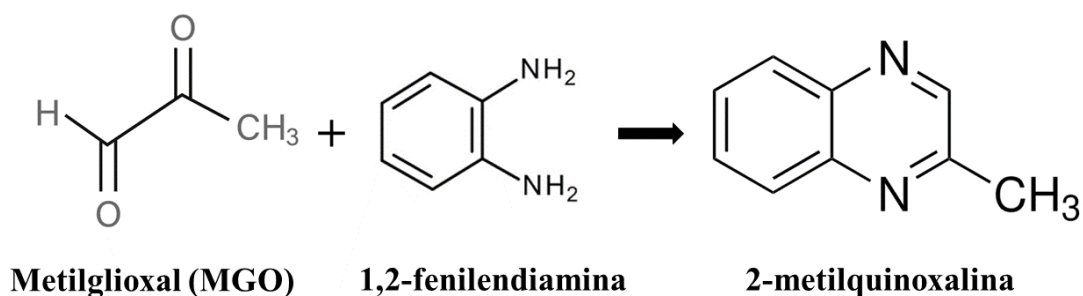


**Figura 4**

*Origen geográfico de las muestras*

### 3.2 Preparación de solución estándar

Los estándares cuya concentración fue de 126  $\mu\text{g} / \text{mL}$  se prepararon a partir de una solución acuosa de metilglioxal al 40% (Merck) y agua destilada. A la anterior solución, se le adicionaron 0.2% de 1,2-fenilendiamina (Sigma-Aldrich), y se refrigeró por 2 días a 8  $^{\circ}\text{C}$  para completar la reacción de derivatización.



**Figura 5**

*Mecanismo de reacción del MGO y 1,2-fenilendiamina*

Fuente: Burholt et al. (2022).

### 3.3 Preparación de muestras

Se preparó una solución de 100 mg /mL de miel en una solución de agua / etanol (LABQUÍM CR) en una proporción 3:2. A esta solución, se le agregó 0.2% de 1,2-fenilendiamina. Esta solución, se refrigeró por 2 días a 8  $^{\circ}\text{C}$  para completar la reacción de derivatización.

### 3.4 Extracción en fase sólida de las muestras

Las muestras de las mieles y el estándar de MGO se sometieron a una centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos. Luego, se filtraron mediante filtros de 200 nm utilizando una jeringa.

Las extracciones en fase sólida se realizaron de acuerdo con las indicaciones del fabricante Phenomenex<sup>®</sup>. Las columnas utilizadas se activaron con metanol para posteriormente equilibrarlas con agua destilada. A continuación, la muestra se pasó a través de la columna y se otorgó 5 minutos de tiempo para su secado. Después de este periodo, se añadió metanol para recuperar la fracción extraída.

### **3.5 Adición de estándar a las muestras**

La técnica de adición de estándar consistió en preparar una solución compuesta por las muestras de las mieles y el estándar de MGO en una proporción 1:1 (v/v).

### **3.6 Método de Cromatografía en capa fina de alto desempeño (HPTLC)**

Las cromatografías se realizaron empleando el sistema HPTLC de CAMAG<sup>®</sup> que posee el Laboratorio de Microbiología y Química Medicinal del CINAT-UNA. Se empleó la metodología descrita por Burholt et al. (2022). La cual se menciona brevemente a continuación.

Se empleó como fase estacionaria placas de HPTLC silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) y como fase móvil se empleó una mezcla de acetato de etilo (Fisher Scientific grado HPLC con una pureza del 99.9%) / acetonitrilo (Honeywell grado gradiente HPLC con una pureza de  $\geq 99.9\%$ ) / ácido fórmico (Sigma-Aldrich con una pureza entre 98.0 a 100%) en una proporción de 84.5:14.5:1 (v/v/v) respectivamente. Como agente derivatizante post cromatografía, se utilizó el reactivo anisaldehído (Aldrich).

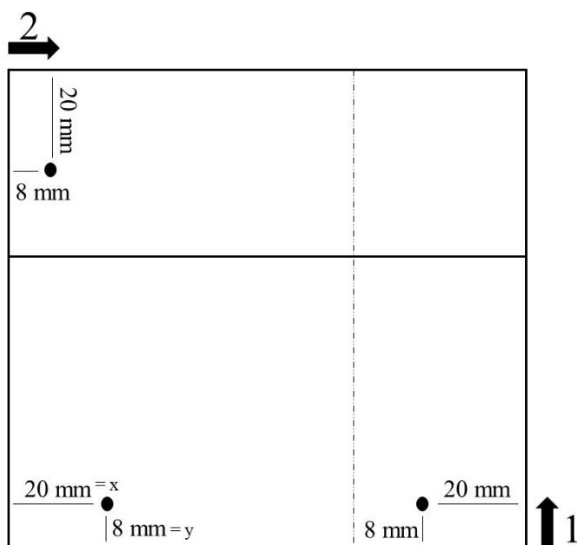
Los cromatogramas fueron evaluados mediante densitometría a una longitud de onda de 480 nm. El análisis de la cromatografía y los cálculos de cuantificación, se realizaron mediante el software visionCATS de CAMAG<sup>®</sup>.

### 3.7 Validación del método

La validación del método se llevó a cabo siguiendo los procedimientos establecidos por el International Conference on Harmonization (ICH) Guidelines; los cuales fueron compilados en un plan de validación para HPTLC por el Dr. Gabriel Zamora, coordinador del Programa de Microbiología y Química Medicinal del CINAT-UNA. Estos procedimientos se basaron en las pautas establecidas por Reich & Schibli (2007) y Renger et al. (2011).

#### 3.7.1 Estabilidad del analito

El analito, en este caso, el MGO, debe mantenerse estable durante un periodo de tiempo adecuado tanto en la solución como en la placa. Esto se considera un requisito previo a la validación. Se realizó una cromatografía en dos dimensiones con el objetivo de asegurar que no ocurra una degradación visual del analito. En la Figura 6 se observa la forma en que se aplicó la solución.



**Figura 6**

*Disposición de aplicación del analito en la placa*

*Nota:* Se aplicó 2  $\mu$ L de la solución estándar de MGO (126  $\mu$ g / mL) en cada punto.

### 3.7.2 *Linealidad*

Este proceso se verificó solicitando al software visionCATS de CAMAG® la generación de una curva de calibración durante la primera cromatografía realizada. Para este método, se emplearon un total de cinco (5) puntos de calibración.

### 3.7.3 *Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC)*

El límite de detección se refiere a la cantidad mínima detectable mediante densitometría, mientras que el límite de cuantificación es dado por la cantidad máxima en la que es posible diferenciar la absorbancia del analito. Para determinar estos límites, se aplicaron veintisiete (27) distintas concentraciones de la referencia.

### 3.7.4 *Ámbito*

Se aplicaron diversas concentraciones de la muestra, lo que permitió establecer el ámbito en el cual se puede trabajar en función a los valores obtenidos, teniendo en cuenta el límite de detección, el límite de cuantificación y la Ley de Beer.

### 3.7.5 *Especificidad*

Se llevo a cabo una cromatografía de HPTLC en la cual se dispuso las muestras en los tracks correspondientes: del track 1 al 5, se aplicó 1  $\mu\text{L}$  de una muestra de miel de *T. angustula* con MGO en una proporción 1:1 (126  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ); del track 6 al 10, se empleó un volumen de 0.5  $\mu\text{L}$  de la referencia (63  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) y finalmente, del track 11 al 15, se sembró 1  $\mu\text{L}$  de una muestra de miel de *M. beecheii* con MGO en una proporción 1:1 (126  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ).

Durante este proceso, se realizaron cálculos de los valores de los  $R_f \pm \text{SD}$  tanto para las referencias como para las sustancias cercanas o contaminantes que pudieron encontrarse en el ensayo.

### 3.7.6 *Precisión*

Se preparó una solución de concentración conocida del estándar. Esta solución se aplicó diez (10) veces en la misma concentración, además de sembrar cinco (5) puntos de la curva de calibración. La cuantificación se realizó utilizando el software visionCATS y el mismo proporcionó los resultados junto con el CV.

### 3.7.7 *Repetitividad*

Se prepararon tres soluciones (A, B y C) de concentración conocida utilizando el MGO Estándar como referencia:

- ❖ A: Solución de 32  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de la referencia.
- ❖ B: Solución de 63  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de la referencia.
- ❖ C: Solución de 126  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de la referencia.

Estas tres soluciones se aplicaron en una placa de HPTLC en un volumen de 1  $\mu\text{L}$  con tres réplicas cada una. Además, se incluyeron los cinco (5) puntos de la curva de calibración. La cuantificación se llevó a cabo utilizando el software visionCATS, el cual proporciono los resultados junto con el CV y la desviación estándar de cada triada.

### 3.7.8 *Exactitud*

Se preparó una solución de muestra a partir del estándar con una concentración teórica de 31.5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  denominada solución de muestra (M). Posteriormente, se prepararon las siguientes soluciones:

- ❖ M + A: Solución constituida por 500  $\mu\text{L}$  de M + 250 de  $\mu\text{L}$  del estándar de MGO con una concentración teórica de 63  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .
- ❖ M + B: Solución constituida por 500  $\mu\text{L}$  de M + 500 de  $\mu\text{L}$  del estándar de MGO con una concentración teórica de 78.75  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

- ❖ M + C: Solución constituida por 500  $\mu\text{L}$  de M + 1000 de  $\mu\text{L}$  del estándar de MGO con una concentración teórica de 94.5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

Todas estas soluciones se aplicaron en un volumen de 1  $\mu\text{L}$  por triplicado en la placa, junto con la curva de calibración de cinco puntos de la referencia.

Para determinar la exactitud, se realizó el cálculo restando el valor calculado de la concentración de la muestra + A menos la concentración de analito en la solución de muestra M. Este cálculo se efectuó por triplicado por cada solución preparada. Luego, cada valor se comparó con el valor teórico de la concentración.

La exactitud se expresó como un porcentaje de recuperación del analito mediante la formula:  $(\text{Concentración experimental} / \text{Concentración teórica}) \times 100$ .

Además, se añadió la SD calculada, reportada también en porcentaje.

### **3.8 Interpretación de resultados**

Con respecto a los resultados de cuantificación, se emplearon técnicas de estadística descriptiva básica mediante las herramientas de Excel (Microsoft 365) para evaluar los datos obtenidos. Los valores fueron reportados en mg de MGO por Kg de miel.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Optimización de las condiciones de la cromatografía

Se realizaron diversos ensayos para establecer las condiciones idóneas para la cromatografía. Se optimizaron todas las condiciones del método a fin de lograr un porcentaje de recuperación igual o mayor al 100%. A su vez, se ajustó la fase móvil para lograr una mejor resolución en la separación del analito.

En la Tabla 1 se observan las variables estudiadas en los diferentes ensayos realizados, con el objetivo de lograr la optimización el método.

**Tabla 1**

*Variables evaluadas en condiciones estándar de HPTLC en las muestras de miel y en la solución estándar*

<b>ID Ensayo</b>	<b>Descripción de las variables</b>
A	Las muestras de mieles se disolvieron en PBS (2:1) con la finalidad de obtener un pH neutro.
B	Se adicionó 1 volumen de ácido fórmico en la fase móvil (84.5 : 14.5 : 1).
C	Se adicionó 2 volúmenes de ácido fórmico en la fase móvil (84 : 14 : 2).
D	Adición de ácido acético en fase móvil (84.5 : 14.5 : 1).
E	Se redujo el volumen de aplicación de las muestras (1, 3, 5 $\mu$ L).
F	Se trabajó con un volumen de aplicación reducido y se utilizó la fase móvil con ácido fórmico (84.5 : 14.5 : 1).
G	Para la aplicación de las muestras se trabajó con una solución constituida por 1,5 $\mu$ L de MGO y 500 mL de muestra.
H	En la aplicación de las muestras se trabajó con una solución constituida por 1000 $\mu$ L de MGO + 200 $\mu$ L de muestra + 800 $\mu$ L de agua destilada.
I	Se trabajó con una solución compuesta por 1000 $\mu$ L de MGO + 100 $\mu$ L de muestra + 900 $\mu$ L de agua destilada.
J	Para la aplicación de las muestras se utilizó una solución constituida de

---

	1000 $\mu$ L de MGO + 50 $\mu$ L de muestra + 950 $\mu$ L de agua destilada.
K	Para la corrida cromatográfica se trabajó con una solución de 1800 $\mu$ L de MGO + 200 $\mu$ L de muestra.
L	Se realizó una extracción en fase sólida orientada a eliminar ácidos orgánicos, terpenos y compuestos fenólicos de la muestra y previo a la reacción con 1,2-fenilendiamina.
M	Se utilizó la extracción en fase sólida orientada a eliminar proteínas y azúcares de la muestra utilizando la elución del analito que quedo en el absorbente de la columna de SPE. Lo anterior se realizó posterior a la reacción con 1,2-fenilendiamina. Las muestras quedaron concentradas en una solución de metanol.

---

*Nota:* En los ensayos del A al K, las muestras estaban preparadas con una solución de agua : etanol.

Teniendo como base el trabajo de Burholt et al. (2022), la aplicación de las muestras se realizaba en 27 puntos en las placas, no obstante, al aplicar esta configuración espacial para las muestras de mieles de ANSAS, los resultados de la cromatografía presentaban múltiples interferencias con respecto a la cantidad detectable de analito, debido a esto, se optó por trabajar en condiciones estándar de HPTLC, la cual consistió en aplicar las muestras en un espacio de 15 puntos en las placas, mejorando así la separación de los compuestos deseados.

La Tabla 2 muestra los porcentajes de recuperación obtenidos en los diferentes ensayos realizados, así también se indican los volúmenes de aplicación utilizados para las muestras y la solución estándar de MGO. Los porcentajes de recuperación logrados en cada prueba fueron de gran importancia a la hora de definir la metodología más idónea para aplicarla en el análisis de las mieles de los meliponinos.

**Tabla 2**

*Porcentajes de recuperación obtenidos en cada variable teniendo en cuenta las muestras de miel y de la solución estándar*

Muestras	<i>Tetragonisca angustula</i>					<i>Melipona beecheii</i>					MGO <sup>1</sup>	MGO <sup>2</sup>
	V (μL)											
ID	1	2	3	5	10	1	2	3	5	10	1	1
Ensayo												
A	-	-	-	69	35	-	-	-	67	37	99	-
B	-	-	-	43	29	-	-	-	48	31	88	-
C	-	-	-	45	33	-	-	-	45	31	93	-
D	-	-	-	46	34	-	-	-	44	30	91	-
E	77	-	59	51	-	71	-	60	45	-	97	-
F	74	-	62	54	-	71	-	54	37	-	92	-
G	87	77	68	-	-	79	67	52	-	-	97	-
H	73	67	57	-	-	76	65	58	-	-	85	-
I	72	69	66	-	-	76	72	63	-	-	92	-
J	71	68	67	-	-	80	68	56	-	-	90	-
K	66	65	69	-	-	80	71	64	-	-	92	-
L	-	73	-	-	-	-	-	-	-	-	98	70
<b>M</b>	<b>84</b>	<b>84</b>	-	-	-	<b>79</b>	<b>80</b>	-	-	-	<b>92</b>	<b>101</b>

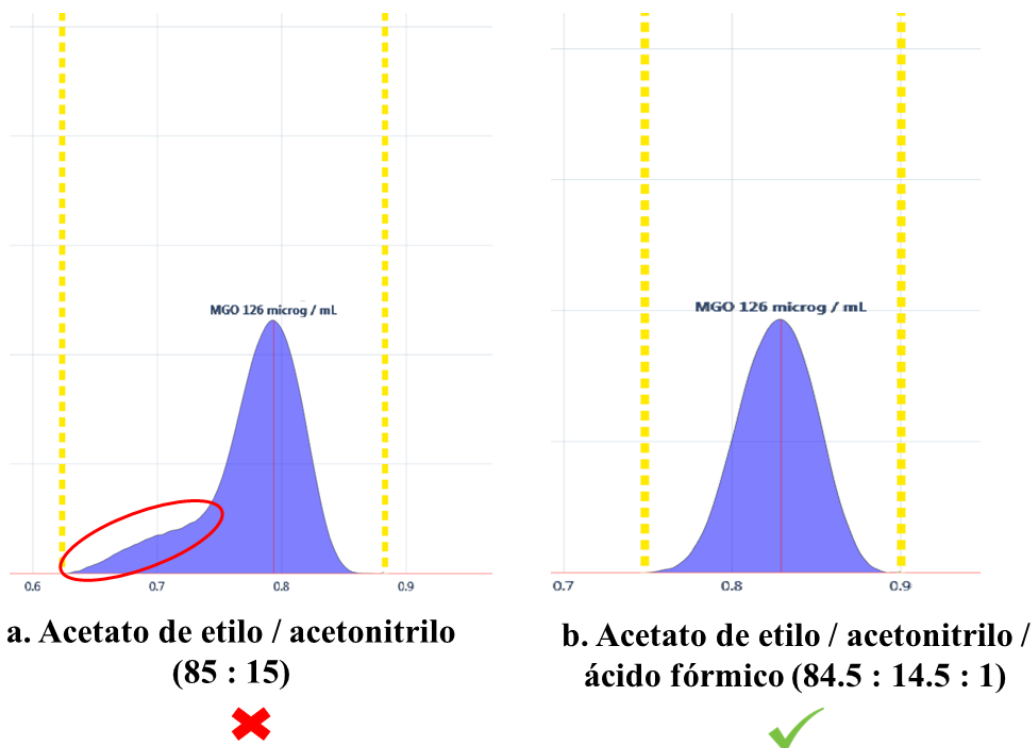
*Nota:* El MGO<sup>1</sup> corresponde a la solución estándar y el MGO<sup>2</sup> corresponde a la solución estándar que pasó por el proceso de SPE.

A partir de los resultados de la optimización se determinó que las muestras deben de pasar por la extracción en fase sólida con el objetivo de eliminar proteínas y azúcares de estas, posterior a la reacción de 1,2-fenilendiamina, ya que con esta metodología se obtienen porcentajes de recuperación del 80% en las muestras de mieles y del 100% en la solución estándar. Adicionalmente, se puede observar que la cantidad de muestra aplicada en la placa

interfiere en los porcentajes de recuperación obtenidos, por lo que se decidió aplicar las muestras en un volumen de 1  $\mu$ L.

En las cromatografías realizadas por Burholt et al. (2022), las muestras de miel de *A. mellifera* estaban disueltas en una solución de agua : etanol, sin embargo, como se observa en la Tabla 2, al utilizar este tipo de solución no se obtuvieron porcentajes de recuperación altos, por lo cual se optó por eluir las muestras post SPE en metanol, para luego realizar la adición de estándar de MGO en una proporción 1:1 arrojando una concentración en solución de ensayo de 63  $\mu$ g / mL. Esta adición de estándar tuvo como objetivo la creación de una cantidad detectable del analito para el ensayo realizado. Esto sugiere que al trabajar con mieles de meliponinos, el agua puede actuar como interferente en la cuantificación del analito, así como la cantidad de azúcares, ácidos orgánicos, terpenos y proteínas presentes en las mismas (Umaña et al., 2021).

Para obtener una buena separación del analito se utilizaron diferentes proporciones de ácido fórmico en la fase móvil. La Figura 7 compara los resultados obtenidos con la fase móvil utilizada en Burholt et al. (2022) respecto a los resultados obtenidos empleando la fase móvil en distintas proporciones de ácido fórmico.



**Figura 7**

*Separación del analito utilizando diferentes tipos de fase móvil en el desarrollo de la cromatografía*

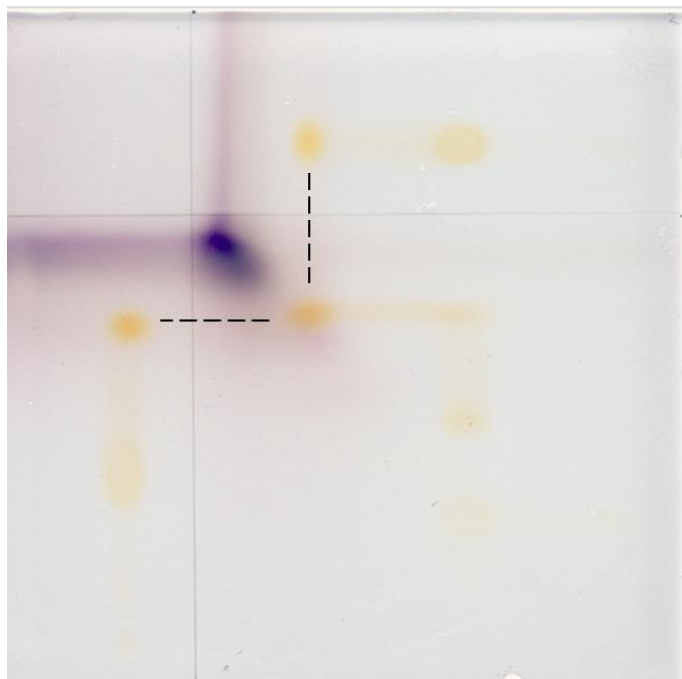
Para la optimización de la fase móvil se estableció adicionar un volumen de ácido fórmico para obtener mejor resolución en los picos post cromatografía. Este ácido se utilizó con la finalidad de mejorar la separación del analito con las otras moléculas presentes en las mieles.

#### **4.2 Validación de la metodología de cuantificación de MGO en mieles de abejas sin aguijón mediante HPTLC**

A continuación, se muestran los valores obtenidos de la validación de la metodología propuesta en condiciones estándar de HPTLC, teniendo en cuenta los procedimientos establecidos por el ICH Guidelines.

#### 4.2.1 *Estabilidad del analito*

En la Figura 8 se muestran los resultados de la prueba realizada para determinar la estabilidad de la 2-metilquinoxalina, la cual es una molécula producto de la reacción del metilglioxal y 1,2-fenilendiamina. La muestra fue sembrada teniendo en cuenta la Figura 6 en una placa de 2 dimensiones en condiciones estándar de HPTLC.



**Figura 8**

*Prueba de estabilidad en 2 dimensiones para 2-metilquinoxalina en luz visible*

Se observa que no existe degradación del analito bajo las condiciones de ensayo, lo cual se evidencia a través del ángulo recto que se forma entre las diferentes aplicaciones de la solución estándar. Además, la cantidad observable de la molécula permanece constante en todos los puntos aplicados de la placa.

#### 4.2.2 Parámetros de desempeño

Los parámetros de desempeño obtenidos teniendo en cuenta el plan de validación establecido, se encuentran plasmados en la Tabla 3, el cual muestra los valores alcanzados para los indicadores de linealidad, límite de detección y cuantificación, ámbito y especificidad.

**Tabla 3**

*Validación del método de cuantificación de MGO en mieles de meliponinos mediante HPTLC*

Parámetro	Valor
Linealidad	$y = \frac{3.956 \times 10^{-1} x}{1.653 \times 10^{-7} + x} + 3.2.2 \times 10^{-2}$ CV= 0.24% R= 0.999980
Límite de detección	1.3 pg en placa.
Límite de cuantificación	353 µg en placa.
Ámbito	272 pg a 353 µg en placa.
Especificidad	Rf para MGO en miel de <i>T. angustula</i> : $0.851 \pm 0.002$ . Rf para impurezas cercanas al MGO en miel de <i>T. angustula</i> : $0.027 \pm 0.001$ . Rf para MGO (estándar): $0.854 \pm 0.001$ . No se reportan impurezas cercanas al estándar. Rf para MGO en miel de <i>M. beecheii</i> : $0.860 \pm 0.007$ . Rf para impurezas cercanas al MGO en miel de <i>M. beecheii</i> : $0.022 \pm 0.001$ .

Para evaluar la repetitividad se consideraron tres soluciones con diferentes concentraciones. La prueba se interpretó considerando la concentración experimental obtenida en las soluciones evaluadas, los mismos se encuentran en la Tabla 4.

**Tabla 4***Repetitividad del método establecido*

<b>Solución</b>	<b>Cn. teórica (<math>\mu\text{g} / \text{mL}</math>)</b>	<b>Cn. experimental (<math>\mu\text{g} / \text{mL}</math>)</b>	<b>SD (<math>\mu\text{g} / \text{mL}</math>)</b>	<b>CV (%)</b>
A	32	24	0.48	2.47
B	63	59	1.47	3.05
C	126	109 $\pm$	4.37	4.94

*Nota:* El porcentaje de recuperación de la solución estándar de MGO fue de 94%.

En la Tabla 5 se observan los resultados obtenidos respecto a la medición de la exactitud del método establecido, el cual presentó un CV de 0.83%.

**Tabla 5***Pruebas de exactitud del método establecido*

<b>Cn. de M (<math>\mu\text{g} / \text{mL}</math>)</b>	<b>Cn. Teórica (<math>\mu\text{g} / \text{mL}</math>)</b>	<b>Valor Exp. M+A (<math>\mu\text{g} / \text{mL}</math>)</b>	<b>Diferencia entre Cn. Teórica y Valor Exp.</b>	<b>% de Recuperación</b>	<b>SD (%)</b>	
31.5	63	53.32	21.82	69	5	
		54.57	23.07	73		
		56.77	25.27	80		
	78.75	78.75	75.16	27.91	59	4
			76.16	28.91	61	
			79.17	31.92	68	
	94.5	94.5	86.25	23.25	37	5
			80.52	17.52	28	

*Nota:* El porcentaje de recuperación de la solución estándar de MGO fue de 91%.

Para el establecimiento de un método analítico nuevo, como es el caso de cuantificar metilglioxal en mieles de abejas sin aguijón mediante HPTLC; los resultados que se obtienen en dichas mediciones deben de ser fidedignas, lo cual solo se logra con la validación del método.

Entre las ventajas de que este método se encuentre validado, se puede mencionar la robustez del proceso de cuantificación garantizando las mediciones precisas del analito, así como el cumplimiento de las regulaciones y normativas. Así mismo, una técnica validada es sinónimo de obtención de datos confiables y de calidad. En el contexto de este trabajo, permite obtener valores exactos del compuesto analizado (Ermer & Miller, 2005; Reich & Schibli, 2007; Renger et al., 2011; Spangenberg et al., 2014).

#### **4.3 Evaluación de la presencia y cuantificación del contenido de MGO por HPTLC en muestras de mieles de abejas sin aguijón**

Para llevar a cabo la cuantificación de las muestras se trabajó en condiciones SOP y se aplicó la técnica de adición de estándar, por lo tanto, valores menores a  $63 \mu\text{g} / \text{mL}$  se indican como ND. Así mismo, para una mejor interpretación de los valores de MGO en las mieles analizadas se reportó la cantidad del analito en mg por Kg de miel de meliponinos (Burholt et al., 2022).

Los valores de MGO en miel de Manuka reportados por Burholt et al. (2022) se encuentran en un ámbito de 50.0 a 600.0 mg / Kg. En este contexto, durante el desarrollo del trabajo se evaluó el contenido de MGO presente en la miel de Manuka realizando la metodología planteada por el mismo autor, el cual dio un valor de 63.4 mg de MGO / Kg de miel. Se utilizó únicamente esta metodología y no la propuesta en este trabajo, debido a la cantidad limitada de muestra de miel y columnas de SPE durante el proceso experimental.

Mediante la metodología propuesta en este trabajo, se reporta por primera vez la presencia de metilglioxal en muestras de mieles de *T. angustula* y *M. beecheii* procedentes de Costa Rica.

La Tabla 6 expone los valores reportados sobre la cantidad de mg de MGO por Kg de miel de *T. angustula*.

**Tabla 6**

*Resultados obtenidos en muestras de mieles de T. angustula con un CV de 0.50%*

ID Muestra	Valor reportado (mg de MGO / Kg de miel)
TA01	ND
TA05	33.7
TA06	64.4
TA07	91.4
TA08	128.9
TA09	141.8
TA010	20.9
TA011	131.2
TA013	ND
TA023	ND

La Tabla 6 indica que de las muestras de miel de *T. angustula* analizadas, el 70% presentaron cantidades cuantificables de MGO con una media de 63.13 mg MGO / Kg miel y una mediana de 49.05 mg MGO / Kg miel. Así mismo, el 50% de las muestras positivas mostraron valores iguales o mayores a la cantidad de MGO en la miel de Manuka analizada en este trabajo.

En la Tabla 7 se presentan los valores reportados de MGO en muestras de miel de *M. beecheii*.

**Tabla 7**

*Resultados obtenidos en muestras de mieles de M. beecheii con un CV de 0.98%*

<b>ID Muestra</b>	<b>Valor reportado (mg de MGO / Kg de miel)</b>
MB01	ND
MB02	ND
MB03	ND
MB04	13
MB05	36.6
MB08	112.4
MB09	36
MB010	5.9
MB011	ND
MB012	206.5

De acuerdo con los resultados de la cuantificación de MGO en muestras de miel de *M. beecheii*, el 60% de ellas contiene cantidades detectables del analito con una media de 40.64 mg MGO / Kg miel y una mediana de 24.5 mg MGO / Kg miel. Además, el 20% de las muestras positivas presentaron valores mayores a la cantidad de MGO en la miel de Manuka analizada en este trabajo.

La miel ha sido utilizada como medicina natural debido a sus diversas propiedades antimicrobianas y cicatrizantes en el tratamiento de las heridas. La alta osmolaridad, la acidez y el contenido de peróxido de hidrogeno, son características propias de la miel, las cuales les confieren dichas propiedades (Ramos et al., 2017). Las características físicas y químicas de la miel pueden estar relacionadas con las fuentes botánicas de donde las abejas recolectan el néctar, así como también, la época de cosecha, la ubicación geográfica y las condiciones de

almacenamiento influyendo así en las propiedades antimicrobianas y cicatrizantes de las mismas (Gil, 2021; Ramírez, 2022; Campo e Hincapié, 2023).

Siguiendo este orden de ideas, la miel de Manuka proviene del néctar de las flores del arbusto *Leptospermum scoparium* perteneciente a la familia de las Mirtáceas, la cual se encuentra distribuida en toda Nueva Zelanda, es la más reconocida en el área medicinal debido a los diversos estudios realizados relacionados a las curaciones de heridas y a las propiedades antimicrobianas de la misma. La razón por la cual, esta miel se la considera de grado médico es por su alto contenido de Metilglioxal, sus propiedades antiinflamatorias, su capacidad de nivelar el pH de la zona afectada y la regulación de las enzimas capaces de descomponer las proteínas conocidas como metaloproteasas (Johnston et al., 2018; Gil, 2021; Burholt et al., 2022).

Sin embargo, para el caso de las abejas nativas sin aguijón, Zamora et al. (2014) reportan que la miel es considerada como monofloral ya que los análisis melisopalinológicos indican un comportamiento de recolección de fuentes botánicas homogéneas, es decir presentan un néctar predominante. Así mismo Fallas (2009) añade que los principales recursos florales presentes en la miel de las especies de *T. angustula* y *M. beecheii* pertenecen a las familias Anacardiaceae y Cyperaceae.

Por esta razón es importante considerar el origen botánico de las mieles de las abejas sin aguijón ya que este factor en combinación a los aspectos mencionados anteriormente, tales como la época de cosecha, la ubicación geográfica y las condiciones de almacenamiento, pueden influir en la cantidad de MGO presente y por ende en su potencial antimicrobiano.

Así mismo, no todas las muestras de miel analizadas contienen MGO y las cantidades presentes de este compuesto varían considerablemente entre las muestras de cada especie, incluso entre mieles de diferentes edades. Por ejemplo, algunas mieles más antiguas exhiben

valores similares a los encontrados en muestras de miel recientemente cosechadas, como se evidencia en las muestras TA08, TA09 y TA010 para las mieles de *T. angustula* y para el caso de las mieles de *M. beecheii*, las muestras MB08 y MB012. Esta variabilidad sugiere que puede haber otros compuestos o factores externos que influyen en las propiedades utilizadas con fines medicinales puesto que estas mieles también son efectivas para inhibir el crecimiento de las bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermis* y *Listeria monocytogenes* (Fallas, 2009).

## 5. Conclusiones

Se logró establecer un método en cromatografía en capa fina de alto desempeño (HPTLC) para cuantificar metilglioxal en mieles de abejas sin aguijón. No obstante, es importante destacar que las muestras analizadas debían someterse a un proceso de extracción en fase sólida posterior a la reacción de 1,2-fenilendiamina. Este procedimiento permitió obtener resultados sin la interferencia de azúcares, proteínas y agua. Dada la naturaleza de los componentes químicos presentes en las mieles de los meliponinos, fue necesario trabajar con adición de estándar interno en condiciones estándar de HPTLC.

Este fue el primer reporte de la presencia de MGO en mieles de abejas sin aguijón, específicamente en las mieles de las especies de *T. angustula* y *M. beecheii*. Esta molécula puede influir en las propiedades cicatrizantes y antimicrobianas de algunas mieles de meliponinos, brindando una información adicional sobre la composición de estas.

## 6. Recomendaciones

Se recomienda realizar más ensayos con diferentes métodos de separación a fin de obtener un 100% de recuperación del analito presente en las muestras de mieles de ANSAS. Por ejemplo, se podría realizar una SPE previa a la reacción de 1,2-fenilendiamina para eliminar compuestos fenólicos, terpenos, así como ácidos orgánicos y una segunda SPE posterior a la reacción con el objetivo de eliminar las proteínas, azúcares y agua de las muestras.

Se aconseja incluir dentro del análisis, algunas muestras de miel de Manuka empleando la metodología reportada en la literatura y la propuesta en este trabajo a fin de evaluar con propiedad los resultados obtenidos con respecto a la cantidad de MGO en las mismas.

Se sugiere evaluar y cuantificar la presencia de MGO en mieles de diferentes especies de meliponinos.

Llevar a cabo análisis melisopalinológicos en las mieles de abejas sin aguijón para identificar el origen botánico con la finalidad de realizar ensayos orientados a estudiar la posible relación existente entre las fuentes botánicas utilizadas por estas abejas y el contenido de MGO.

## 7. Referencias Bibliográficas

- Ahumada, D., Paredes, C., Abella, J. y González, I. (2023). *Validación de métodos en análisis químico cuantitativo*. Instituto Nacional de Metrología de Colombia. [https://hub.unido.org/sites/default/files/publications/Validacion-de-metodos-en-analisis-quimico-cuantitativo\\_compressed.pdf](https://hub.unido.org/sites/default/files/publications/Validacion-de-metodos-en-analisis-quimico-cuantitativo_compressed.pdf)
- Álvarez, D. (2018). La miel en la cicatrización de las úlceras cutáneas [Tesis de pregrado, Universidad Da Coruña]. Archivo digital. <http://hdl.handle.net/2183/20875>
- Arguedas, M. (2021). Potencial de la miel de *Tetragonisca angustula* y *Scaptotrigona pectoralis* para la formulación de un medicamento antibacteriano y cicatrizante de uso veterinario [Tesis de maestría, Universidad Nacional]. Archivo digital. <http://hdl.handle.net/11056/22219>
- Báez Pérez, E., Quiñones Gálvez, J., Santiesteban Toca, C. y Molina Torres, J. (2017). Sistema de análisis de imágenes de placas de HPTLC. *Revista Cubana de Ciencias Informáticas*, 11(3). 92-104.
- Burholt, M., Oberle, M., Schulz, M. & Bäuml, M. (2022). Quantification of methylglyoxal in Manuka honey – A simple HPTLC bases approach. *Camag Bibliography Service*, 128(1). 2-5.
- Campo, O. I. e Hincapié, G. A. (2023). Factores que determinan las propiedades fisicoquímicas de la miel de abejas: Revisión Sistemática de Literatura. *Mutis*, 13(1). 1-28. <https://doi.org/10.21789/22561498.1851>

- Carmona, I. (2006). Desarrollo y validación de un método de extracción en fase sólida para la determinación de plaguicidas catiónicos (Cuats) en alimentos [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. Archivo digital. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/6922>
- Cokcetin, N. N., Pappalardo, M., Campbell, L., Brooks, P., Carter, D. A., Blair, S. E. & Harry, E. J. (2020). The antibacterial activity of Australian *Leptospermum* Honey correlates with Methylglyoxal levels. *PLoS ONE*, *11*(12). e0167780. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167780>
- Encalada, R. y Orellana, M. (2019). Efectividad de apósitos con miel de abeja en el manejo de heridas crónicas en la mejora de la repitelización del tejido [Tesis de posgrado, Universidad Privada Norbert Wiener]. DSpace. <http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/3416>
- Ermer, J. & Miller, H. (2005). *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*. <https://doi.org/10.1002/3527604685.fmatter>
- Espinoza, C. (2019). Evaluación de la capacidad antioxidante, actividad antimicrobiana y parámetros fisicoquímicos en mieles de *Melipona costaricensis* [Tesis de maestría, Universidad Nacional]. Archivo digital. <http://hdl.handle.net/11056/18254>
- Fallas, N. (2009). Evaluación de la actividad antimicrobiana de mieles de abejas sin aguijón, procedentes de Costa Rica [Tesis de maestría, Universidad Nacional]. Archivo digital.
- Fuentes López, A., Fernández Segovia, I. y Fuentes López, C. (2020). Preparación de muestra mediante la técnica de extracción en fase sólida. <http://hdl.handle.net/10251/145915>

- Gil, M. (2021). Eficacia de la miel de Manuka en las quemaduras de segundo grado tratadas en atención primaria [Tesis de maestría, Universidad de Cantabria]. Archivo digital. <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/22863>
- Hernández Falcón, D., Ledea Lozano, O., Fernández García, L. y González García, E. (2015). Validación de un método cromatográfico para la determinación de cafeína en muestras acuosas de la industria farmacéutica. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(2). 219-231.
- Johnston, M., McBride, M., Dahiya, D., Owusu-Apenten, R. & Singh Nigam, P. (2018). Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview. *AIMS Microbiol*, 4(4). 655–664. <https://doi.org/10.3934%2Fmicrobiol.2018.4.655>
- Peña, A. (2011). Estudio de sistemas de extracción en fase sólida para su aplicación en la determinación del plaguicida dimetoato [Tesis de pregrado, Universidad Politécnica de Valencia]. RiuNet repositorio UPV. <https://riunet.upv.es/handle/10251/12294?show=full>
- Qu, Y., McGriffin, D., Kure, C., McLean, J., Duncan, C. & Peleg, A.Y. (2020). In vitro Evaluation of Medihoney Antibacterial Wound Gel as an Anti-biofilm Agent Against Ventricular Assits Device Driveline Infections. *Frontiers in Microbiology*, 11(605608). 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.605608>
- Ramírez, J. [@abejasmie1]. (2022, 30 de agosto). Ya está el video de las propiedades antimicrobianas de la miel, cuales son y cómo funcionan [Video]. Instagram. <https://www.instagram.com/reel/Ch6IEkLj2wF/?igshid=YmMyMTA2M2Y=>
- Ramos, G., Sánchez, A., Gallaguer, S., Rodríguez, M., Morales, E. y Chan, M. (2017). Presentación de casos clínicos sobre el uso de la miel en el tratamiento de heridas. *Dermatología Cosmética, Medica y Quirúrgica*, 15(4). 265-271.

- Reich, E. & Schibli, A. (2007). High performance thin layer chromatography for the analysis of medicinal plants. Thieme Medical Publishers Inc. New York.
- Renger, B., Végh, Z. & Ferenczi, K. (2011). Validation of thin layer and high performance thin layer chromatographic methods. *Journal of Chromatography A*, 1218(19). 2712-2721.
- Samaniego-Rojas, V. y Campos-Murillo, N. (2022). Comparación de la eficacia entre la miel natural y miel de Manuka en heridas de conejos. *Revista Científica FCV-LUZ*, 32(32145). 1-6. <https://doi.org/10.52973/rcfcv-e32145>
- San José-Rodríguez, J. C. y San José, M. (2015). La miel como antibiótico tópico en las úlceras por presión. Actualización. *Medicina Naturalista*, 9(2). 93-102.
- Sartori A. & Henriques, E. (2010). Metilglioxal: Uma toxina endógena?. *Quim. Nova*, 33(10). 2193-2201. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000032>
- Spangenberg, B., Poole, C. & Weins, C. (2014). *Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey*. Springer Berlín Heidelberg.
- Suárez, M. y Venegas, A. (2016). Método cromatográfico HPTLC para control de fitomedicamentos. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Quito)*, 41(1). 91-102.
- Szczepanik, J. C. (2020). Efeitos do metilglioxal sobre o sistema nervoso: uma investigação neuroquímica e comportamental em camundongos [Tesis de doctorado, Universidade Federal de Santa Catarina]. DSpace. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/216696>
- Umaña, E., Zamora, G., Aguilar, I., Arias, M. L., Pérez, R., Sánchez, L. A., Solórzano, R. & Herrera, E. (2021). Physicochemical differentiation of stingless bee honeys from Costa Rica. *Journal of Apicultural Research*, 1-10. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1903737>

- Zamora, G. y Arias, M. (2011). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Revista Biomédica*, 22(2). 59-66.
- Zamora, G., Beukelmna, L., van den Berg, B., Arias, M., Umaña, E., Aguilar, I., Sánchez, L., Fallas, N. Quarles, L. & Gross, N. (2014). The antimicrobial activity and microbiological safety of stingless bee honeys from Costa Rica. *Journal of Apicultural Research*, 53(5). 503-513. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.5.04>
- Zamora, G., Beukelman, K., van den Berg, A., Arias, M., Umaña, E., Aguilar, I. & Fallas, N. (2015). Stingless bee honeys from Costa Rica exhibit antimicrobial activity against antibiotic-resistant clinical isolates. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 5(2). 144-149. <https://doi.org/10.1080/22311866.2015.1053099>
- Zamora, L. G., Beukelman, C. J., van den Berg, A. J. J., Aerts, P. C., Quarles van Ufford, H. C., Nijland, R. & Arias, M. L. (2017). An insight into the antibiofilm properties of Costa Rican stingless bee honeys. *Journal of Wound Care*, 26(4). 168-177. <https://doi.org/10.12968/jowc.2017.26.4.168>
- Zepeda, R. (2018). 3. Los productos de la colmena: miel, cerumen, polen y propóleo. En N. Arnold, R. Zepeda, M. Vásquez Dávila y M. Aldasoro M. (Eds.). *Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México: con catálogo de especies* (pp. 50-60). El Colegio de la Frontera Sur.

## 8. Anexos

Tabla 8

Identificación de muestras utilizadas

No.	ID Muestra	Especie	Localidad	Fecha
1	TA01	<i>T. angustula</i>	Alajuela, Atenas, Barrio Jesús	02/05/2023
2	TA05	<i>T. angustula</i>	Alajuela, Atenas, Barrio Jesús	02/05/2023
3	TA06	<i>T. angustula</i>	Limón, Guápiles, Ticabán	2016
4	TA07	<i>T. angustula</i>	Guanacaste, Carrillo, Sardinal	27/07/2008
5	TA08	<i>T. angustula</i>	Guanacaste, La Cruz, La Cruz	17/02/2020
6	TA09	<i>T. angustula</i>	Guanacaste, Nicoya, Pedernal	2010
7	TA010	<i>T. angustula</i>	Nicoya	21/05/2015
8	TA011	<i>T. angustula</i>	Puntarenas, Puntarenas, Lepanto, Jicaral, Pilas de Canjel	13/04/2023
9	TA013	<i>T. angustula</i>	Puntarenas, Coto Brus, San Vito	2021
10	TA023	<i>T. angustula</i>	Guanacaste, La Cruz, San Dimas	13/04/2023
11	MB01	<i>M. beecheii</i>	Alajuela, Atenas, Barrio Jesús	02/05/2023
12	MB02	<i>M. beecheii</i>	Alajuela, Atenas, Barrio Jesús	02/05/2023
13	MB03	<i>M. beecheii</i>	Alajuela, Atenas, Barrio Jesús	02/05/2023
14	MB04	<i>M. beecheii</i>	Alajuela, Atenas, Barrio Jesús	02/05/2023
15	MB05	<i>M. beecheii</i>	Alajuela, Atenas, Barrio Jesús	02/05/2023
16	MB08	<i>M. beecheii</i>	Guanacaste, La Cruz, La Cruz	2020
17	MB09	<i>M. beecheii</i>	Alajuela, Atenas, Barrio Jesús	10/05/2023
18	MB010	<i>M. beecheii</i>	Guanacaste, La Cruz, San Dimas	13/04/2023
19	MB011	<i>M. beecheii</i>	Guanacaste, La Cruz, San Dimas	13/04/2023
20	MB012	<i>M. beecheii</i>	Guanacaste, La Cruz, San Dimas	13/04/2023
21	MDHY	<i>A. mellifera</i>	Medihoney®	2011

**Tabla 9**

Valores obtenidos de MGO mediante HPTLC en condición estándar

<b>ID Muestra</b>	<b>Especie</b>	<b>R1 (µg / mL)</b>	<b>R2 (µg / mL)</b>	<b>Promedio (µg / mL)</b>	<b>Corrección por % de recuperación</b>	<b>Cantidad de MGO (µg / mL)</b>
TA01	<i>T. angustula</i>	54.47	50.08	52.28	62.74	ND
<b>TA05</b>	<i>T. angustula</i>	56.38	54.18	55.28	66.37	3.37
<b>TA06</b>	<i>T. angustula</i>	60.22	55.40	57.87	69.44	6.44
<b>TA07</b>	<i>T. angustula</i>	60.80	59.44	60.12	72.14	9.14
<b>TA08</b>	<i>T. angustula</i>	63.48	62.98	63.23	75.89	12.89
<b>TA09</b>	<i>T. angustula</i>	64.84	63.79	64.32	77.18	14.18
<b>TA010</b>	<i>T. angustula</i>	56.86	51.61	54.24	65.09	2.09
<b>TA011</b>	<i>T. angustula</i>	61.11	65.74	63.43	76.12	13.12
TA013	<i>T. angustula</i>	51.25	45.77	48.51	58.21	ND
TA023	<i>T. angustula</i>	48.21	41.85	45.08	54.10	ND
MB01	<i>M. beecheii</i>	36.59	39.47	38.03	45.64	ND
MB02	<i>M. beecheii</i>	44.95	47.08	46.02	55.22	ND
MB03	<i>M. beecheii</i>	52.33	51.52	51.93	62.32	ND
<b>MB04</b>	<i>M. beecheii</i>	54.32	52.83	53.58	64.30	1.3
<b>MB05</b>	<i>M. beecheii</i>	56.20	54.90	55.55	66.66	3.66
<b>MB08</b>	<i>M. beecheii</i>	62.03	61.71	61.87	74.24	11.24
<b>MB09</b>	<i>M. beecheii</i>	53.37	57.63	55.5	66.6	3.6
<b>MB010</b>	<i>M. beecheii</i>	51.47	56.50	52.99	63.59	0.59
MB011	<i>M. beecheii</i>	48.83	53.04	50.94	61.14	ND
<b>MB012</b>	<i>M. beecheii</i>	70.58	68.83	69.71	83.65	20.65
MDHY	<i>A. mellifera</i>	9.28	3.39	6.34	-	6.34

Nota: Valores inferiores a 63 µg / mL se reportan como ND en mieles de meliponinos.

**Reporte de análisis de cuantificación de MGO en mieles de abejas sin aguijón**

# Analysis: MGO STAND 29 20092023


Path: Home/MGO Carmen

Based on method: MGO QUANT 2

Created	20-Sep-2023 15:30:14	visionCATSuser
Modified	22-Sep-2023 11:57:53	visionCATSuser
Last HPTLC log	22-Sep-2023 13:35:51	File copied to '/MGO Carmen/MGO STAND 30 27092023'
Explorer notes		

Track	Vial ID	Description	Volume	Position	Type
1	TA 01	TA SPE + 63 ng MGO	1.0 µl	A1	Sample
2	TA 05	TA SPE + 63 ng MGO	1.0 µl	A2	Sample
3	TA 06	TA SPE + 63 ng MGO	1.0 µl	A3	Sample
4	TA 07	TA SPE + 63 ng MGO	1.0 µl	A4	Sample
5	TA 08	TA SPE + 63 ng MGO	2.0 µl	A5	Sample
6	TA 09	TA SPE + 63 ng MGO	1.0 µl	A6	Sample
7	MGO 126 microg / mL	38 ng MGO	0.3 µl	B1	Reference
8	MGO 126 microg / mL	63 ng MGO	0.5 µl	B1	Reference
9	MGO 126 microg / mL	126 ng MGO	1.0 µl	B1	Reference
10	MGO 126 microg / mL	252 ng MGO	2.0 µl	B1	Reference
11	MGO 126 microg / mL	378 ng MGO	3.0 µl	B1	Reference
12	MDHY	MEDIHONEY SIN SPE	1.0 µl	B2	Sample
13	TA 010	TA SPE + 63 ng MGO	1.0 µl	A7	Sample
14	TA 013	TA SPE + 63 ng MGO	1.0 µl	A8	Sample
15	TA 023	TA SPE + 63 ng MGO	1.0 µl	A9	Sample

Sequence table notes

A track marked with  means: the application type is overridden in some evaluation(s).

## System setup:

Software	Server FreakBeast, version 2.5.18072.1
ADC2	S/N:241249
ATS4	S/N:220427
Derivatizer	N/A
Scanner4	S/N:241068
Visualizer	S/N:150919

## Chromatography

### Plate layout:

Stationary phase	Merck, HPTLC plates silica gel 60 F 254
Plate format	200.0 x 100.0 mm
Application type	Band
Application	Position Y: 8.0 mm, length: 8.0 mm, width: 0.0 mm
Track	First position X: 20.0 mm, distance: 11.4 mm
Solvent front position	70.0 mm
Notes	

**Take image clean plate 1a - Visualizer (S/N: 150919):**

Quality	Enhanced
RT White	auto capture, Auto, level 85 %, Band
R 254	auto capture, Auto, level 85 %, Band
Instrument diagnostics	Valid diagnostics
Documentation step label	
Notes	

**Application 1 - ATS 4 (S/N: 220427):**

Spray gas	NI
Sample solvent type	Water
Filling speed	8 µl/s
Predosage volume	200 nl
Retraction volume	200 nl
Dosage speed	50 nl/s
Filling quality	Standard
Rinsing cycles / vacuum	1 / 8 s
Filling cycles / vacuum	1 / 8 s
Rinsing solvent name	Methanol
Nozzle temperature	Unheated
Rack in use	Standard
Instrument diagnostics	⚠ No valid diagnostics
Notes	

**Development 1 - ADC 2 (S/N: 241249):**

Development type	Unsaturated
Saturation	OFF
Activation	OFF
Drying	ON: 5 min, without pre drying
Preconditioning	OFF
Mobile phase	Ethylacetate, Acetonitrile, Formic Acid (84.5 : 14.5: 1) 10 ml
Instrument diagnostics	Valid diagnostics
Notes	

**Take image developed plate 1a - Visualizer (S/N: 150919):**

Quality	Enhanced
RT White	auto capture, Auto, level 85 %, Band
R 254	auto capture, Auto, level 85 %, Band
R 366	auto capture, Auto, level 85 %, Band
Instrument diagnostics	Valid diagnostics
Documentation step label	
Notes	

**Scan developed plate 1b - Scanner 4 (S/N: 241068):**

Scanner type	Single $\lambda$
Optimization for	Resolution
Measurement mode	Absorption
Filter	n/a
Detector mode	Automatic
Scanning speed	20 mm/s
Data resolution	100 $\mu\text{m}/\text{step}$
Slit	5 x 0.2 mm, micro
Partial scan	No
Lamp	Deuterium & Tungsten
Wavelength(s)	254 nm
Instrument diagnostics	Valid diagnostics
Documentation step label	
Notes	

### Scan developed plate 1c - Scanner 4 (S/N: 241068):

Scanner type	Single $\lambda$
Optimization for	Resolution
Measurement mode	Absorption
Filter	n/a
Detector mode	Automatic
Scanning speed	20 mm/s
Data resolution	100 $\mu\text{m}/\text{step}$
Slit	5 x 0.2 mm, micro
Partial scan	No
Lamp	Deuterium & Tungsten
Wavelength(s)	239 nm
Instrument diagnostics	Valid diagnostics
Documentation step label	
Notes	

### Derivatization 1 - Derivatizer:

Reagent name	ANIS
Reagent volume	2.0 ml
Reagent preparation	
Nozzle	blue
Level	3
Heating	100 °C for 3 min, heated after
Notes	

### Take image derivatized plate 1a - Visualizer (S/N: 150919):

Quality	Enhanced
RT White	auto capture, Auto, level 85 %, Band
R 366	auto capture, Auto, level 85 %, Band
Instrument diagnostics	Valid diagnostics
Documentation step label	
Notes	

### Scan derivatized plate 1b - Scanner 4 (S/N: 241068):

MGO STAND 29 20092023

visionCATS

Scanner type	Single $\lambda$
Optimization for	Resolution
Measurement mode	Absorption
Filter	n/a
Detector mode	Automatic
Scanning speed	20 mm/s
Data resolution	100 $\mu\text{m}/\text{step}$
Slit	5 x 0.2 mm, micro
Partial scan	No
Lamp	Deuterium & Tungsten
Wavelength(s)	480 nm
Instrument diagnostics	Valid diagnostics
Documentation step label	
Notes	

## System suitability tests:

### SST settings:

SST tracks	
------------	--

## Data acquisition

### Application 1 - ATS 4 (S/N: 220427):

Executed	20-Sep-2023 17:15:49 visionCATSuser
----------	-------------------------------------

### Development 1 - ADC 2 (S/N: 241249):

Executed	20-Sep-2023 17:59:59 visionCATSuser
Migration distance	70 mm
Development time	24 min 10 s
Total action time	30 min 26 s
Start temperature	25 °C
End temperature	25 °C
Start humidity	71 %
End humidity	71 %

### Take image developed plate 1a - Visualizer (S/N: 150919):

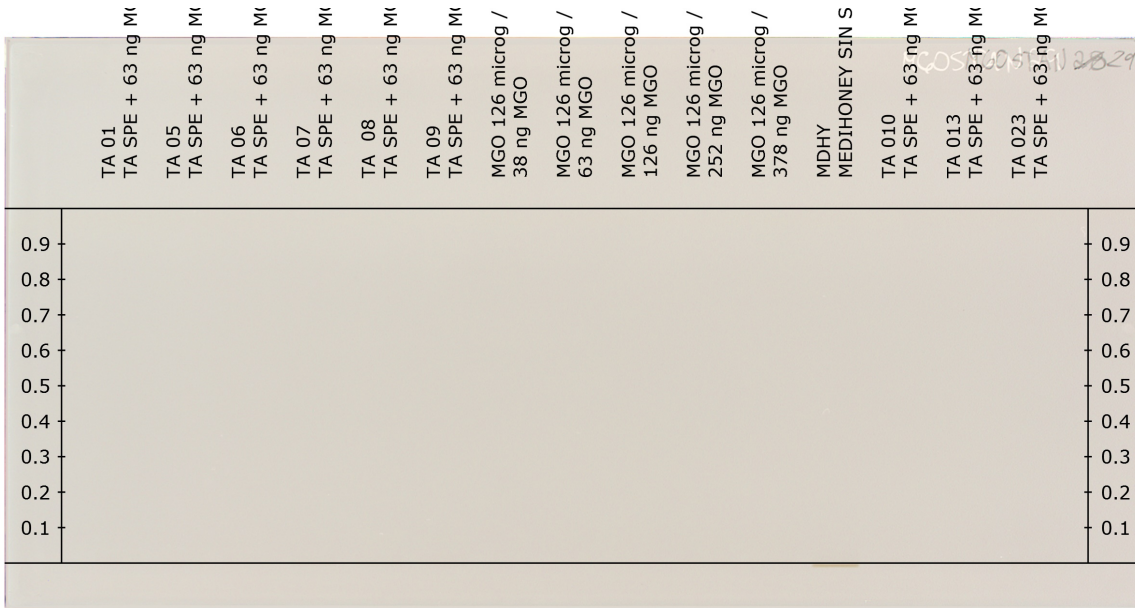
Executed	20-Sep-2023 18:33:36 visionCATSuser
----------	-------------------------------------

MGO STAND 29 20092023

visionCATS

RT White

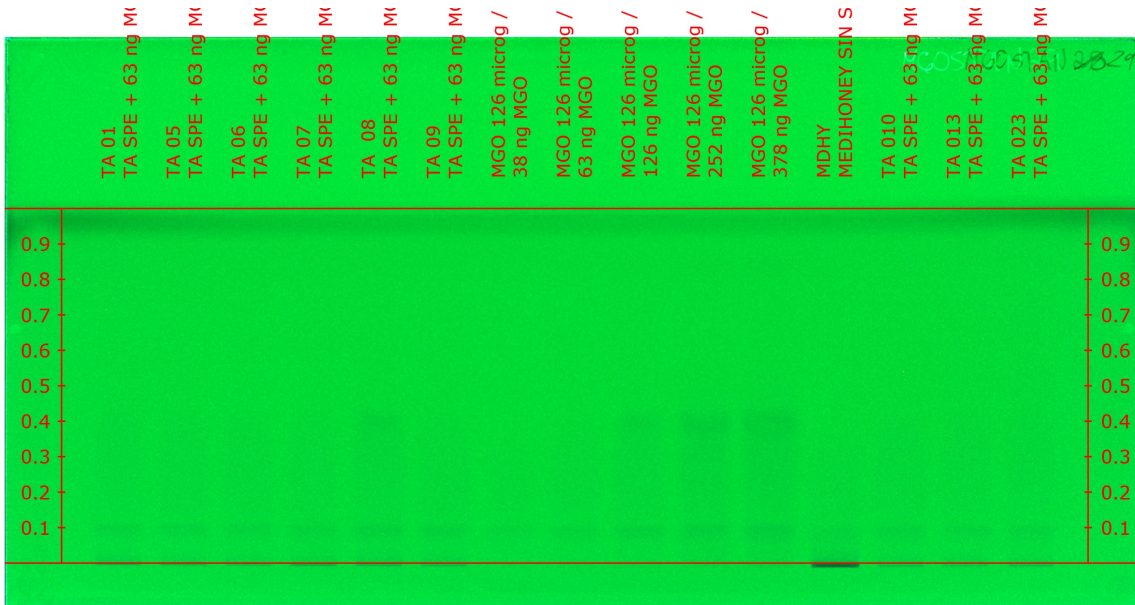
Developed, RemTransVis



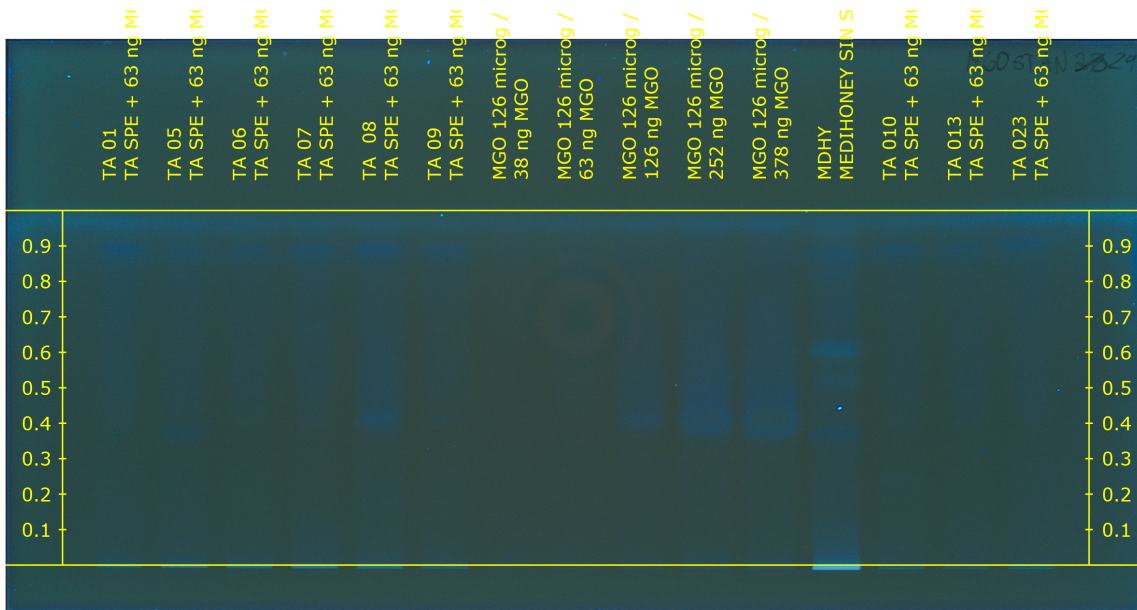
Exposure	0.064 s
Contrast	1
Normalized exposure	Disabled
Clarify	Disabled
White balance	1.00, 1.00, 1.00

R 254

Developed, Remission254



Exposure	0.208 s
Contrast	1
Normalized exposure	Disabled
Clarify	Disabled
White balance	1.00, 1.00, 1.00



Exposure	5.092 s
Contrast	1
Normalized exposure	Disabled
Clarify	Disabled
White balance	1.00, 1.00, 1.00

## Scan developed plate 1b - Scanner 4 (S/N: 241068):

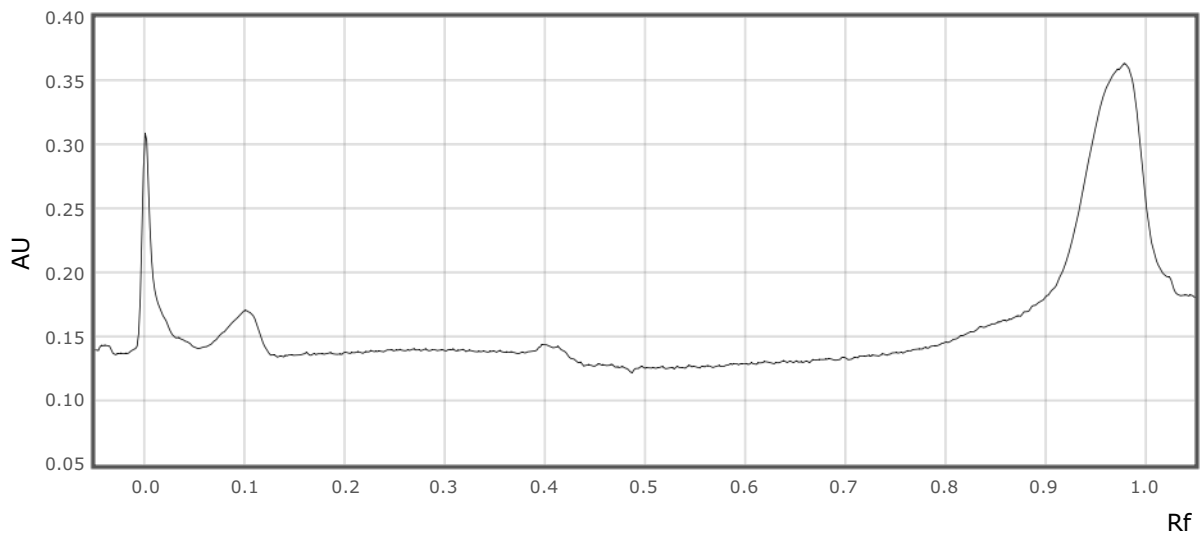
Executed	20-Sep-2023 18:35:13 visionCATSuser
----------	-------------------------------------

### Scan:

Wavelength	254 nm
------------	--------

### Track 1:

Type	Single $\lambda$
------	------------------

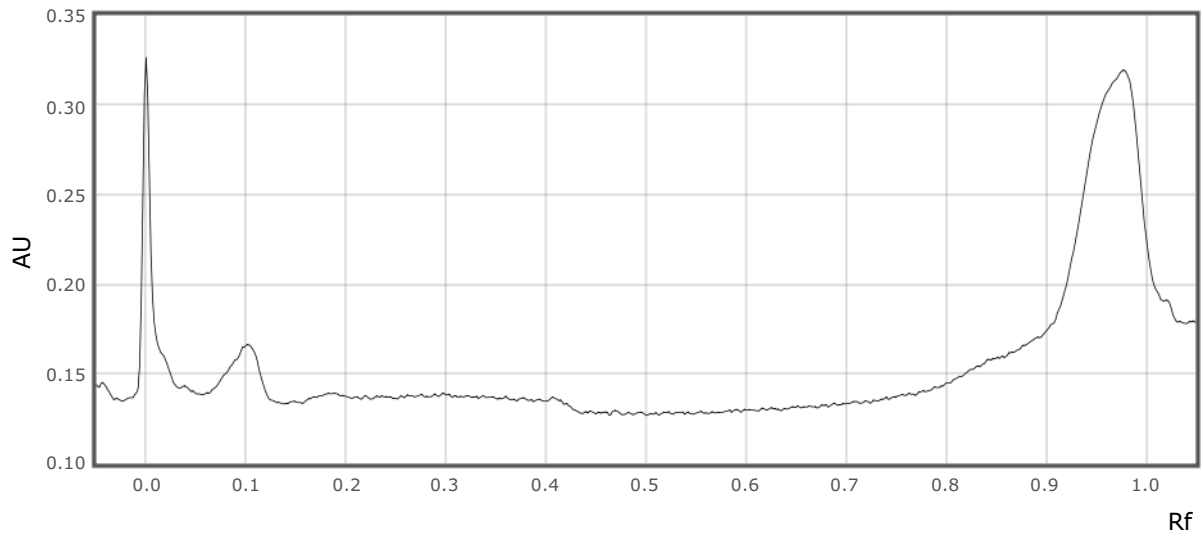


### Track 2:

Type	Single $\lambda$
------	------------------

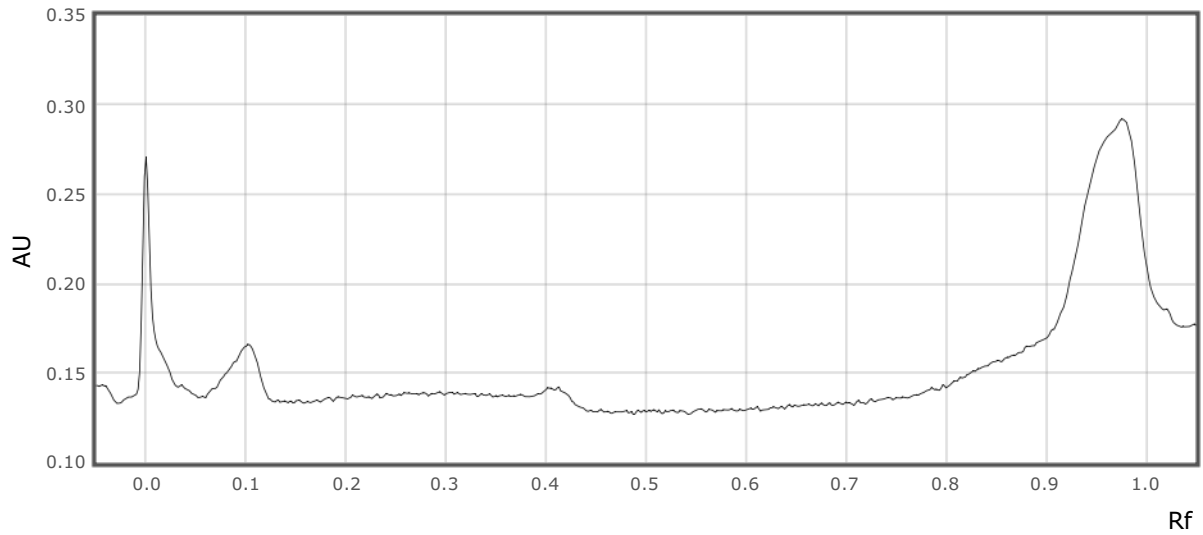
MGO STAND 29 20092023

visionCATS



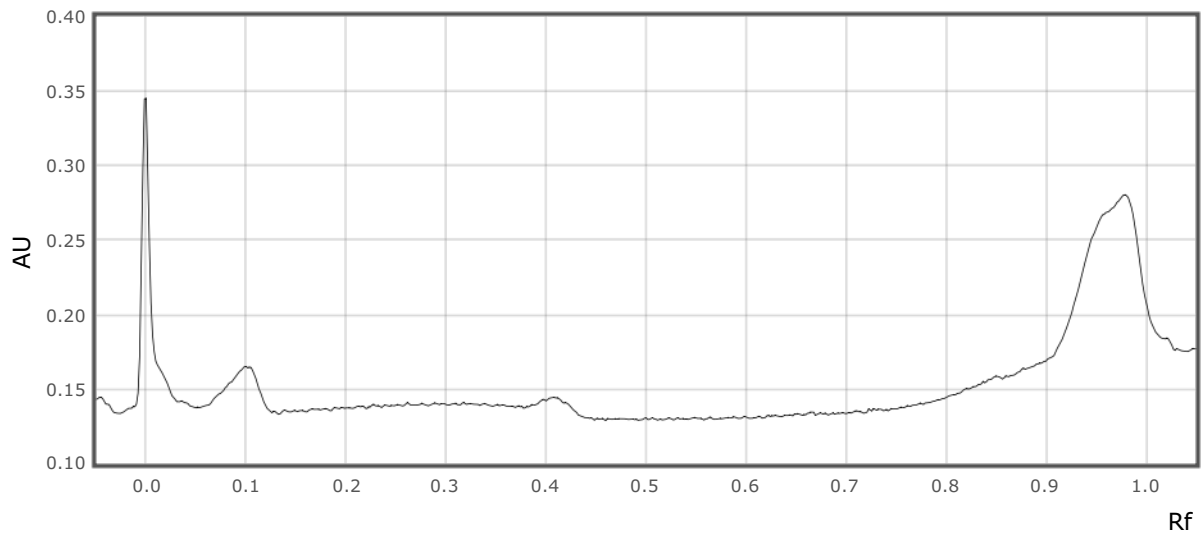
Track 3:

Type Single  $\lambda$



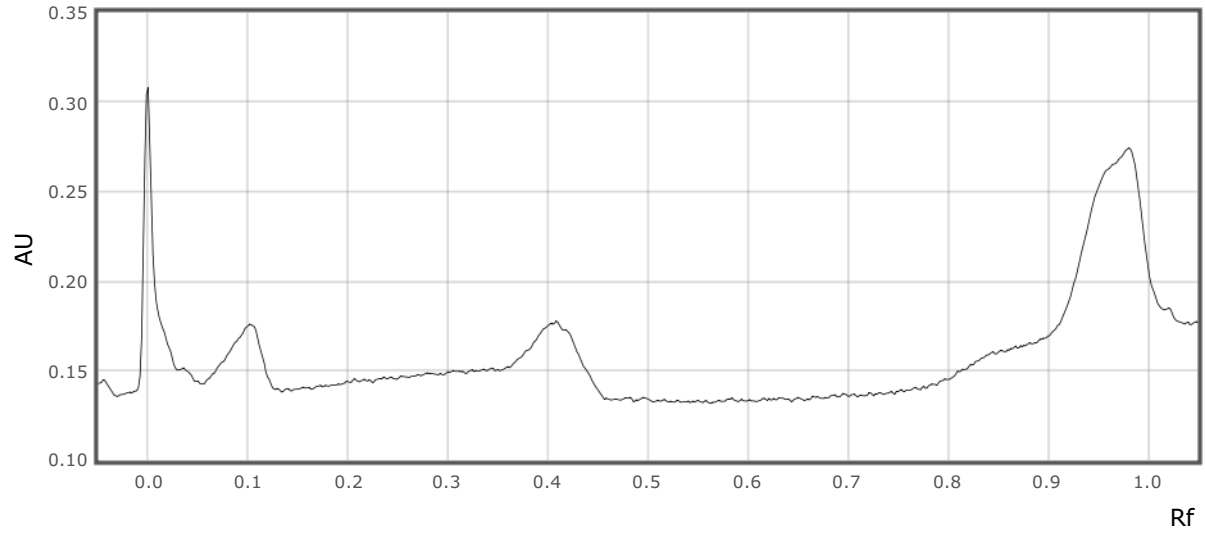
Track 4:

Type Single  $\lambda$



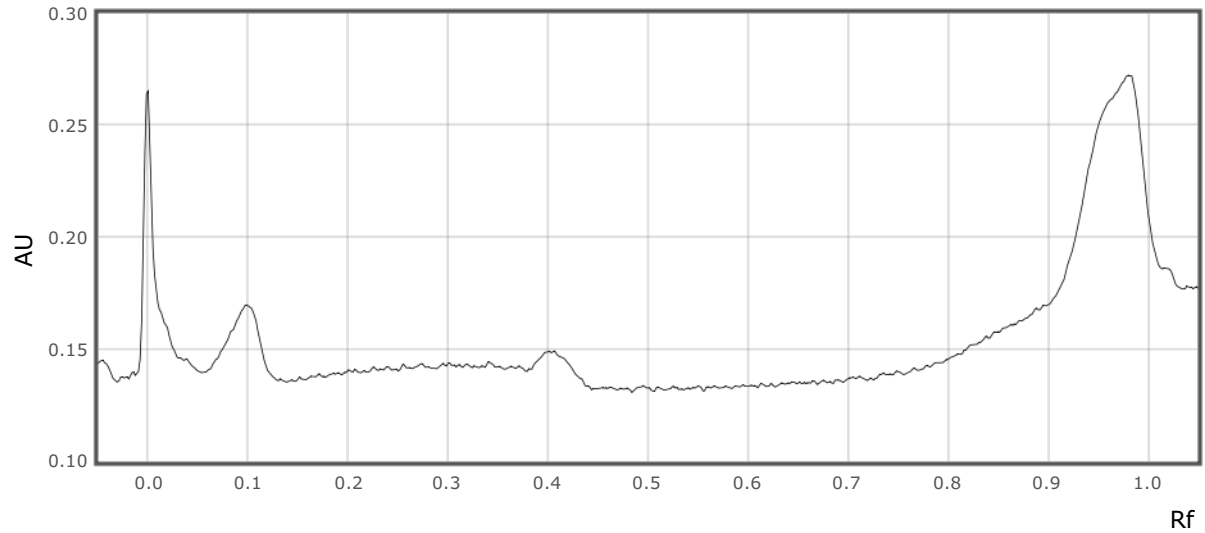
Track 5:

Type Single  $\lambda$



Track 6:

Type Single  $\lambda$

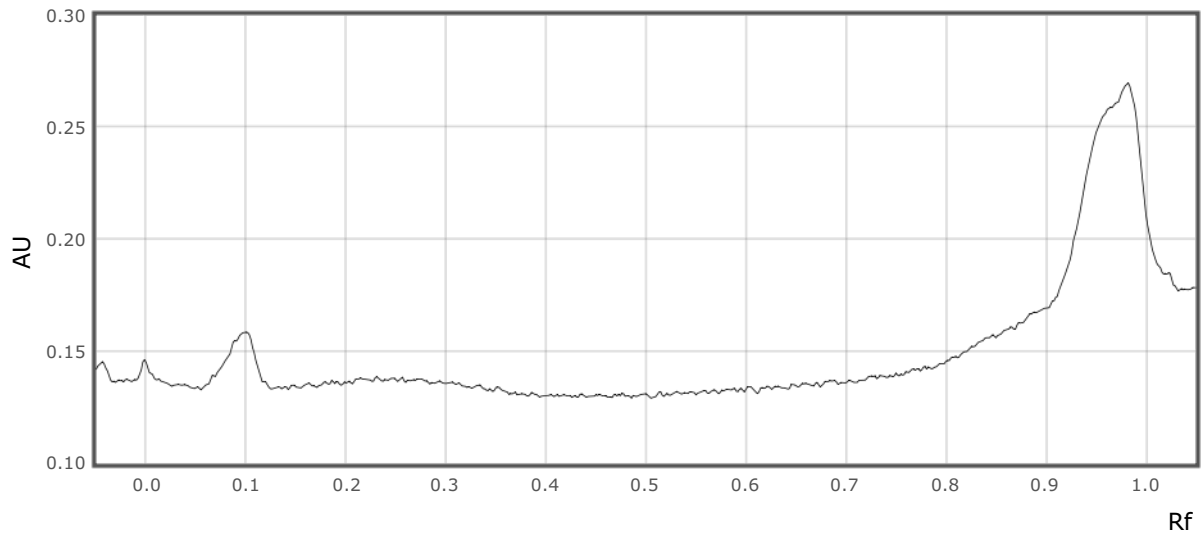


Track 7:

Type Single  $\lambda$

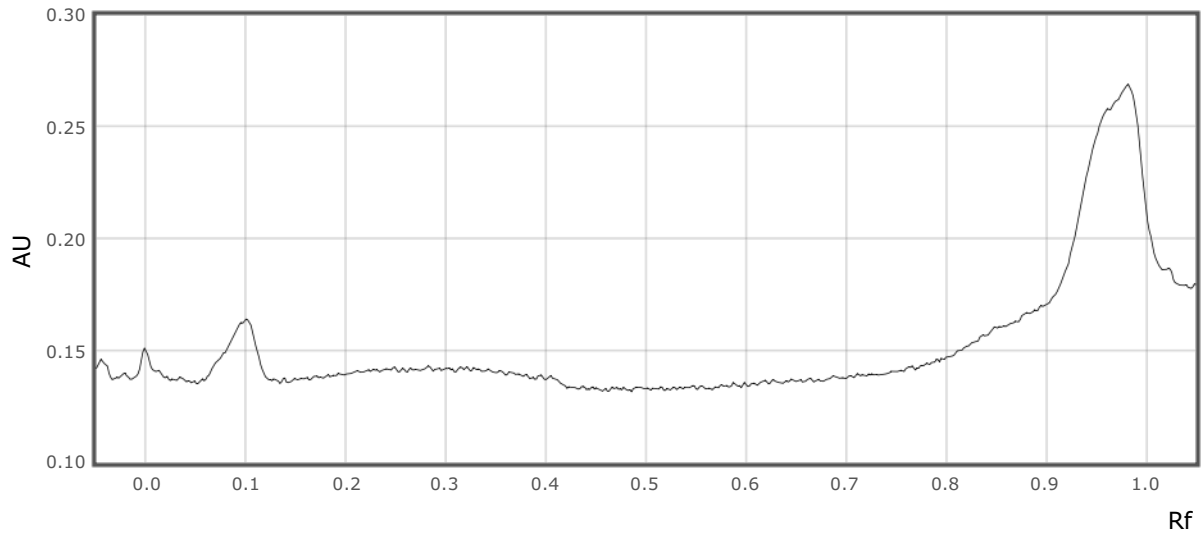
MGO STAND 29 20092023

visionCATS



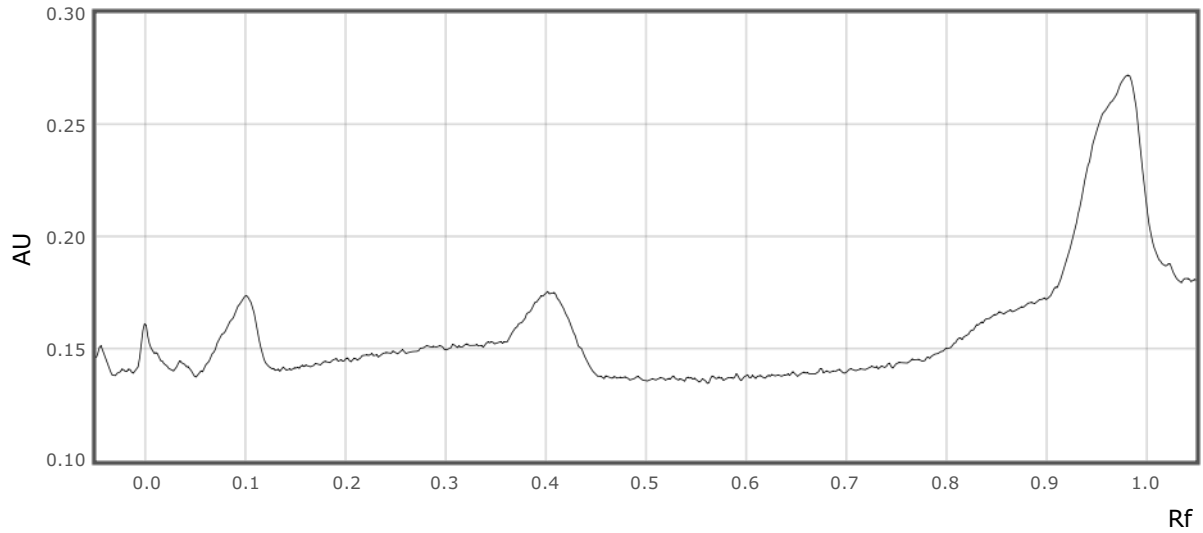
Track 8:

Type Single  $\lambda$



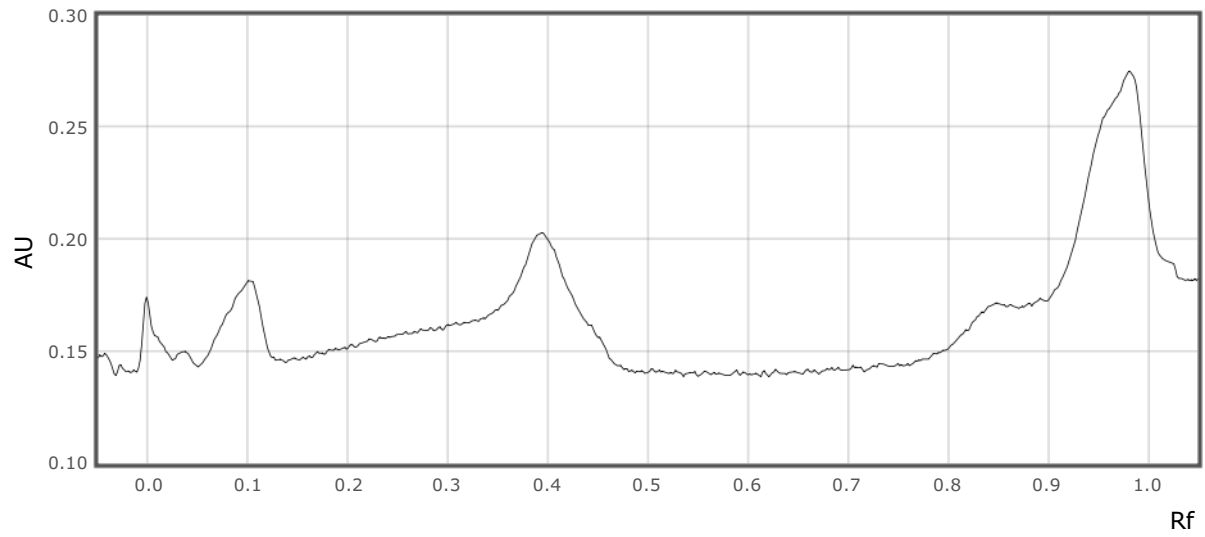
Track 9:

Type Single  $\lambda$



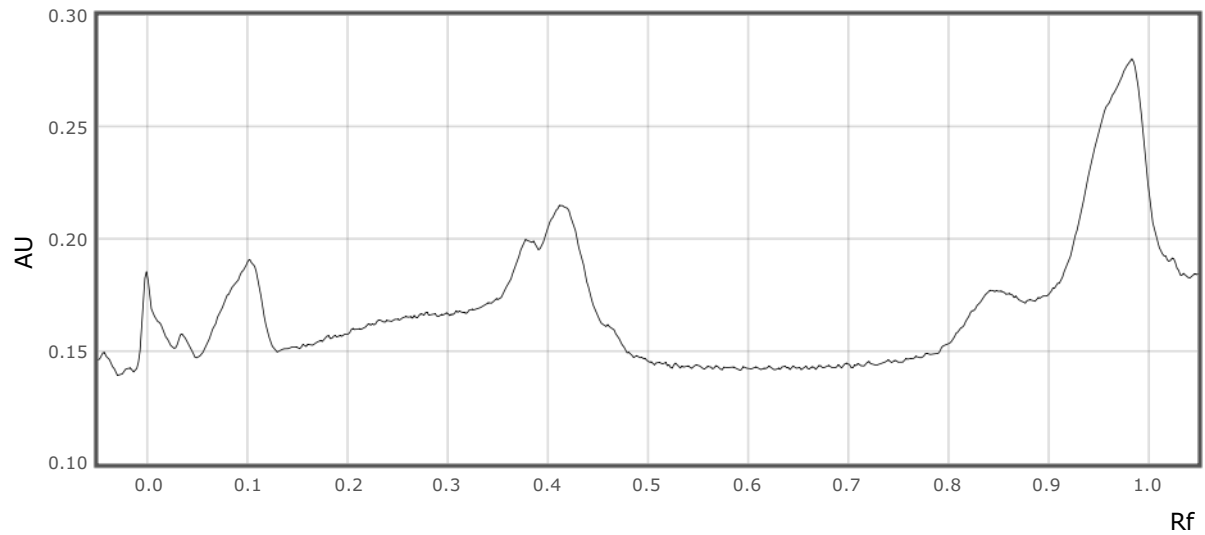
Track 10:

Type Single  $\lambda$



Track 11:

Type Single  $\lambda$

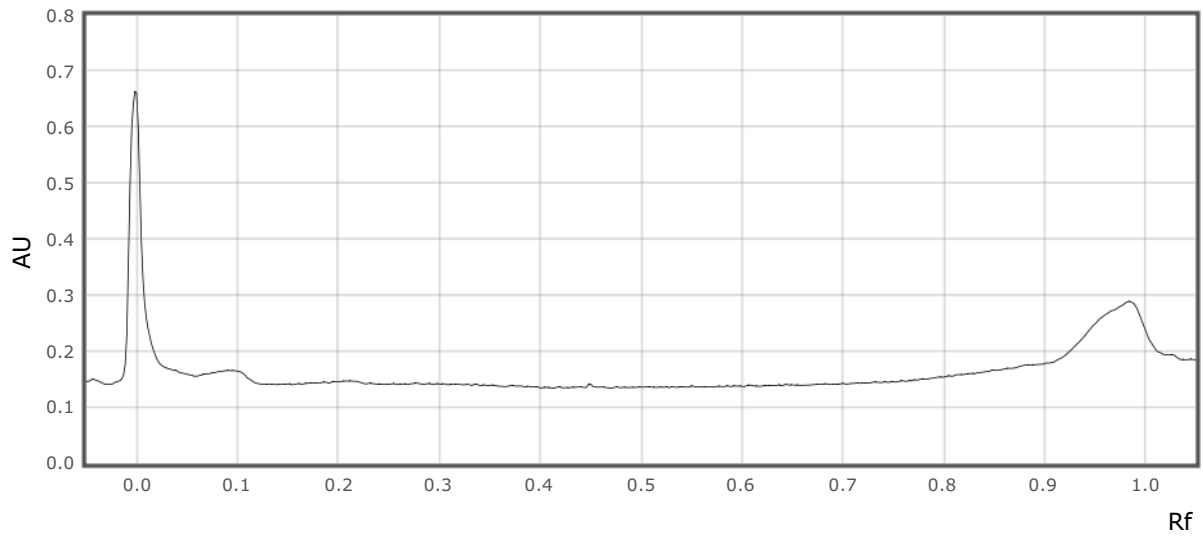


Track 12:

Type Single  $\lambda$

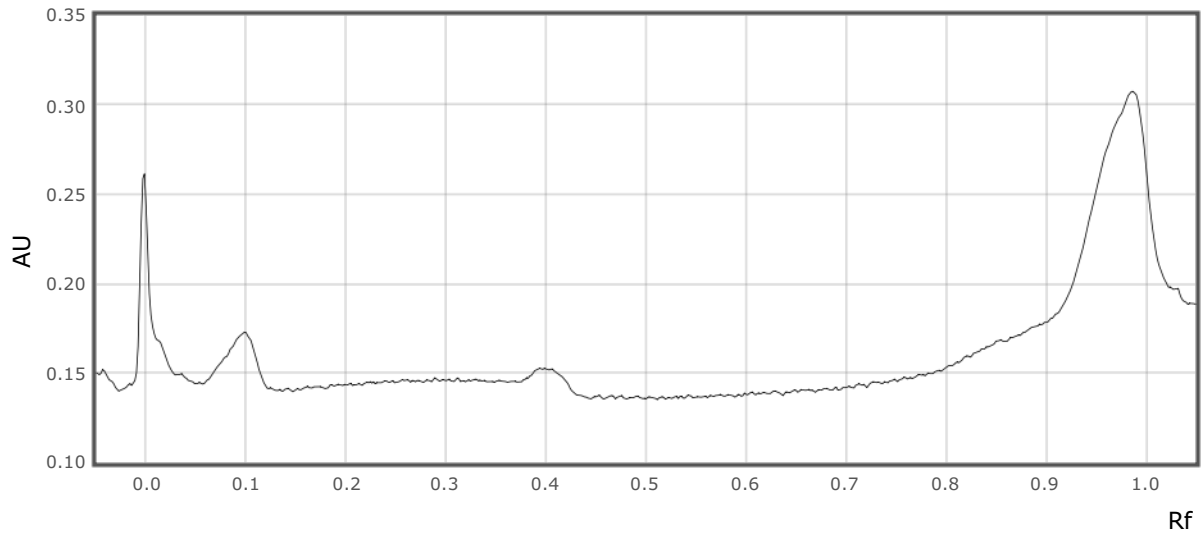
MGO STAND 29 20092023

visionCATS



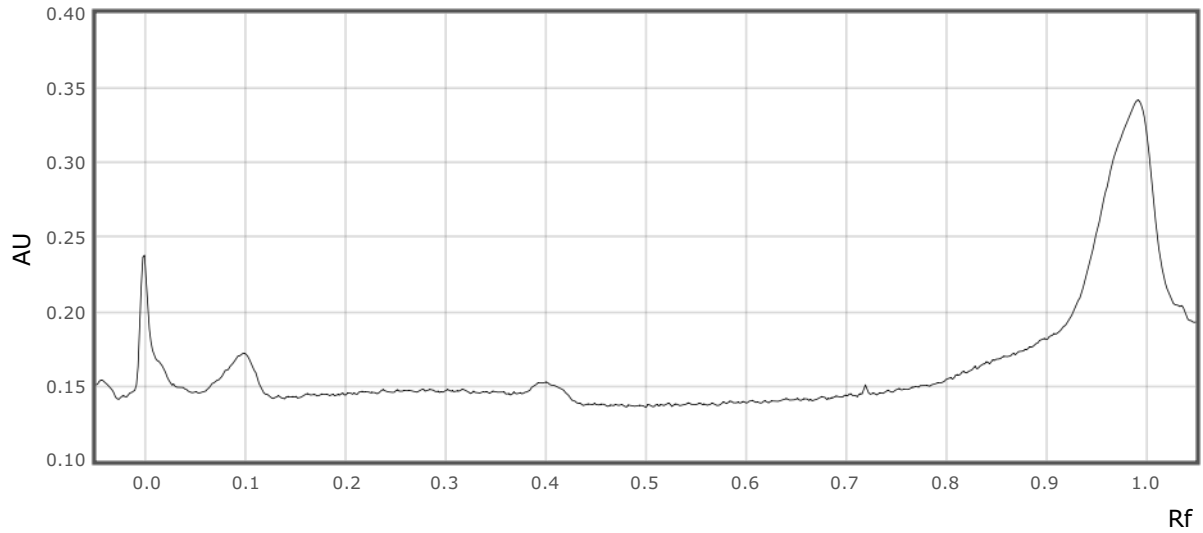
Track 13:

Type Single  $\lambda$



Track 14:

Type Single  $\lambda$

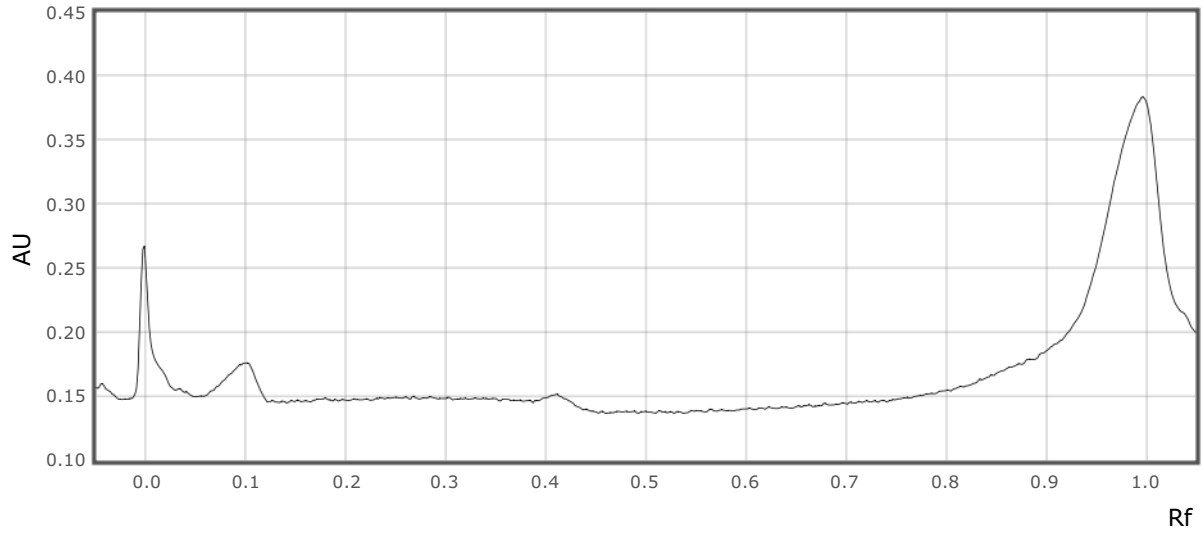


MGO STAND 29 20092023

visionCATS

Track 15:

Type Single  $\lambda$



Scan developed plate 1c - Scanner 4 (S/N: 241068):

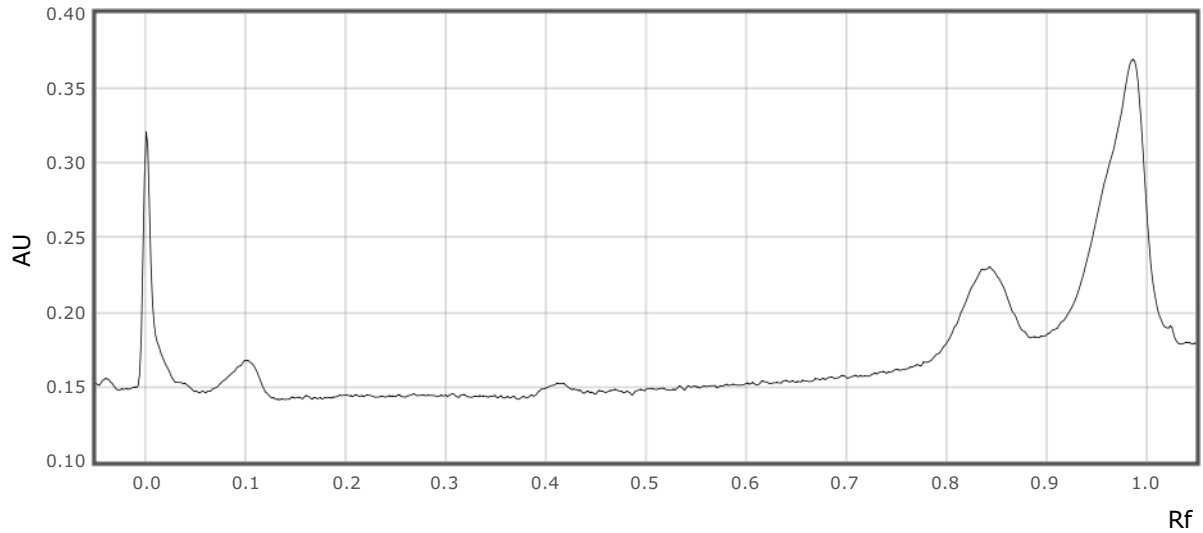
Executed 20-Sep-2023 18:38:15 visionCATSuser

Scan:

Wavelength 239 nm

Track 1:

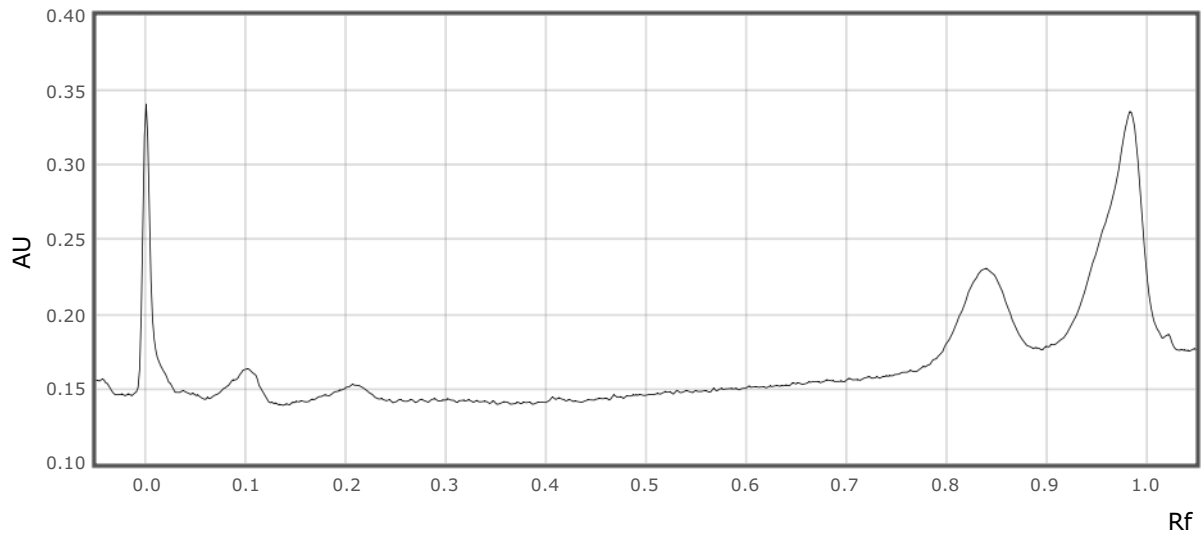
Type Single  $\lambda$



Track 2:

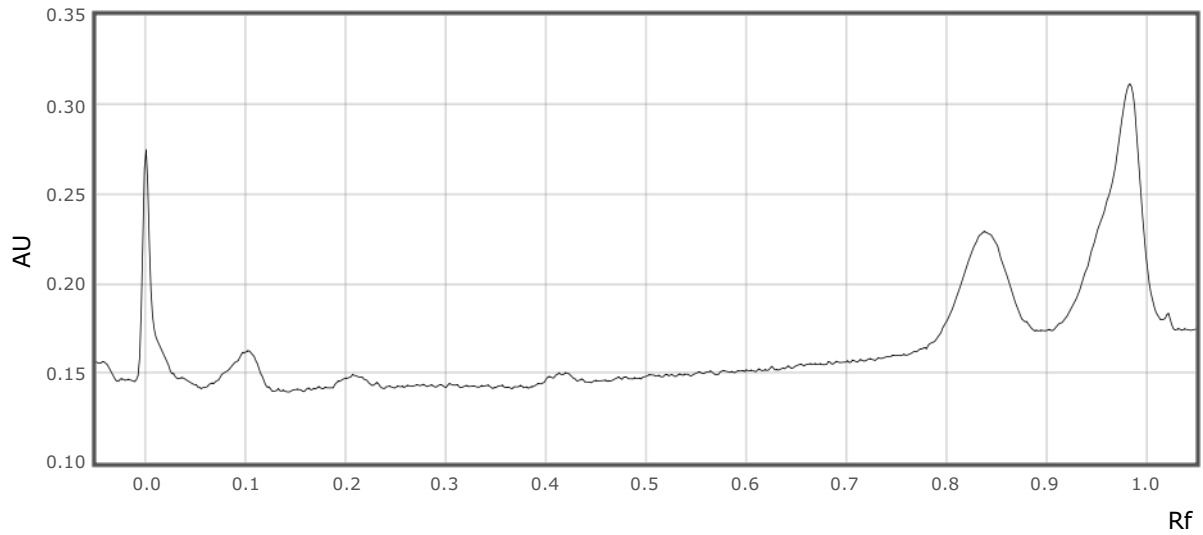
Type Single  $\lambda$

MGO STAND 29 20092023



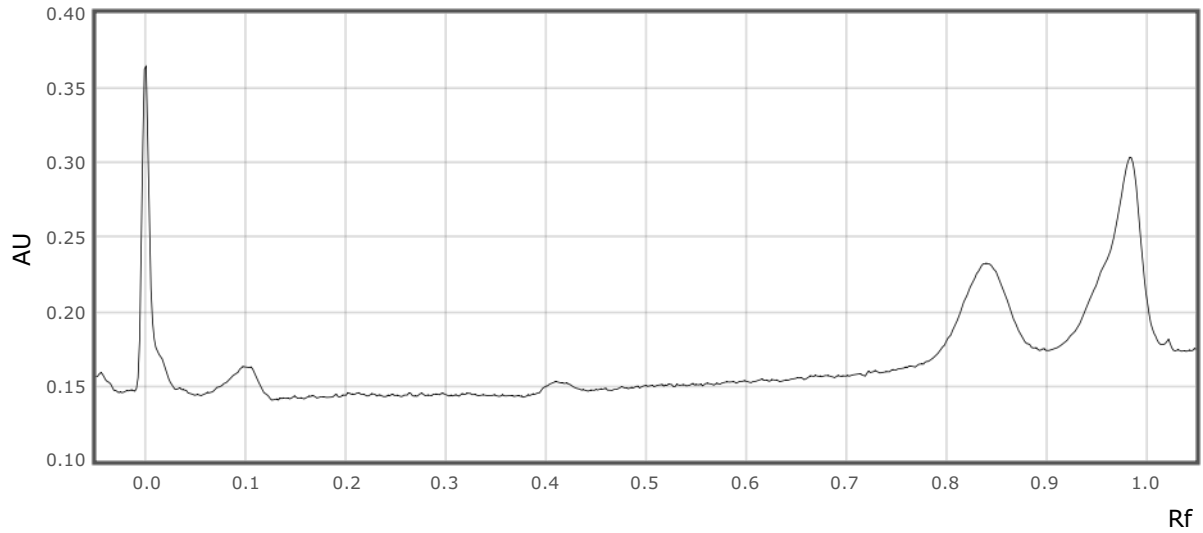
Track 3:

Type Single  $\lambda$



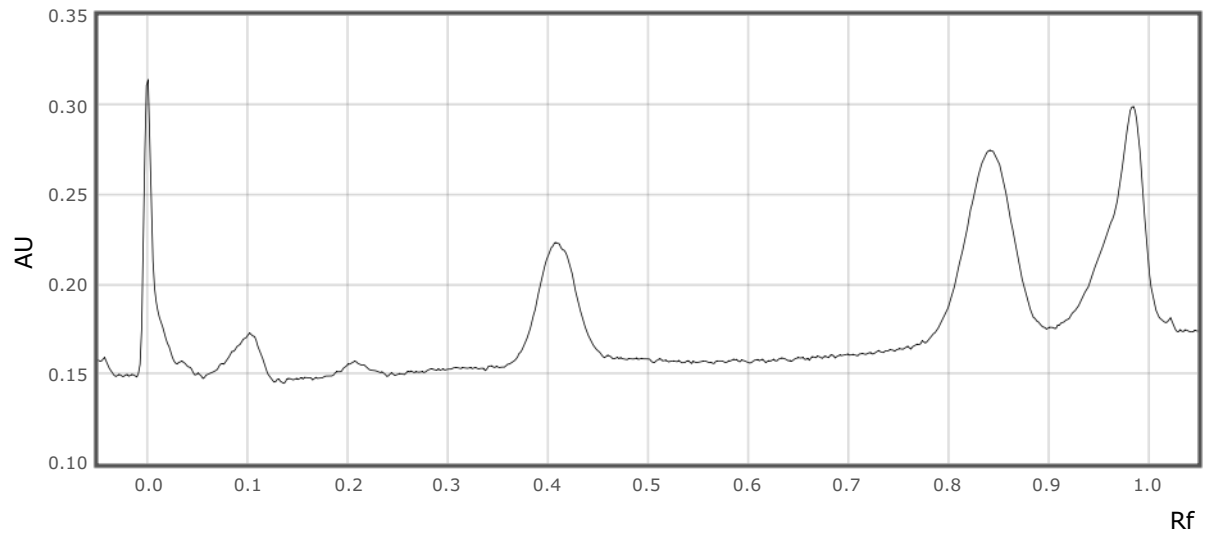
Track 4:

Type Single  $\lambda$



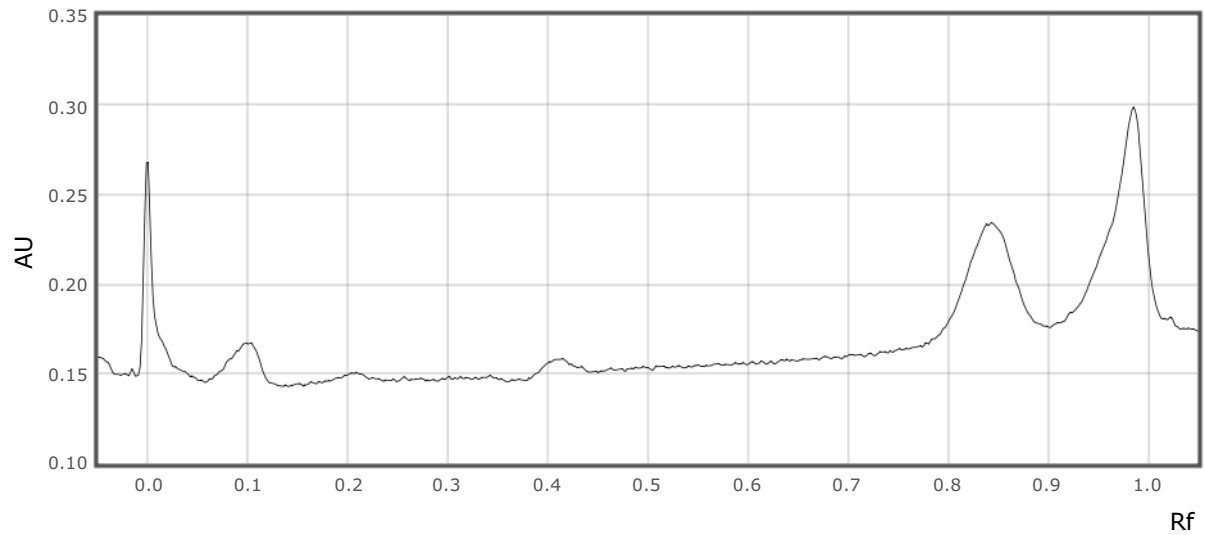
Track 5:

Type Single  $\lambda$



Track 6:

Type Single  $\lambda$

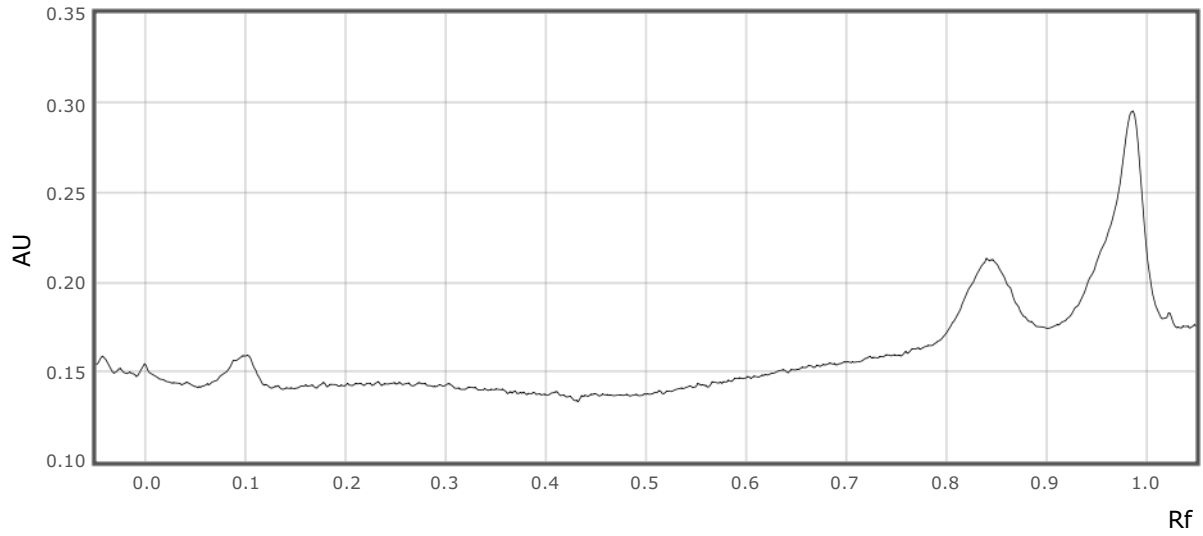


Track 7:

Type Single  $\lambda$

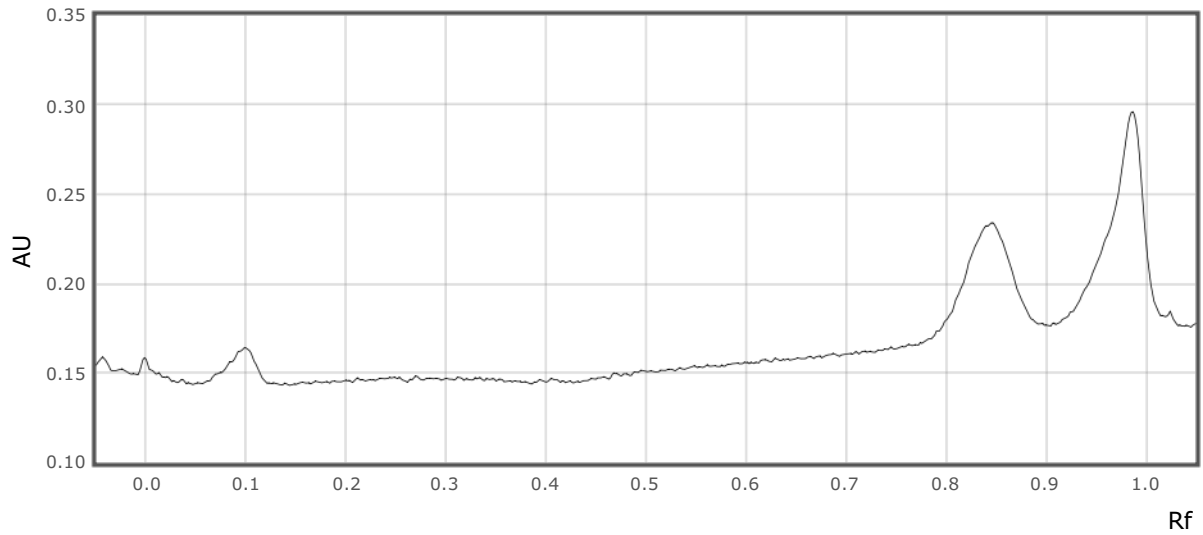
MGO STAND 29 20092023

visionCATS



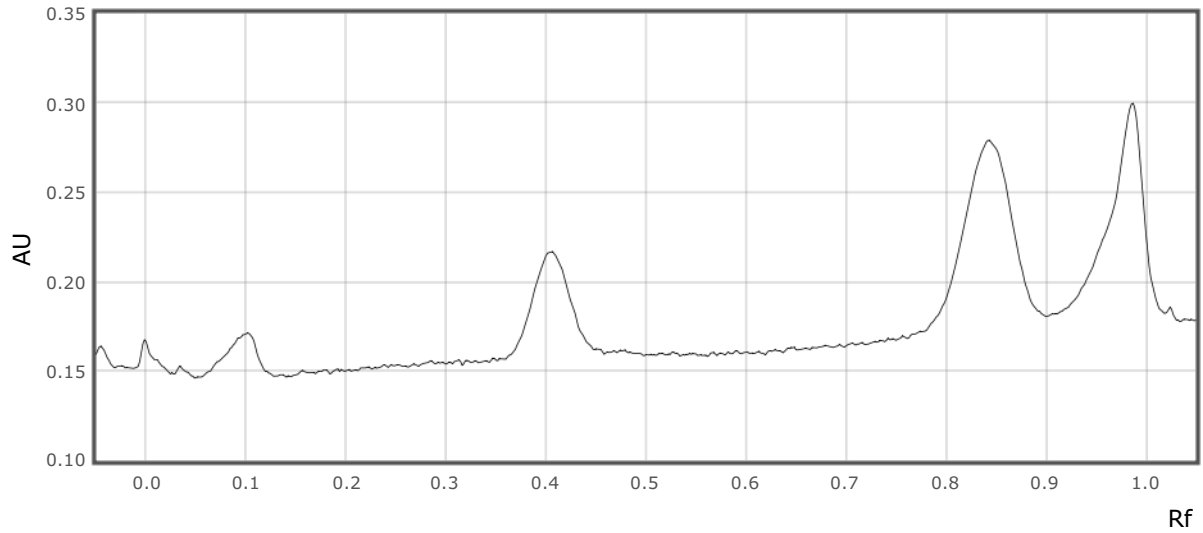
Track 8:

Type Single  $\lambda$



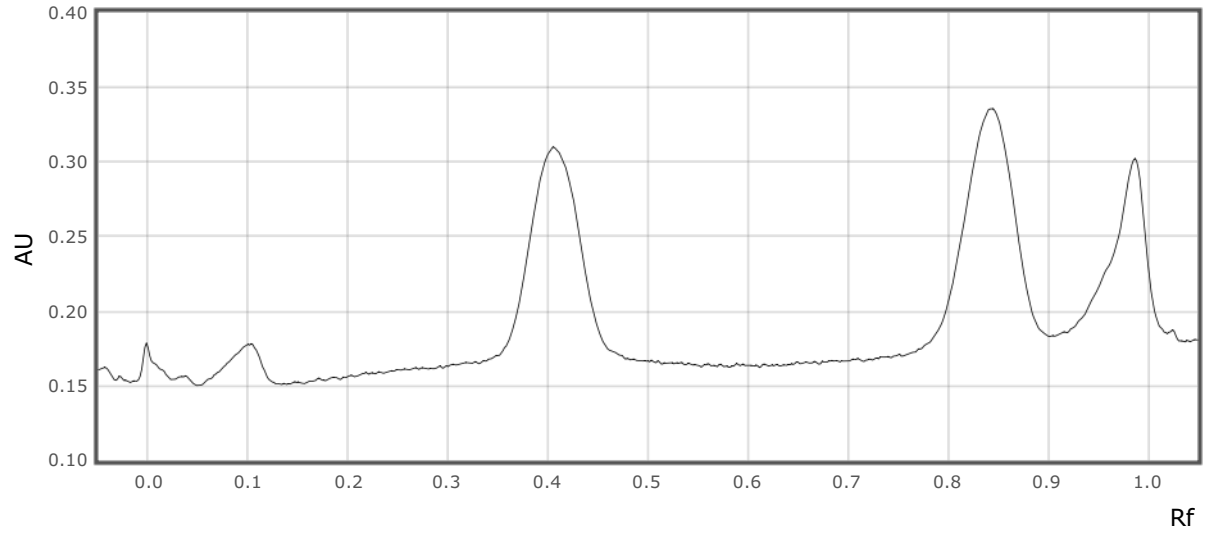
Track 9:

Type Single  $\lambda$



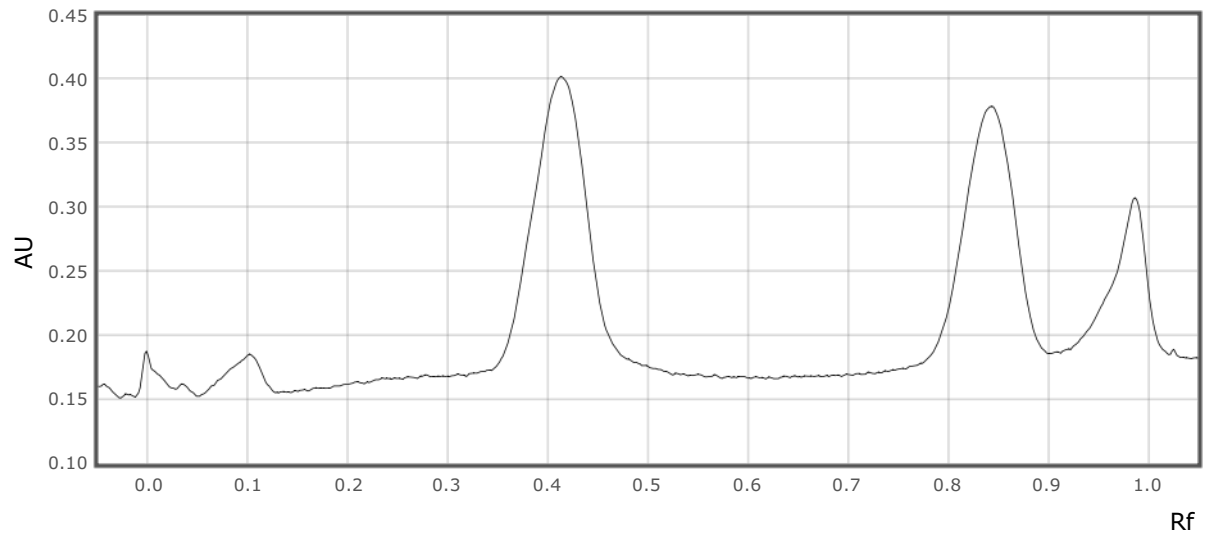
Track 10:

Type Single  $\lambda$



Track 11:

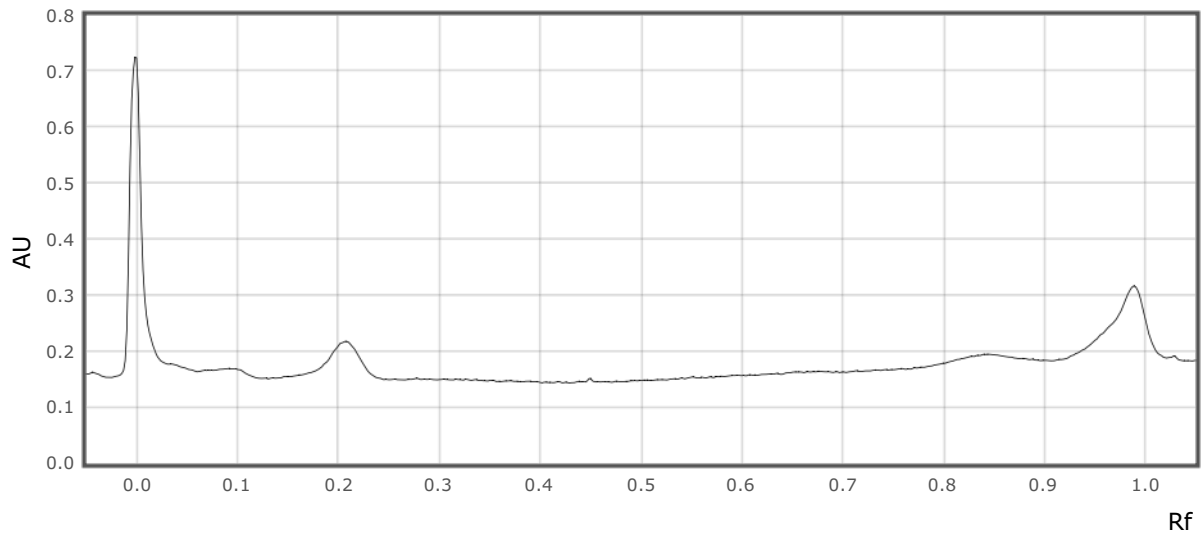
Type Single  $\lambda$



Track 12:

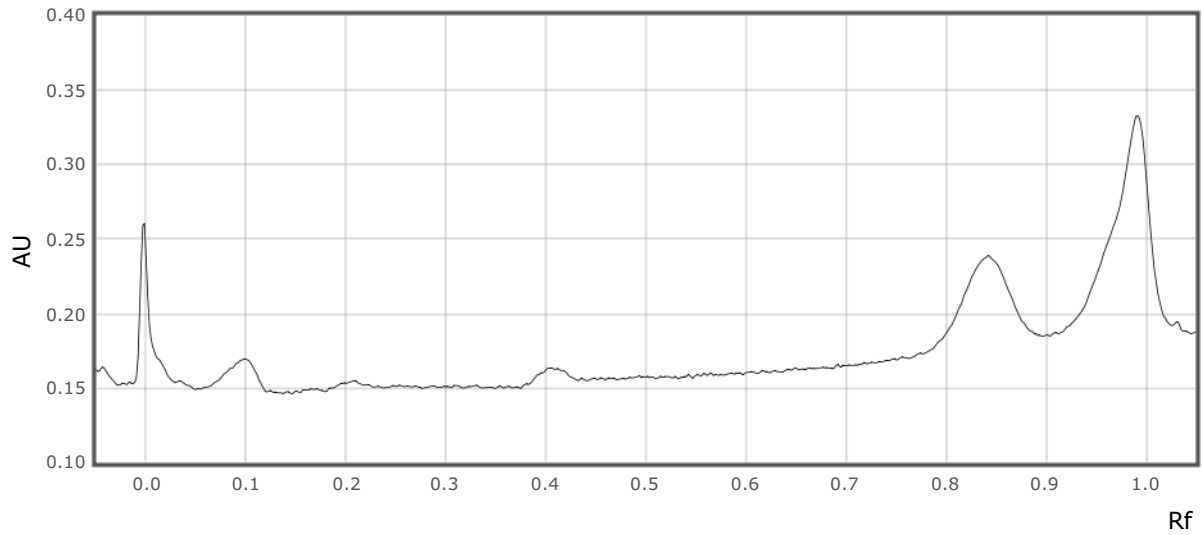
Type Single  $\lambda$

MGO STAND 29 20092023



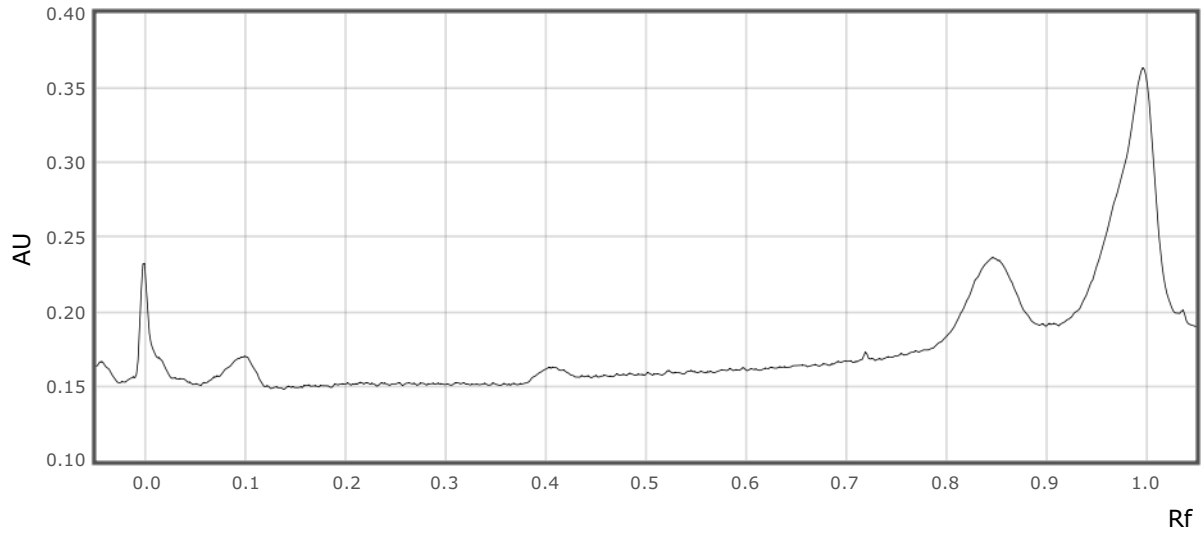
Track 13:

Type Single  $\lambda$



Track 14:

Type Single  $\lambda$

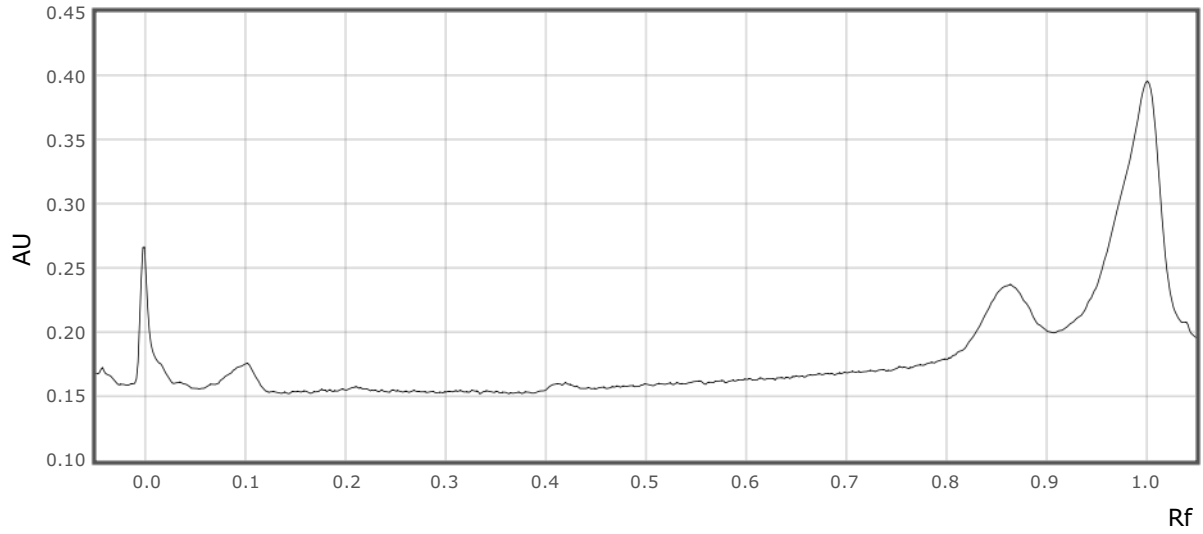


MGO STAND 29 20092023

visionCATS

Track 15:

Type Single  $\lambda$



Derivatization 1 - Derivatizer:

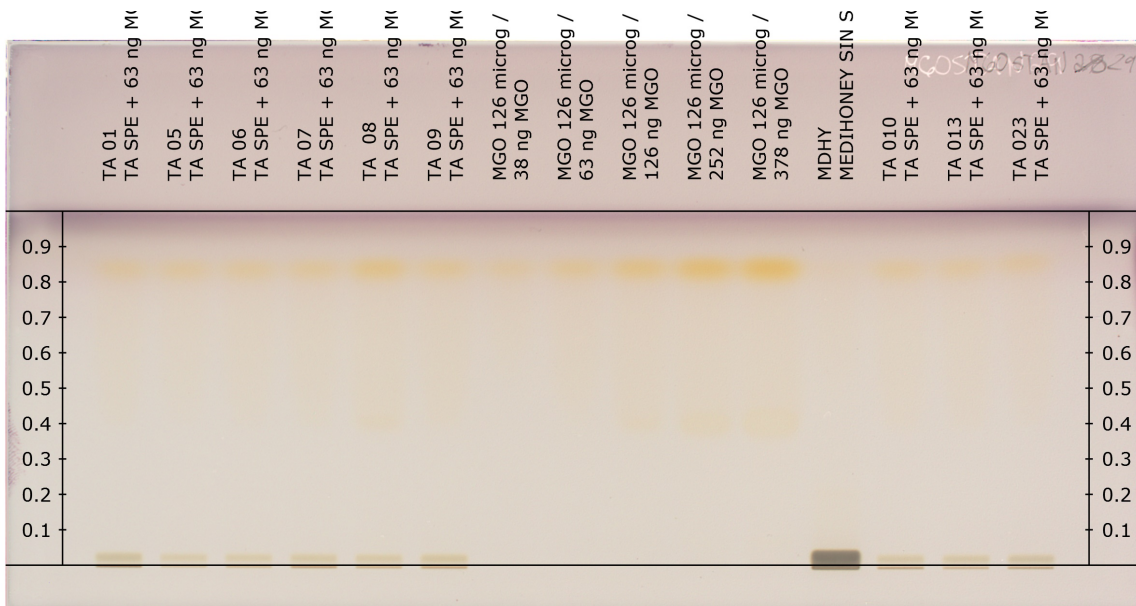
Executed 20-Sep-2023 19:56:29 visionCATSuser

Take image derivatized plate 1a - Visualizer (S/N: 150919):

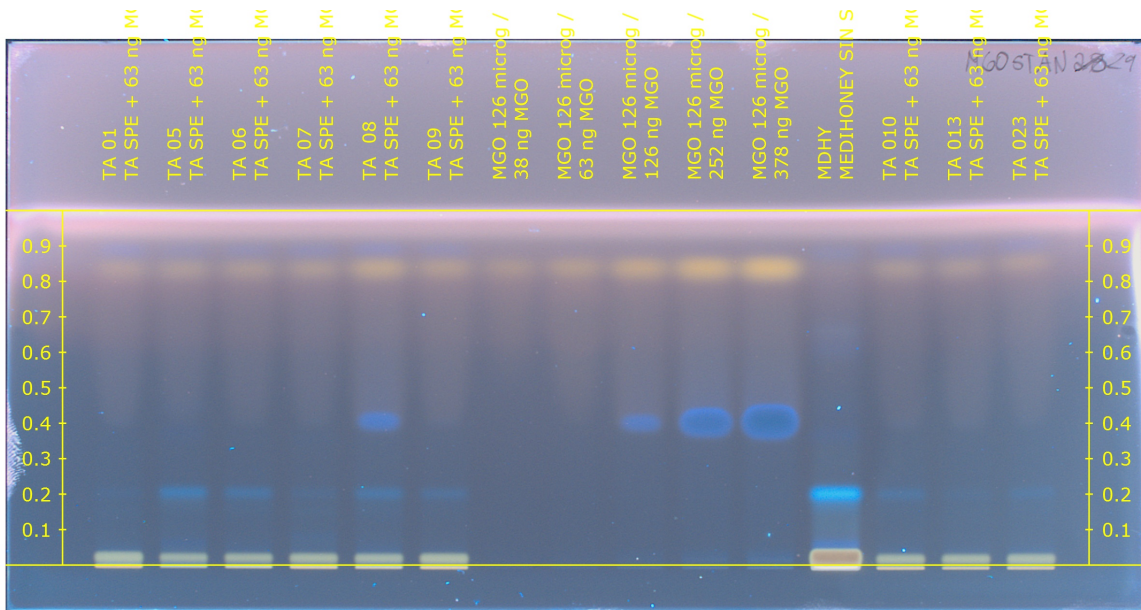
Executed 20-Sep-2023 19:56:31 visionCATSuser

RT White

Derivatized, RemTransVis



Exposure	0.067 s
Contrast	1
Normalized exposure	Disabled
Clarify	Disabled
White balance	1.00, 1.00, 1.00



Exposure	5.216 s
Contrast	1
Normalized exposure	Enabled
Clarify	Disabled
White balance	1.00, 1.00, 1.00

## Scan derivatized plate 1b - Scanner 4 (S/N: 241068):

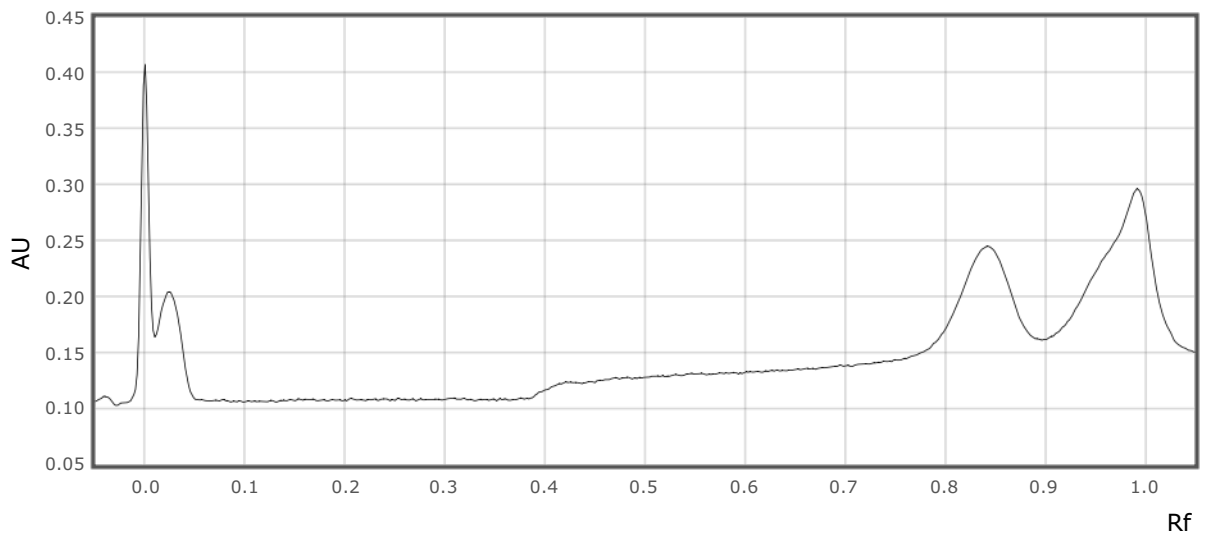
Executed 20-Sep-2023 19:58:32 visionCATSuser

### Scan:

Wavelength 480 nm

### Track 1:

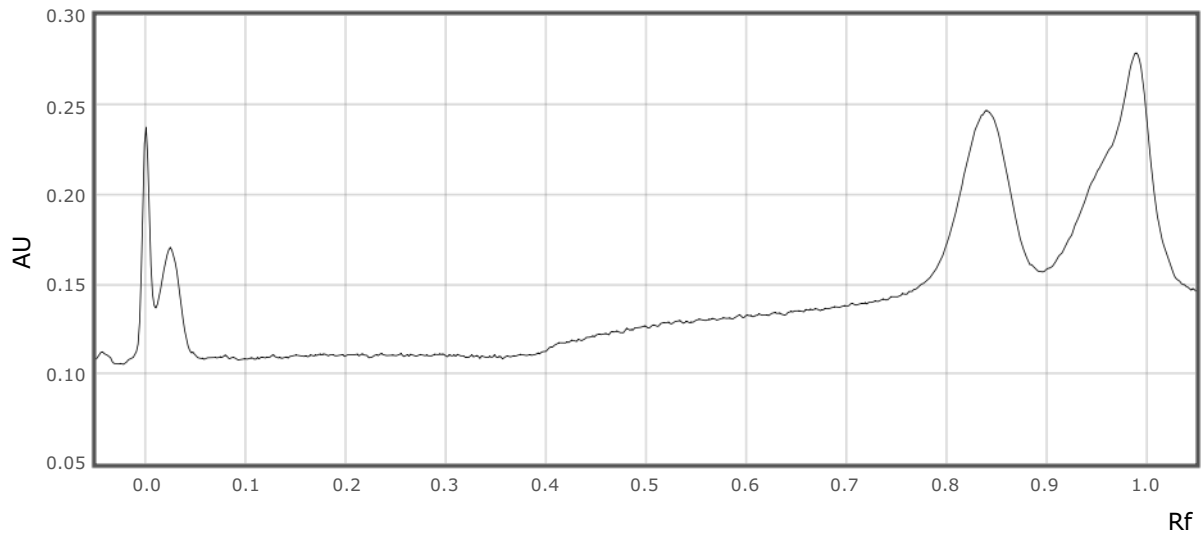
Type Single  $\lambda$



### Track 2:

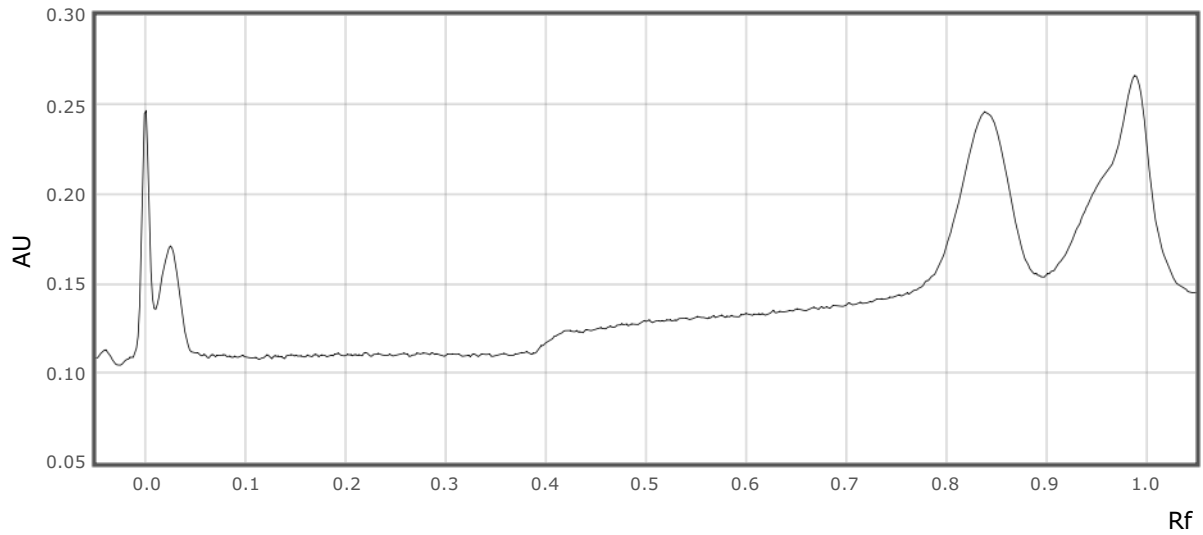
Type Single  $\lambda$

MGO STAND 29 20092023



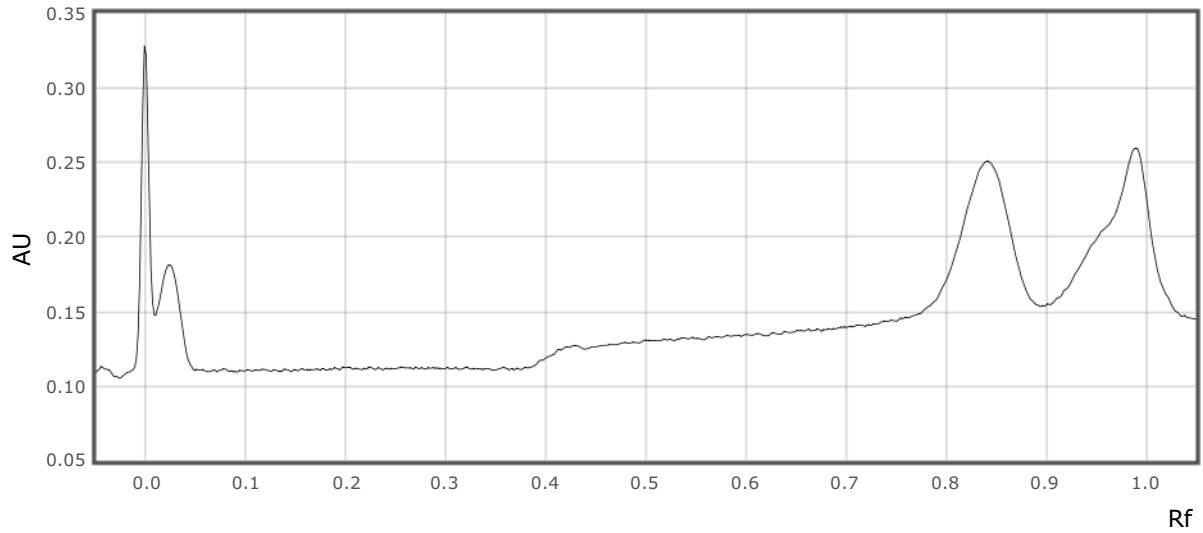
Track 3:

Type Single  $\lambda$



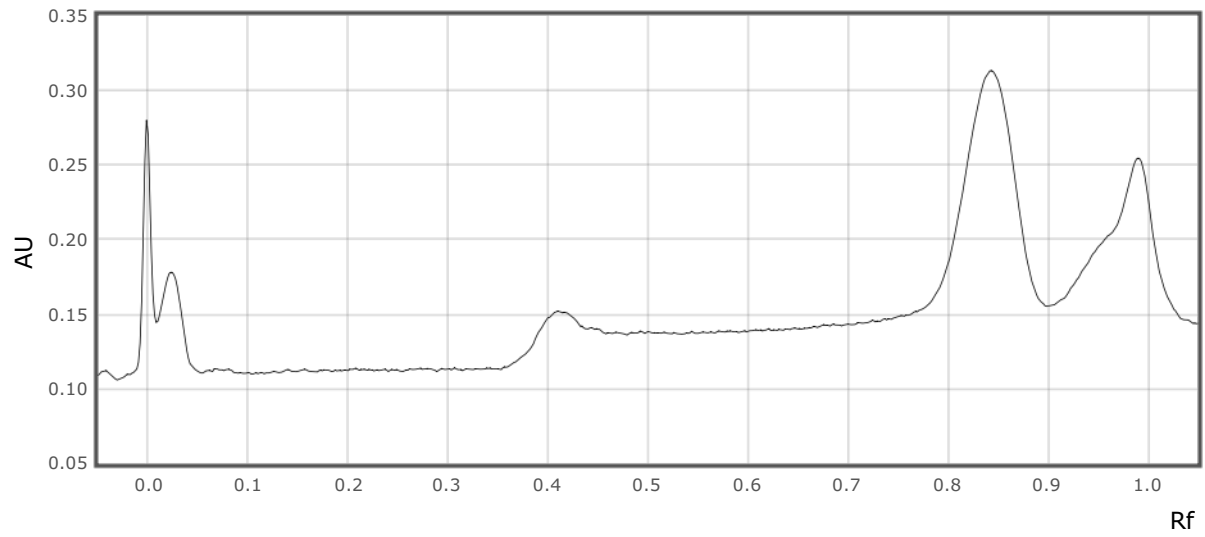
Track 4:

Type Single  $\lambda$



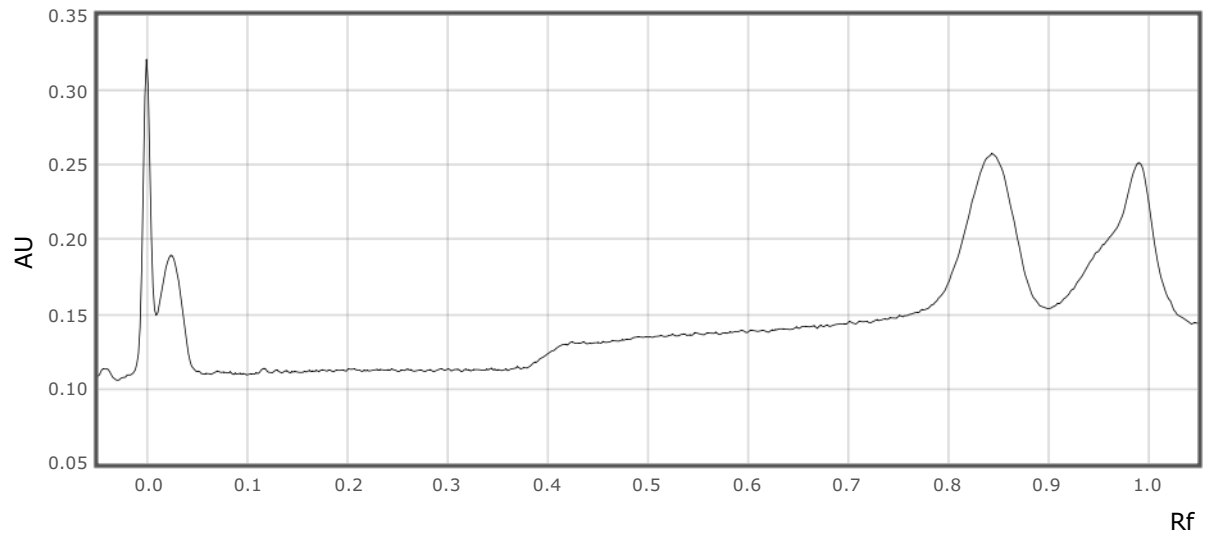
Track 5:

Type Single  $\lambda$



Track 6:

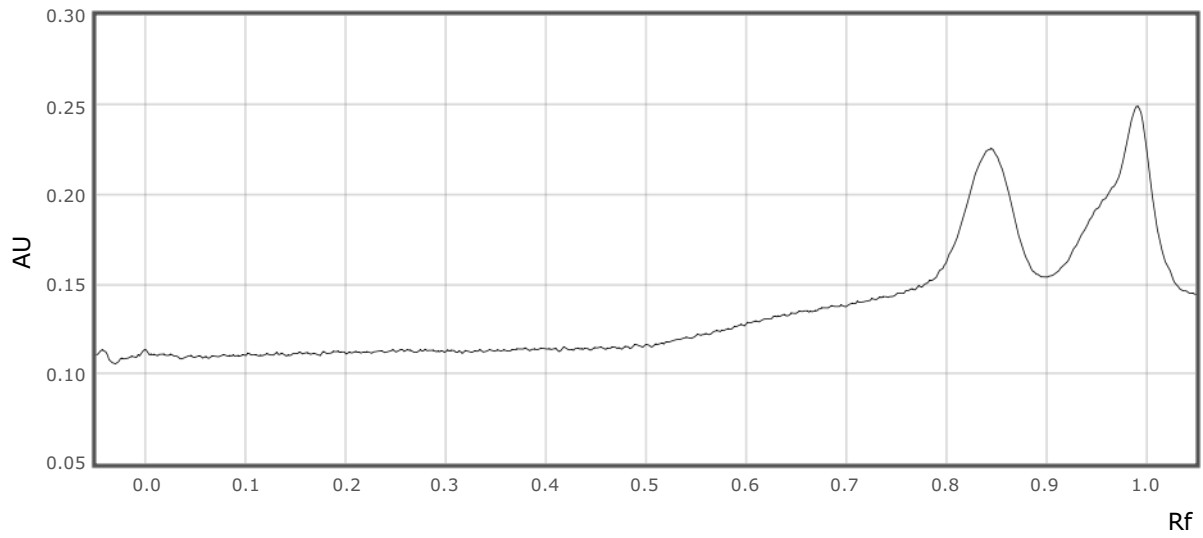
Type Single  $\lambda$



Track 7:

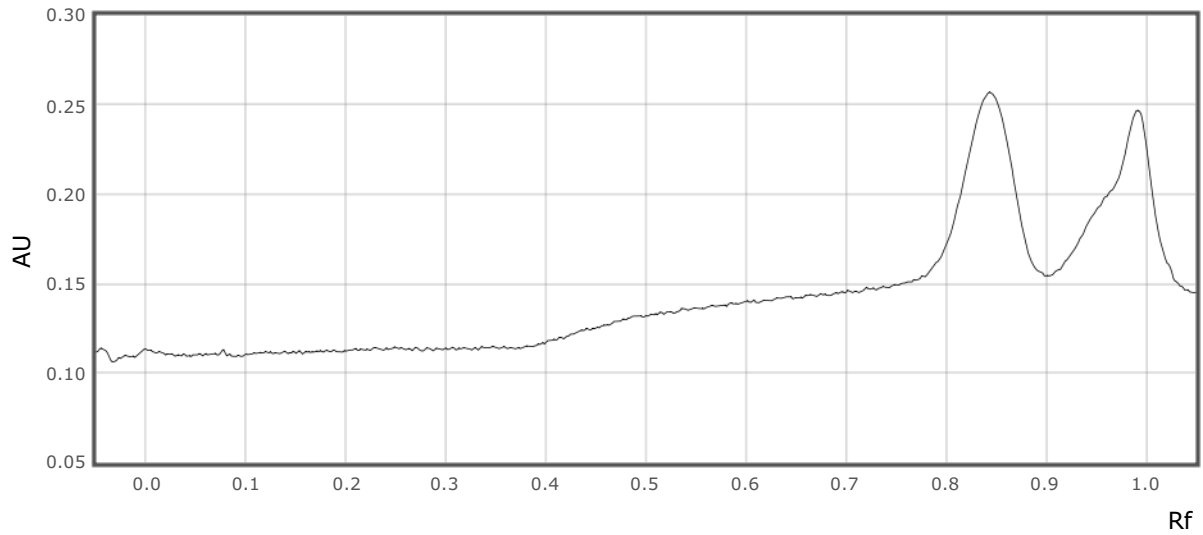
Type Single  $\lambda$

MGO STAND 29 20092023



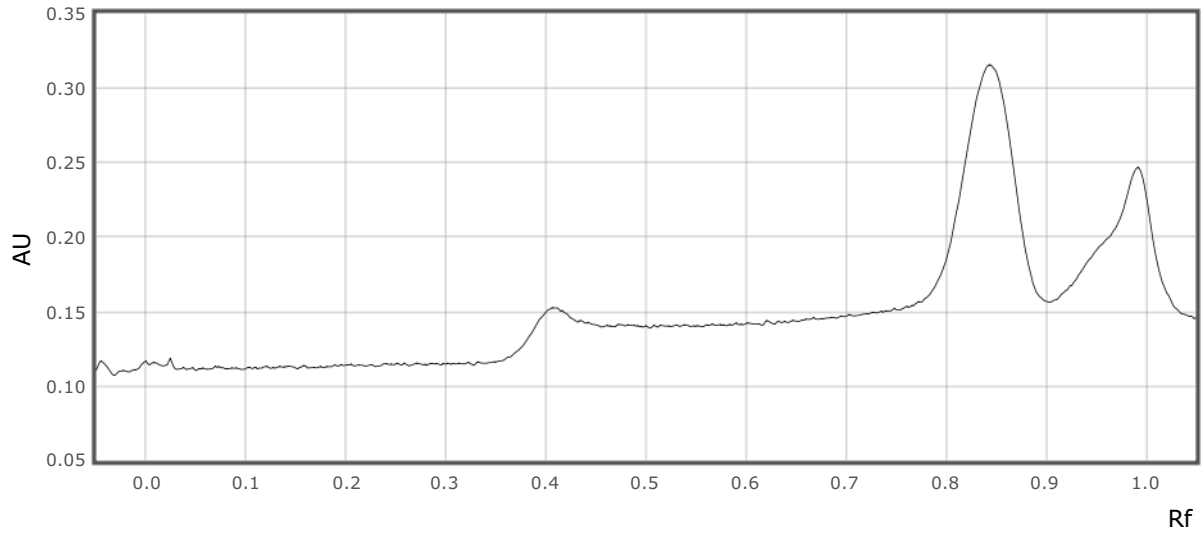
Track 8:

Type Single  $\lambda$



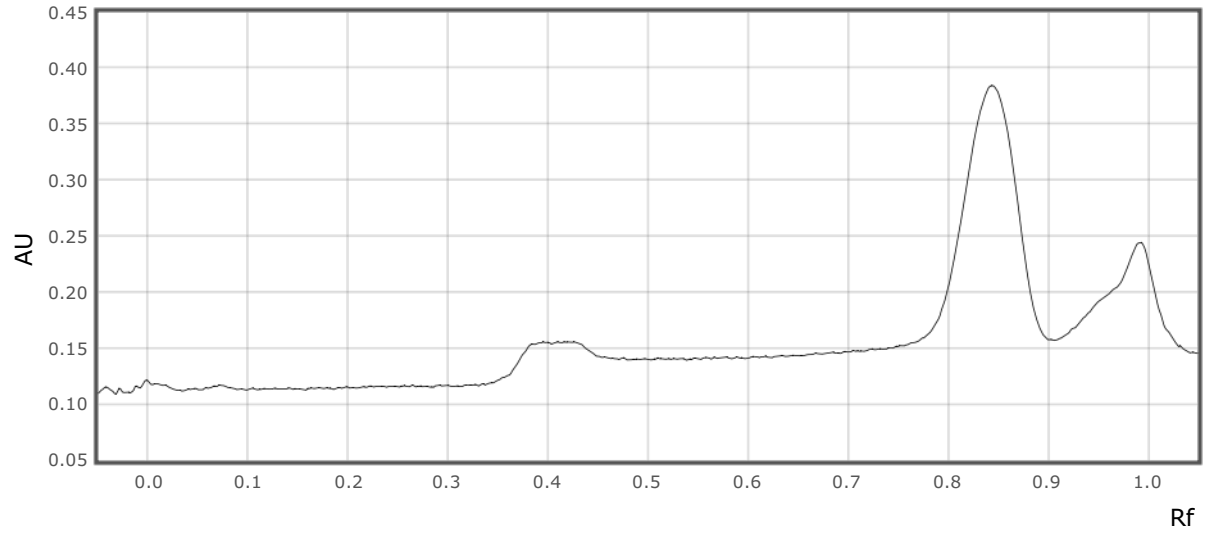
Track 9:

Type Single  $\lambda$



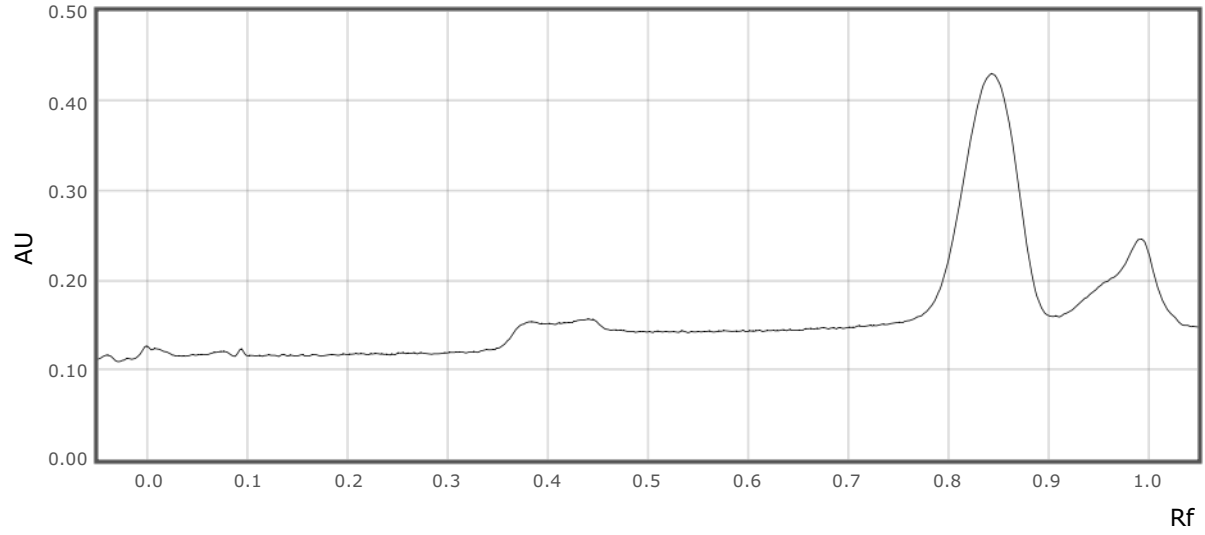
Track 10:

Type Single  $\lambda$



Track 11:

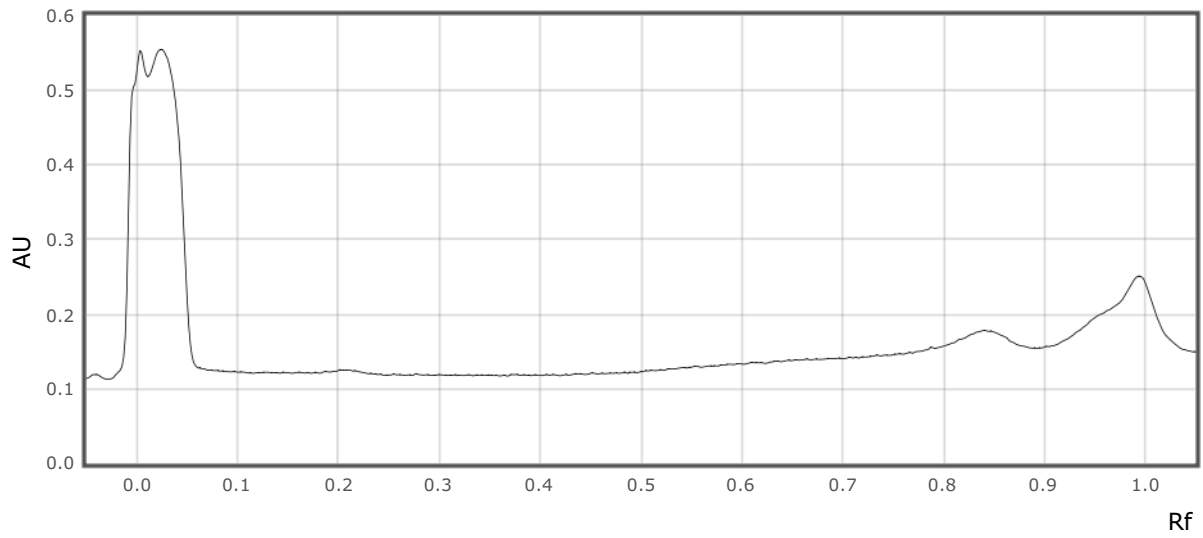
Type Single  $\lambda$



Track 12:

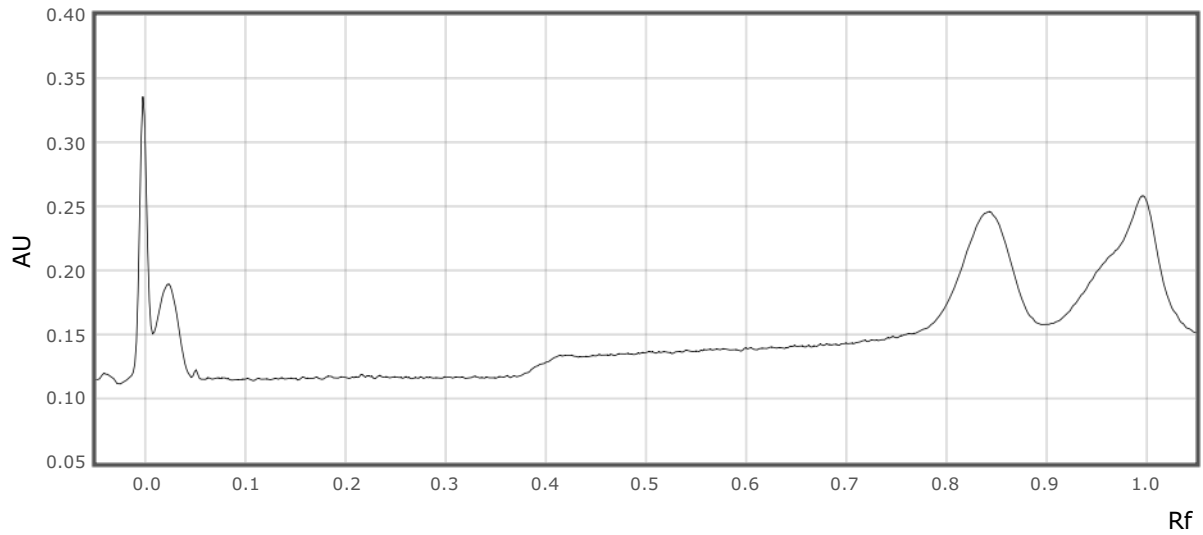
Type Single  $\lambda$

MGO STAND 29 20092023



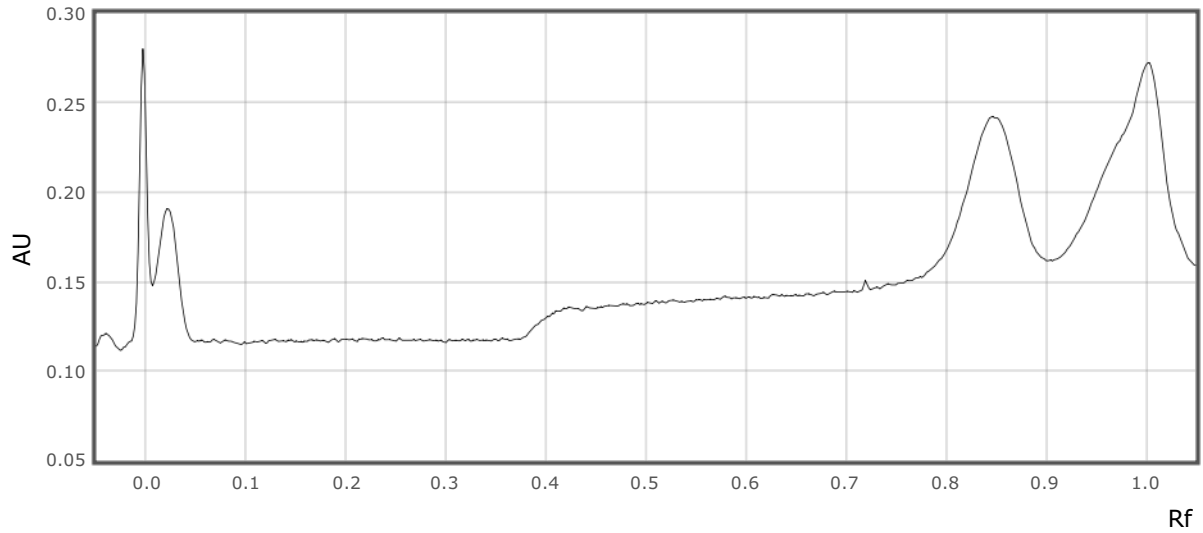
Track 13:

Type Single  $\lambda$



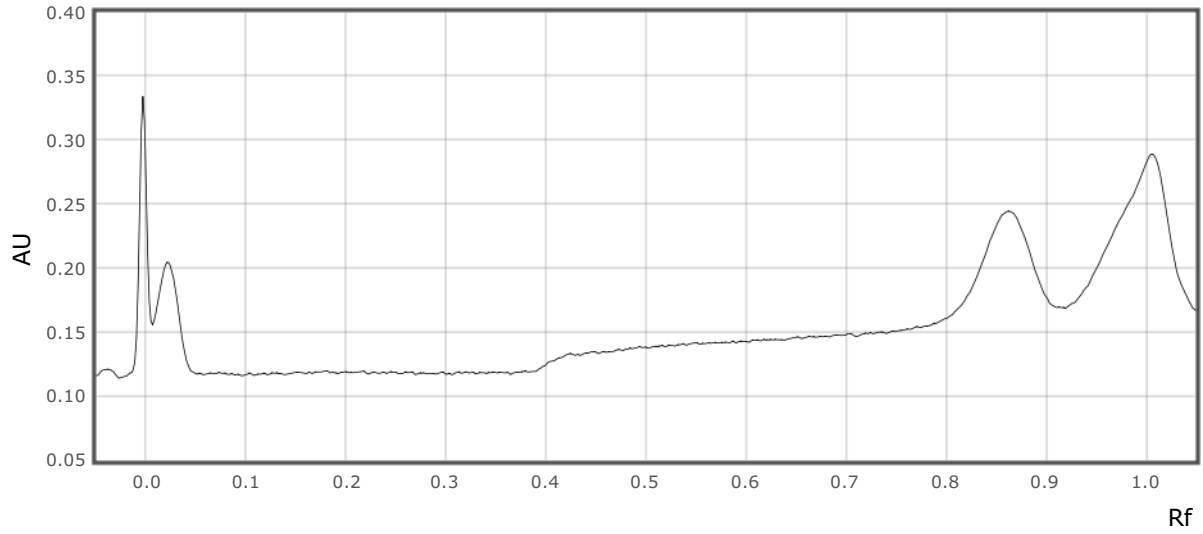
Track 14:

Type Single  $\lambda$



Track 15:

Type Single  $\lambda$



Evaluation 1 :

Validated	false
Step	Scan derivatized plate 1b
Concentration unit type	Mass / volume
Notes	

Definition:

References:

MGO 126 microg / mL		
Substance Name	Concentration	Purity
MGO 126 microg / mL	126.000 µg/ml	100.00 %

Samples:

Vial ID	Amount	Volume solution	Reference amount	Related to
TA 01		0.00 ml		
TA 05		0.00 ml		
TA 06		0.00 ml		
TA 07		0.00 ml		
TA 08		0.00 ml		
TA 09		0.00 ml		
MDHY		0.00 ml		
TA 010		0.00 ml		
TA 013		0.00 ml		
TA 023		0.00 ml		

Integration parameters:

Bounds	[0.738,0.913]
Smoothing	Savitzky-Golay of order 3 and window 7
Baseline correction	Lowest slope with noise 0.05
Profile subtraction	None
Peaks detection	Gauss (legacy) with sensitivity 0.1, separation 1 and threshold 0.1

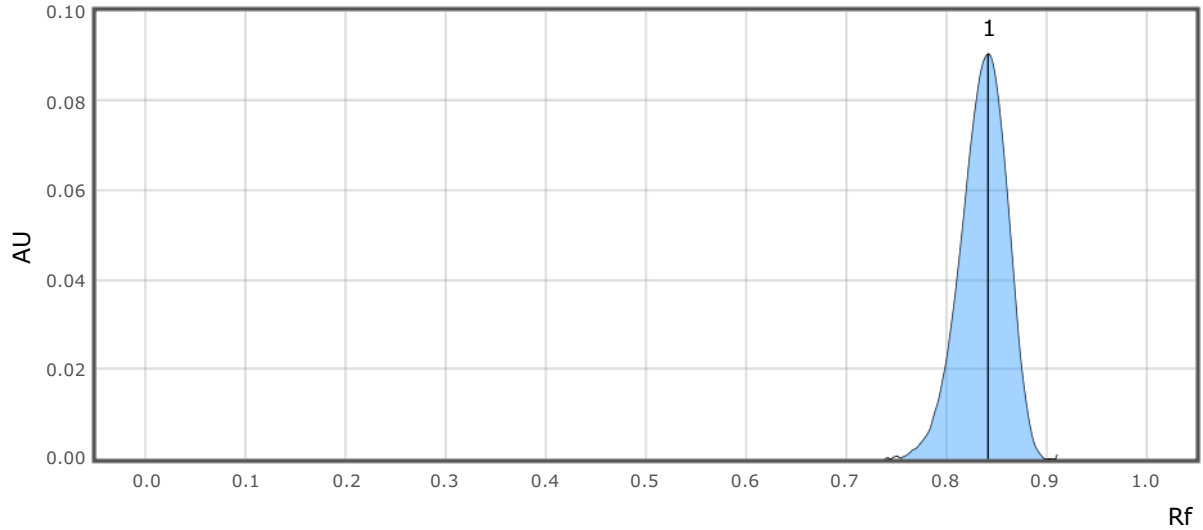
Scan:

MGO STAND 29 20092023

visionCATS

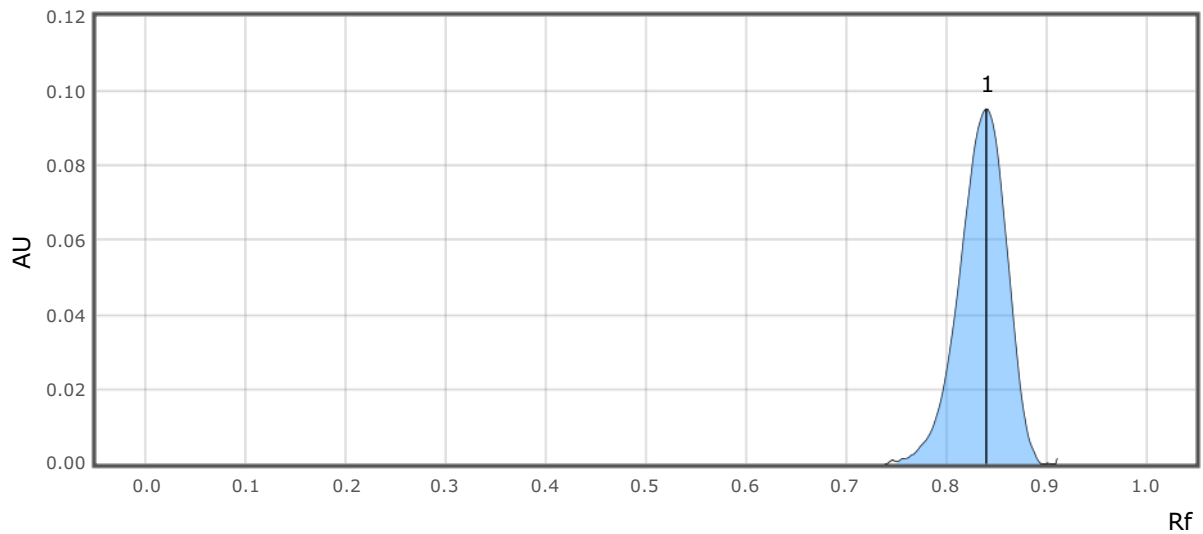
Wavelength 480 nm

Track 1:	
Type	Sample
Vial ID	TA 01
Description	TA SPE + 63 ng MGO
Volume	1.0 µl



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.755	0.0001	0.842	0.0904	100.00	0.900	0.0000	0.00506	100.00	No	MGO 126 microg / mL

Track 2:	
Type	Sample
Vial ID	TA 05
Description	TA SPE + 63 ng MGO
Volume	1.0 µl

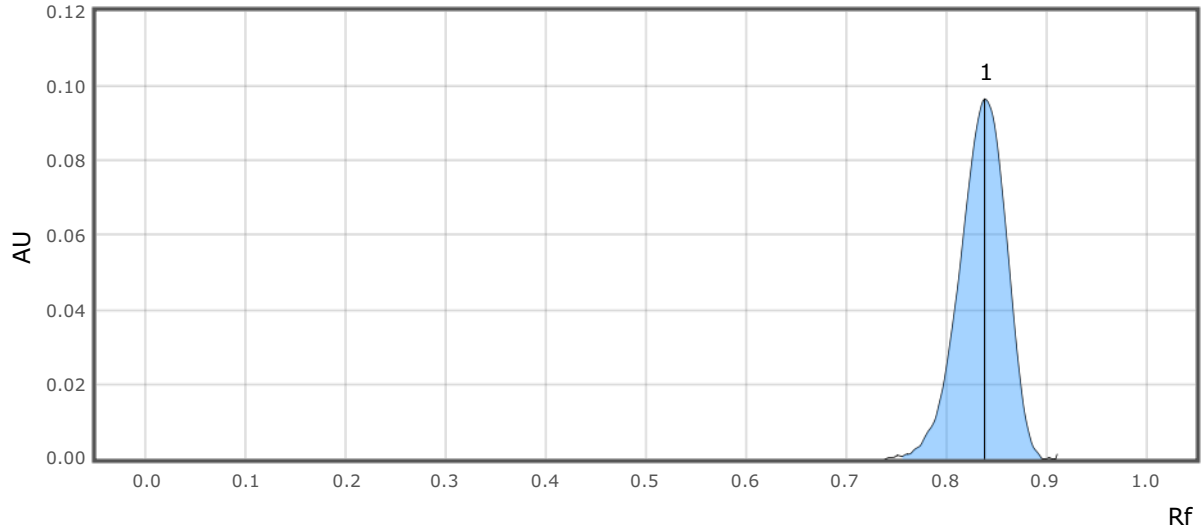


MGO STAND 29 20092023

visionCATS

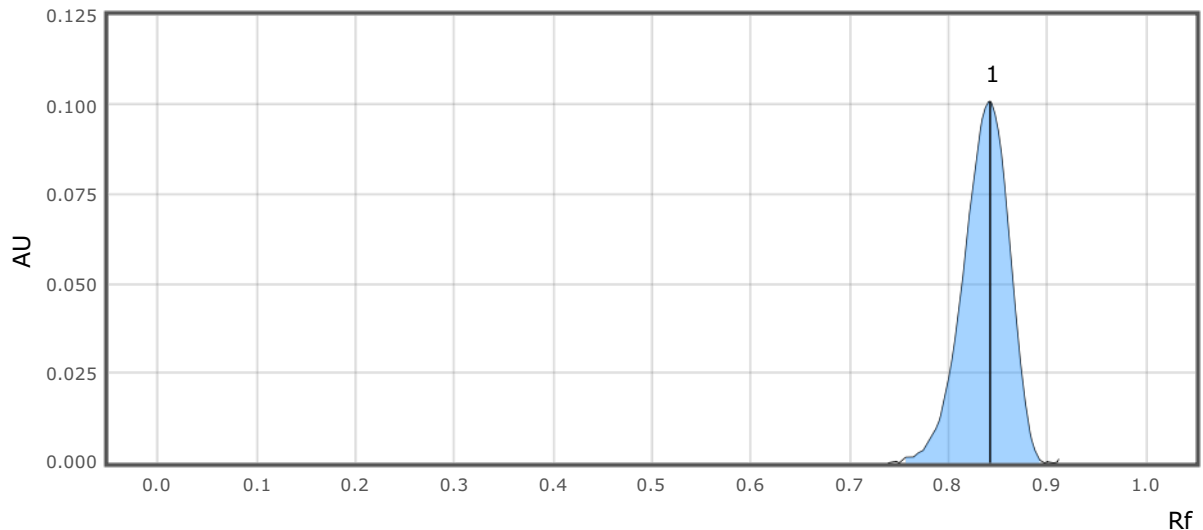
Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.752	0.0006	0.840	0.0951	100.00	0.897	0.0000	0.00528	100.00	No	MGO 126 microg / mL

Track 3:	
Type	Sample
Vial ID	TA 06
Description	TA SPE + 63 ng MGO
Volume	1.0 µl



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.756	0.0006	0.839	0.0964	100.00	0.897	0.0000	0.00529	100.00	No	MGO 126 microg / mL

Track 4:	
Type	Sample
Vial ID	TA 07
Description	TA SPE + 63 ng MGO
Volume	1.0 µl



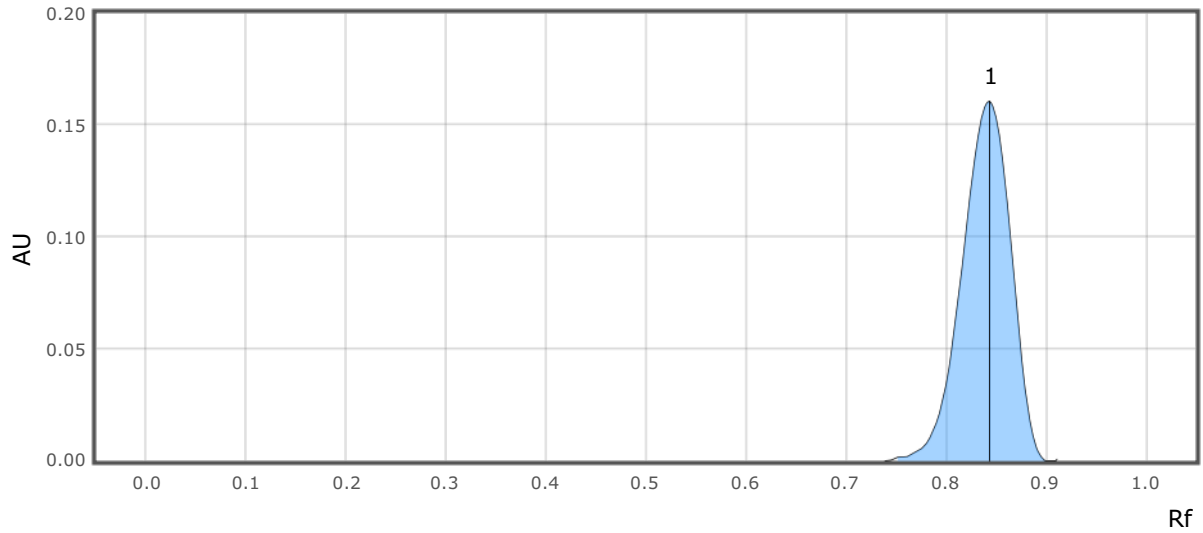
MGO STAND 29 20092023

visionCATS

Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.753	0.0008	0.842	0.1009	100.00	0.897	0.0000	0.00553	100.00	No	MGO 126 microg / mL

Track 5:

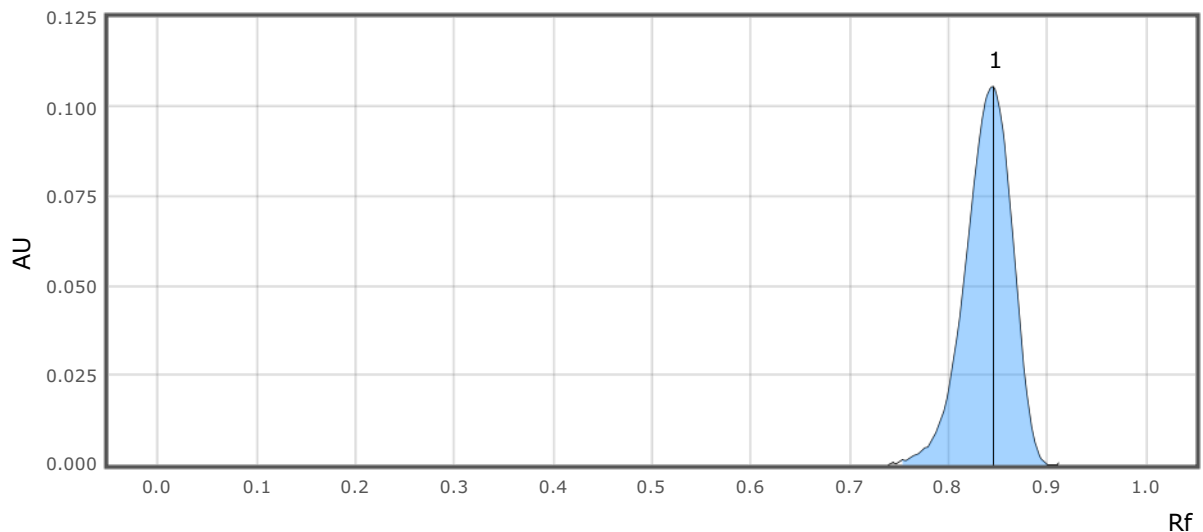
Type	Sample
Vial ID	TA 08
Description	TA SPE + 63 ng MGO
Volume	2.0 µl



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.750	0.0013	0.844	0.1606	100.00	0.900	0.0000	0.00910	100.00	No	MGO 126 microg / mL

Track 6:

Type	Sample
Vial ID	TA 09
Description	TA SPE + 63 ng MGO
Volume	1.0 µl

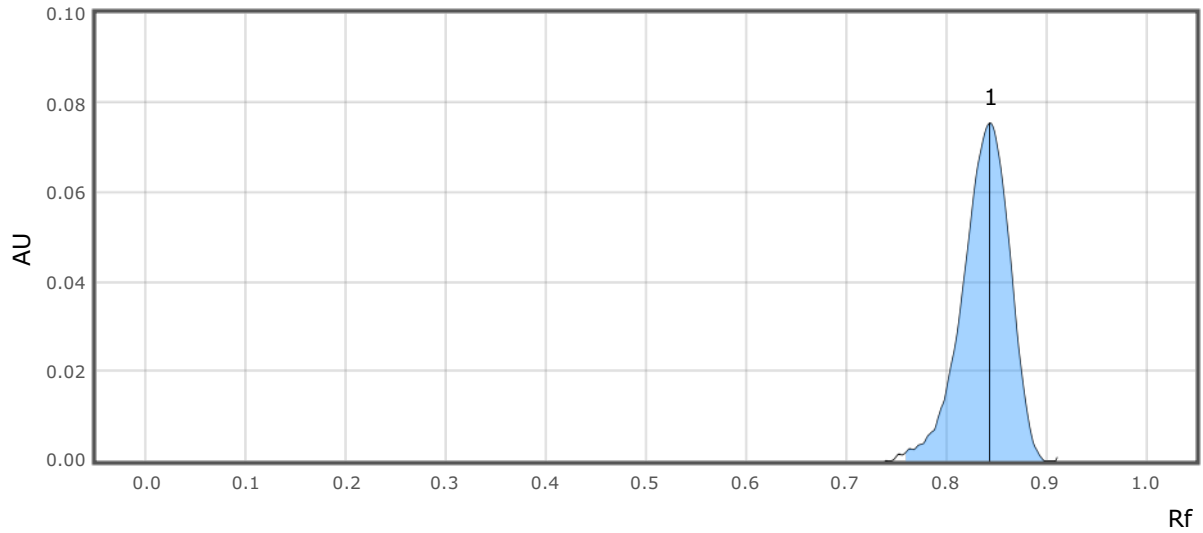


MGO STAND 29 20092023

visionCATS

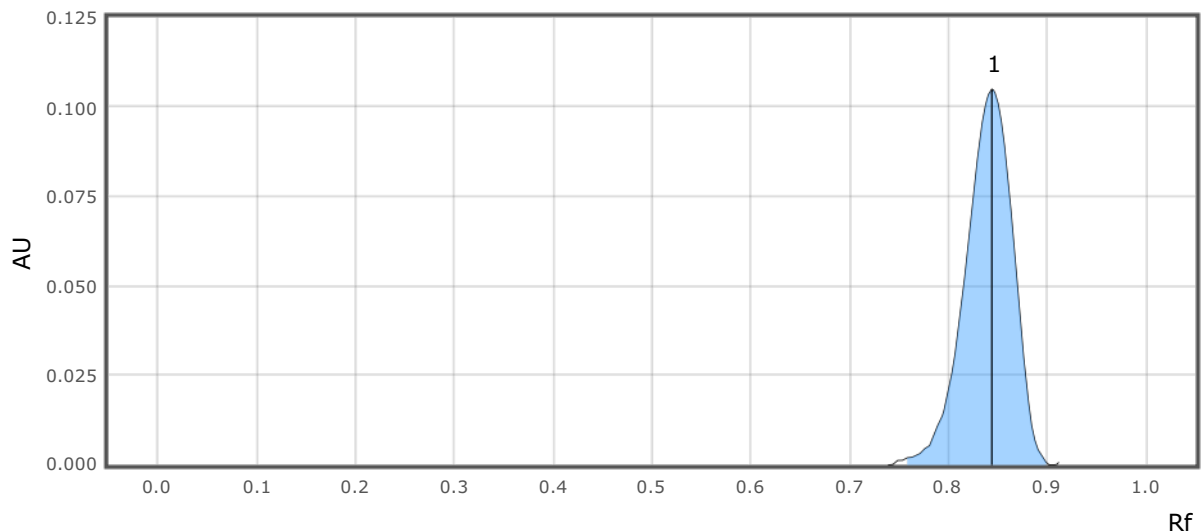
Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.748	0.0005	0.845	0.1055	100.00	0.900	0.0000	0.005870	100.00	No	MGO 126 microg / mL

Track 7:	
Type	Reference
Vial ID	MGO 126 microg / mL
Description	38 ng MGO
Volume	0.3 µl



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.760	0.0018	0.844	0.0754	100.00	0.900	0.0000	0.004150	100.00	No	MGO 126 microg / mL

Track 8:	
Type	Reference
Vial ID	MGO 126 microg / mL
Description	63 ng MGO
Volume	0.5 µl

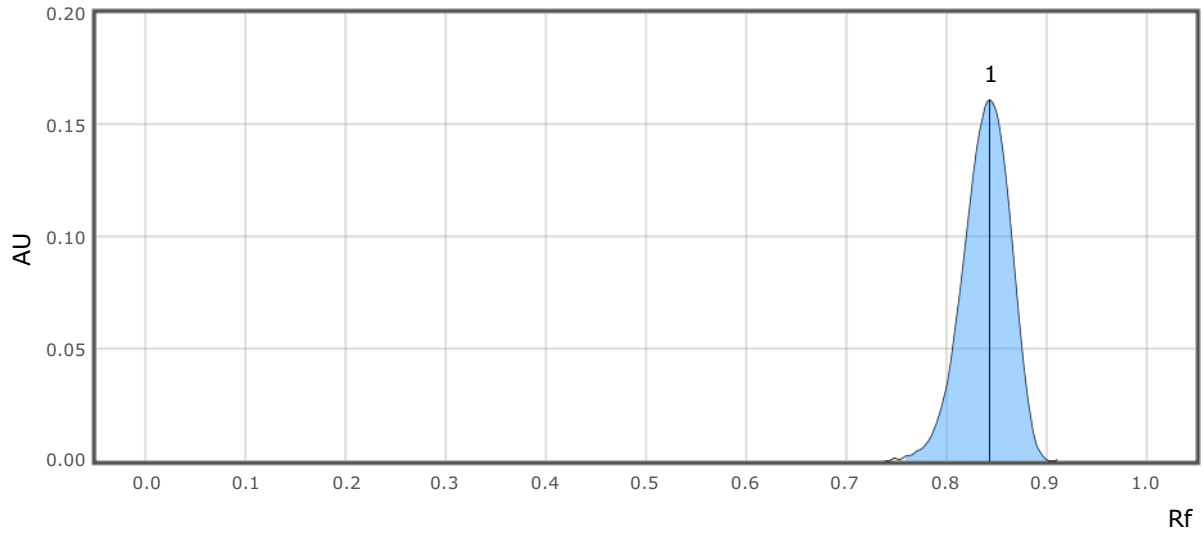


MGO STAND 29 20092023

visionCATS

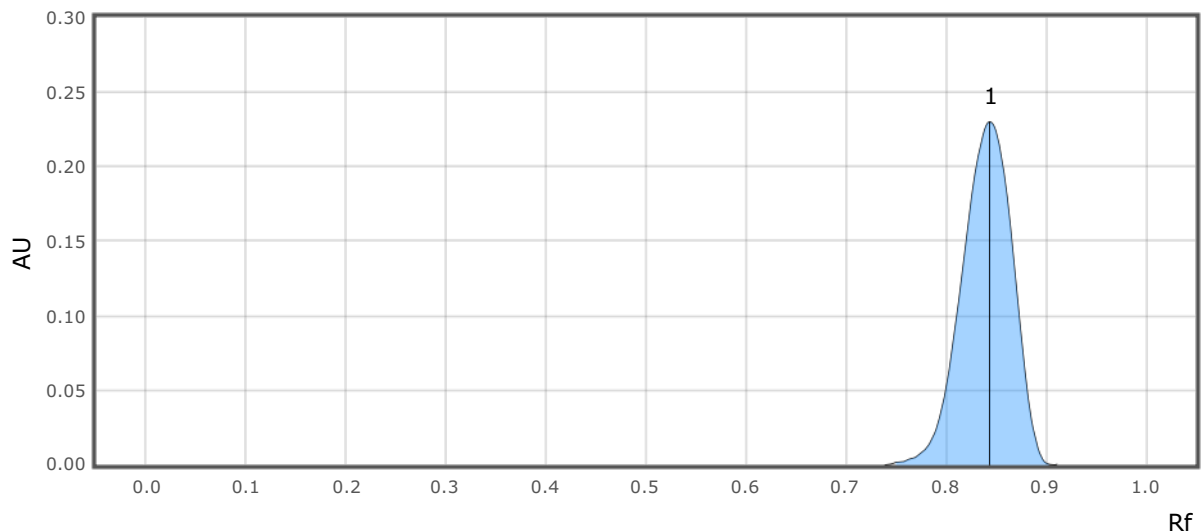
Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.755	0.0015	0.844	0.1048	100.00	0.902	0.0000	0.00587	100.00	No	MGO 126 microg / mL

Track 9:	
Type	Reference
Vial ID	MGO 126 microg / mL
Description	126 ng MGO
Volume	1.0 µl



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.756	0.0011	0.844	0.1613	100.00	0.903	0.0000	0.00922	100.00	No	MGO 126 microg / mL

Track 10:	
Type	Reference
Vial ID	MGO 126 microg / mL
Description	252 ng MGO
Volume	2.0 µl

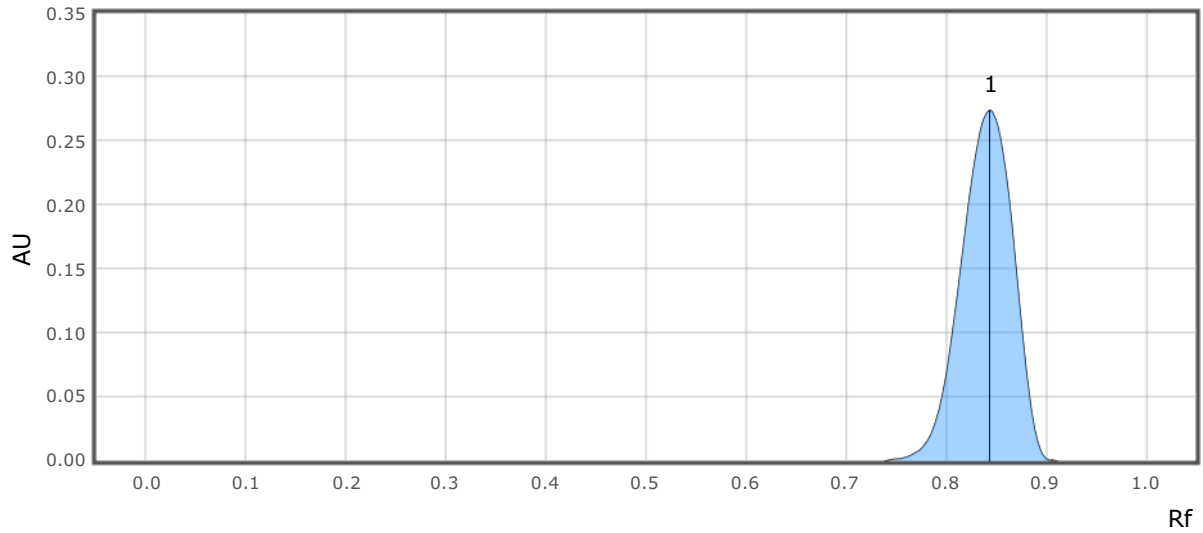


MGO STAND 29 20092023

visionCATS

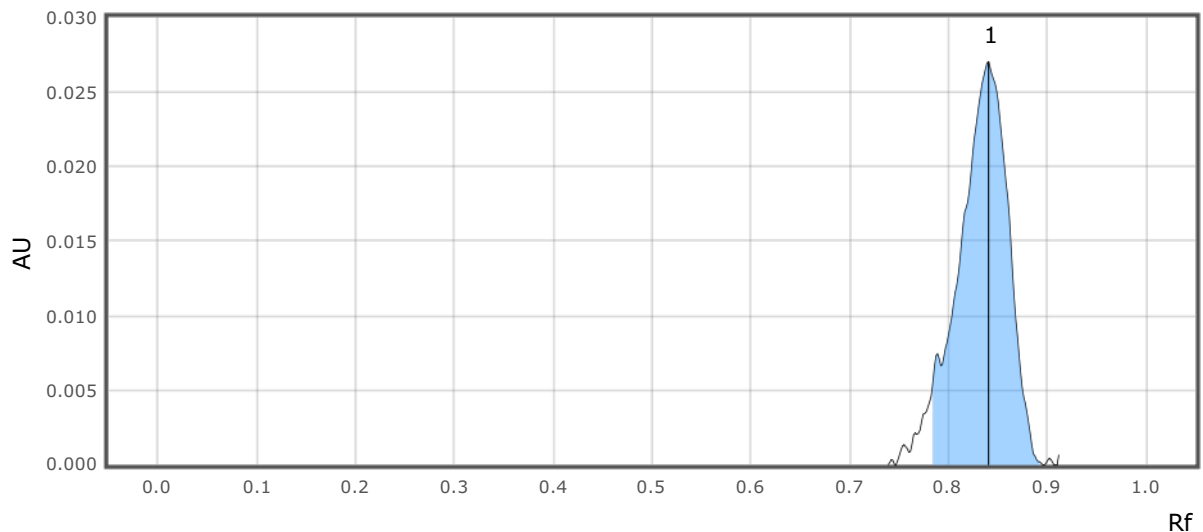
Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.748	0.0013	0.844	0.2299	100.00	0.906	0.0000	0.01370	100.00	No	MGO 126 microg / mL

Track 11:	
Type	Reference
Vial ID	MGO 126 microg / mL
Description	378 ng MGO
Volume	3.0 µl



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.744	0.0008	0.844	0.2739	100.00	0.905	0.0005	0.01683	100.00	No	MGO 126 microg / mL

Track 12:	
Type	Sample
Vial ID	MDHY
Description	MEDIHONEY SIN SPE
Volume	1.0 µl

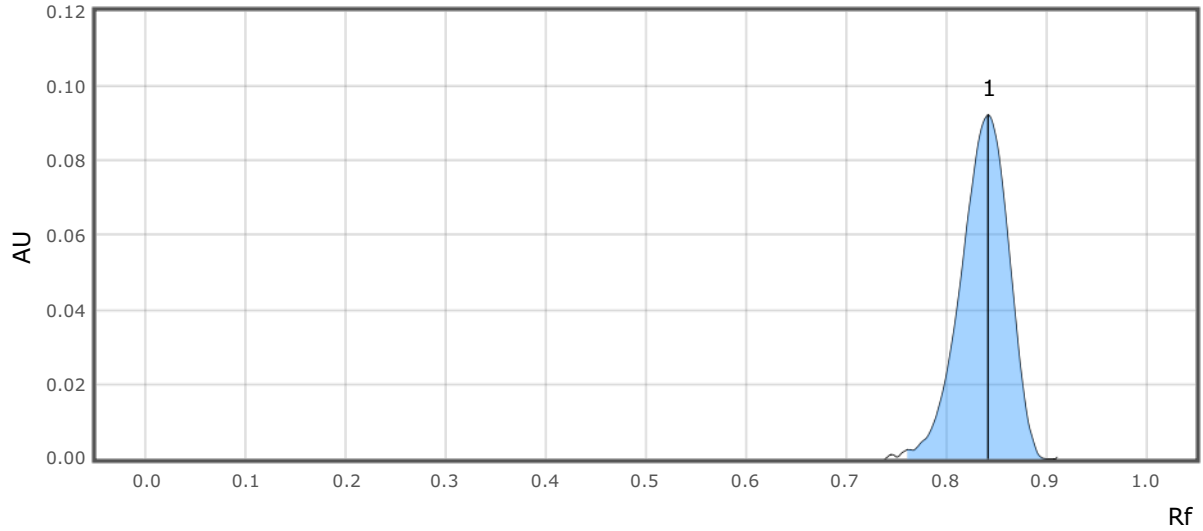


MGO STAND 29 20092023

visionCATS

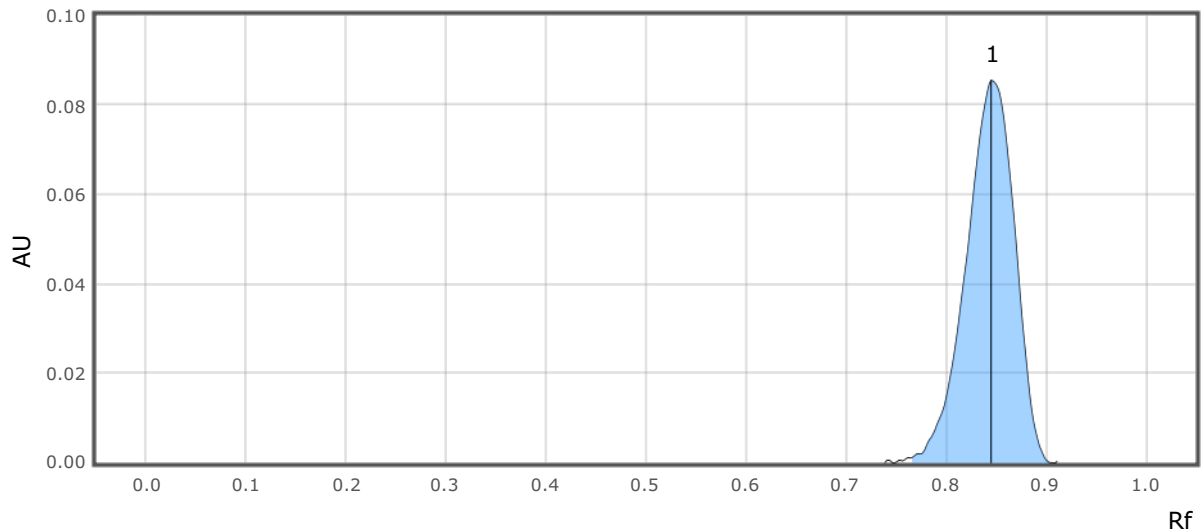
Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.784	0.0054	0.840	0.0270	100.00	0.895	0.0000	0.00151	100.00	No	MGO 126 microg / mL

Track 13:	
Type	Sample
Vial ID	TA 010
Description	TA SPE + 63 ng MGO
Volume	1.0 µl



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.760	0.0022	0.842	0.0922	100.00	0.902	0.0000	0.00518	100.00	No	MGO 126 microg / mL

Track 14:	
Type	Sample
Vial ID	TA 013
Description	TA SPE + 63 ng MGO
Volume	1.0 µl



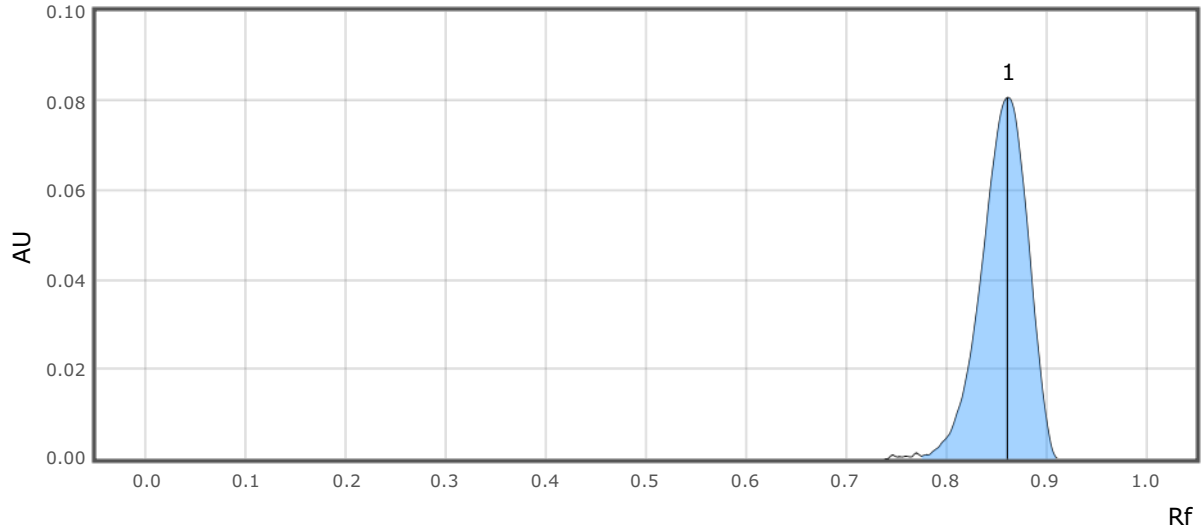
MGO STAND 29 20092023

visionCATS

Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.766	0.0012	0.845	0.0854	100.0 0	0.908	0.0000	0.00483	100.0 0	No	MGO 126 microg / mL

**Track 15:**

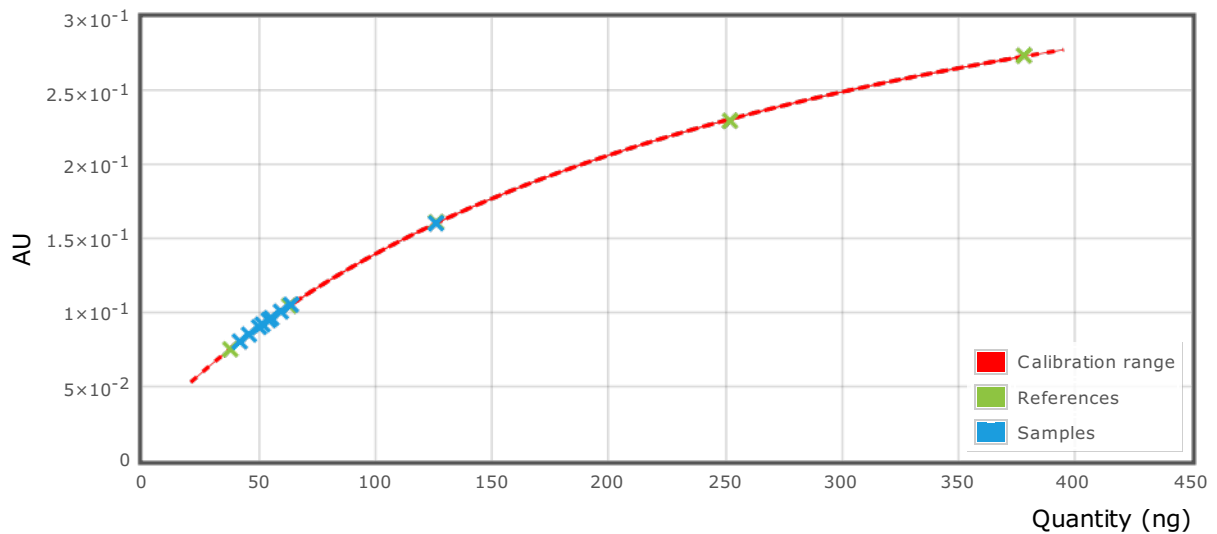
Type	Sample
Vial ID	TA 023
Description	TA SPE + 63 ng MGO
Volume	1.0 µl



Peak #	Start		Max			End		Area		Manual peak	Substance Name
	Rf	H	Rf	H	%	Rf	H	A	%		
1	0.776	0.0006	0.861	0.0807	100.0 0	0.911	0.0002	0.00439	100.0 0	No	MGO 126 microg / mL

**Calibration results:**

Height calibration for substance MGO 126 microg / mL @ 480 nm:



Regression mode	Mime-2
Range deviation	5.00 %
Related substances	Default
Number of references	5
Calibration function	$y = \frac{4.237 \times 10^{-1} x}{2.578 \times 10^{-7} + x} + 2.151 \times 10^{-2}$
Coefficient of variation	CV 0.37 %
Correlation coefficient	R=99.996512 %

## Results:

MGO 126 microg / mL	(9 sample assignments) @ 480 nm		
Sample 'TA 08'	62.98 µg/ml	(CV unavailable)	(1 applications)
Volume: 2.0 µl	62.98 µg/ml	(CV unavailable)	(1 replicas)
Track 5	62.98 µg/ml	126.0 ng	
Sample 'TA 01'	50.08 µg/ml	(CV unavailable)	(1 applications)
Volume: 1.0 µl	50.08 µg/ml	(CV unavailable)	(1 replicas)
Track 1	50.08 µg/ml	50.08 ng	
Sample 'TA 010'	51.61 µg/ml	(CV unavailable)	(1 applications)
Volume: 1.0 µl	51.61 µg/ml	(CV unavailable)	(1 replicas)
Track 13	51.61 µg/ml	51.61 ng	
Sample 'TA 013'	45.77 µg/ml	(CV unavailable)	(1 applications)
Volume: 1.0 µl	45.77 µg/ml	(CV unavailable)	(1 replicas)
Track 14	45.77 µg/ml	45.77 ng	
Sample 'TA 023'	41.85 µg/ml	(CV unavailable)	(1 applications)
Volume: 1.0 µl	41.85 µg/ml	(CV unavailable)	(1 replicas)
Track 15	41.85 µg/ml	41.85 ng	
Sample 'TA 05'	54.18 µg/ml	(CV unavailable)	(1 applications)
Volume: 1.0 µl	54.18 µg/ml	(CV unavailable)	(1 replicas)
Track 2	54.18 µg/ml	54.18 ng	
Sample 'TA 06'	55.40 µg/ml	(CV unavailable)	(1 applications)
Volume: 1.0 µl	55.40 µg/ml	(CV unavailable)	(1 replicas)
Track 3	55.40 µg/ml	55.40 ng	
Sample 'TA 07'	59.44 µg/ml	(CV unavailable)	(1 applications)
Volume: 1.0 µl	59.44 µg/ml	(CV unavailable)	(1 replicas)
Track 4	59.44 µg/ml	59.44 ng	
Sample 'TA 09'	63.79 µg/ml	(CV unavailable)	(1 applications)
Volume: 1.0 µl	63.79 µg/ml	(CV unavailable)	(1 replicas)
Track 6	63.79 µg/ml	63.79 ng	

A track marked with ⚠ means: this result is outside the regression range given by the reference assignments, but is included in the results because it is in the allowed range deviation.

Analyst:

Reviewer: