



UNIVERSIDAD DE BURGOS
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS
ÁREA DE INGENIERÍA QUÍMICA

MASTER EUROPEO EN SEGURIDAD Y BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA
(MENCION DE CALIDAD MCD2005-00119 Y MCD2006-00452).

TESIS DE MASTER

DETERMINACIÓN DE MELATONINA EN LECHE POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Sara Esther Martínez Santamaría

24 de septiembre de 2009



UNIVERSIDAD DE BURGOS
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS
ÁREA DE INGENIERÍA QUÍMICA

Dra. Dña. María Isabel Escudero Barbero
Profesora Titular, Área de Ingeniería Química, Universidad de Burgos
y
Dña. Susana Herrera Silla
Departamento de Innovación, Grupo Leche Pascual S.A.U.

DECLARAN:

Que Dña Sara Esther Martínez Santamaría ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Innovación de la Empresa Grupo Leche Pascual S.A.U. (Aranda de Duero) y en el Área de Ingeniería Química del Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Burgos, el trabajo experimental descrito en la presente memoria, titulado « *Determinación de melatonina en leche por cromatografía líquida de alta resolución.*», que se corresponde con la Tesis del Máster Europeo en Seguridad y Biotecnología Alimentaria, calificado por el Ministerio de Educación con Mención de Calidad (MCD2005-00119 y MCD2006-00452).

Para que así conste y a los efectos oportunos, firmamos la presente declaración en Burgos a 24 de septiembre de 2009.

Fdo. María Isabel Escudero Barbero
Universidad de Burgos

Fdo. Susana Herrera Silla
Grupo Leche Pascual S.A.U.

ÍNDICE

	página
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ESTRUCTURA Y SINTESIS DE MELATONINA	1
1.2. FUNCIONES DE LA MELATONINA.....	3
1.3. APLICACIONES DE LA MELATONINA.....	5
1.4. MELATONINA EN LECHE	6
2. OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	7
3. REVISION BIBLIOGRÁFICA Y EVALUACIÓN DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE ANÁLISIS.....	7
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	13
4.1. MATERIALES Y REACTIVOS.....	13
4.2. EQUIPO HPLC Y CONDICIONES DEL ENSAYO.....	15
4.3. PLANTA PILOTO PARA EL TRATAMIENTO TÉRMICO.....	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
5.1. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE MELATONINA EN LECHE.....	17
5.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA DESTRUCCIÓN TÉRMICA DE MELATONINA.....	21
6. CONCLUSIONES.....	22
7. BIBLIOGRAFIA.....	23

RESUMEN

La presente memoria recoge el trabajo experimental desarrollado en los laboratorios del Grupo leche Pascual S.A.U. (Aranda de Duero), en colaboración con el Área de Ingeniería Química de la Universidad de Burgos, para la puesta a punto de un método de análisis que permite la determinación cuantitativa de melatonina en leche por HPLC. El estudio parte de una revisión bibliográfica y una evaluación de las técnicas desarrolladas por otros autores para determinar melatonina en diferentes muestras, la mayoría biológicas como saliva, sangre y otros humores. A partir de este estudio se han diseñado las experiencias que han permitido conformar la secuencia de etapas previas de acondicionamiento y concentración, así como las condiciones del análisis cromatográfico por HPLC para alcanzar resultados fiables en la determinación de melatonina en leche en concentraciones del orden de 10^{-12} g/mL (ppt).

El método de análisis desarrollado se ha aplicado a las muestras de leche entera tratadas térmicamente en una planta piloto de tratamiento HTST (high temperatura-short time) al objeto de evaluar el efecto de la temperatura sobre la destrucción térmica de la melatonina. Todos los ensayos se realizaron a partir de una misma leche inicial y con el mismo tiempo de procesado. Los resultados muestran niveles de concentración menores a medida que aumenta la temperatura del esterilizador siguiendo un comportamiento lineal, con valores de concentración comprendidos entre 11,21 y 2,73 ppt para temperaturas crecientes entre 120 y 150 °C.

Palabras clave: Melatonina en leche. Determinación por HPLC. Destrucción térmica

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estructura y síntesis

La melatonina es una indolemina, que actúa como hormona en los seres vivos. Su lugar principal de síntesis en los animales vertebrados es la glándula pineal. Glándula que fue descrita por René Descartes hace tres siglos y la denominó el tercer ojo (*De Homine* 1633) por considerarla como el “asiento del alma”, desconociendo el papel fisiológico que desempeñaba. No es hasta el siglo XX cuando estudios más rigurosos de la glándula llevan a considerarla un intrincado y sensible reloj biológico debido a su efecto cronobiótico o de regulación del sueño (1). Este papel era atribuido a la glándula, no a la principal hormona producida por ella, la melatonina.

La melatonina no se describió hasta el año 1958, fue el dermatólogo Aaron Lerner (2) quien la describió como una hormona proveniente de la glándula pineal que “aclaraba los melanocitos”, en la piel de anfibios. A esta hormona, por derivarse de la serotonina y por referencia a la melanina, la denominó melatonina

Por su estructura química la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) se caracteriza por ser una indoleamina amarilla soluble en etanol (al menos 50mg/ml), ligeramente soluble en agua, benceno y menos soluble en éter de petróleo. Su fórmula empírica es $C_{13}H_{16}N_2O_2$, y su peso molecular 232, 28 g/mol

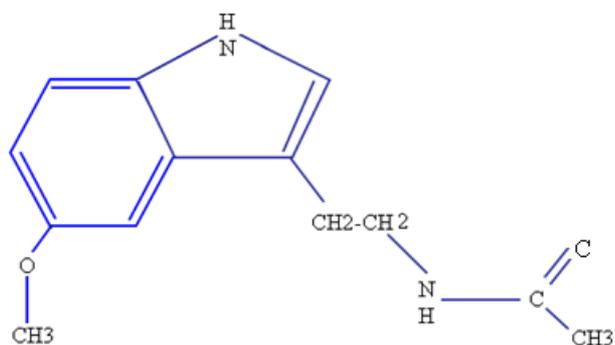


Figura 1. Fórmula empírica de la melatonina: *N*-Acetil-5-metoxitriptamina

La síntesis de melatonina no tiene sólo lugar a nivel de la glándula pineal. En el año 1976 se determinó presencia de melatonina en animales pinealectomizados, lo que confirmaba la idea de otros lugares de síntesis extrapineal (3). Actualmente los lugares de síntesis extrapineal conocidos son: la retina, el cerebelo, los leucocitos, la glándula lacrimal, la glándula harderiana y el tracto gastrointestinal (células enterocromafines).

El mecanismo de síntesis en la glándula pineal es el más conocido y es el siguiente: Los fotorreceptores de la retina transforman las señales lumínicas en señales nerviosas, llevando la información hasta la glándula pineal mediante un circuito neuronal en el que participan distintos nervios: el nervio óptico, el supraquiasmático, y el ganglio cervical superior.

Dentro de la glándula pineal la síntesis de la melatonina, tiene lugar en el pinealocito. Los pinealocitos son un grupo de células que componen en su mayor parte el parénquima de la glándula pineal en los mamíferos, son capaces de recoger o captar el triptófano de la circulación, aunque no está claro como se lleva a cabo este transporte.

Dentro del pinealocito a partir del triptófano se desarrollan cuatro reacciones (ver Fig. 2): A) el triptófano es hidroxilado en la mitocondria a 5-hidroxitriptófano, por la triptófano hidroxilasa. B) Después la mayor parte del 5-hidroxitriptófano se convierte en serotonina en el citosol. C) En un tercer paso, la serotonina es acetilada por la arilalquilamina -N- acetil transferasa, sintetizando N-acetilserotonina. D) En el último paso, la N-acetil serotonina es metilada por la hidroxindol-O-metiltransferasa dando como resultado melatonina.

Una vez sintetizada, la melatonina se difunde hacia el exterior siguiendo un gradiente de concentración y se distribuye por todo el organismo.

La metabolización se produce mayoritariamente en el hígado, y la excreción por vía renal mediante formación de distinto metabolitos. Existen simultáneamente otros lugares de metabolización, aunque en menor media, como es el sistema nervioso central.

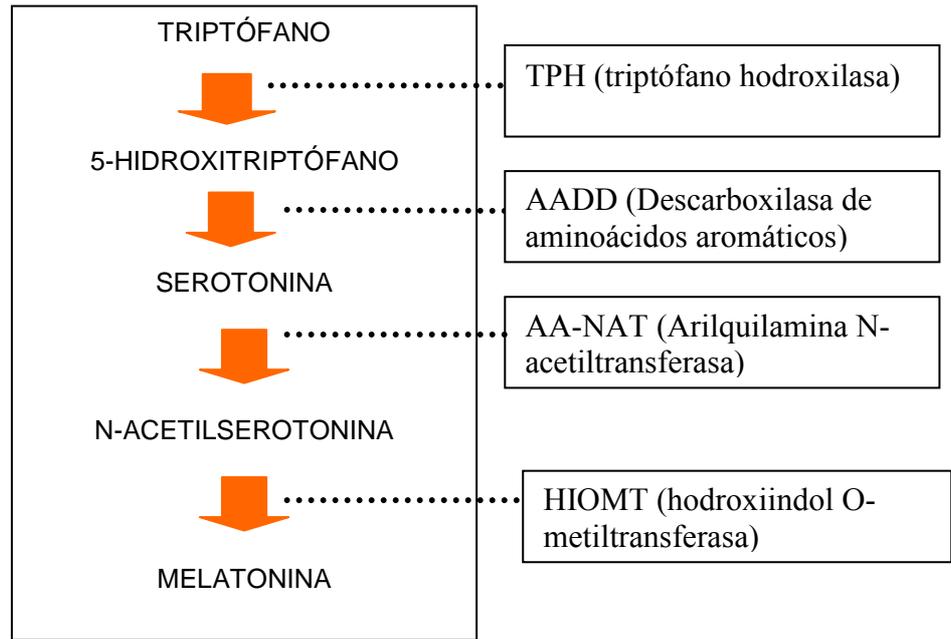


Figura 2: Síntesis de melatonina en el pinealocito según el esquema elaborado por Guerrero et al (3).

1.2. Funciones de la melatonina

Una de las características más conocidas de la melatonina en los seres vivos es la variación de su concentración según la intensidad de luz, ajustándose a un ritmo circadiano diurno /nocturno. Así pues, existen mayores niveles de melatonina en plasma en la oscuridad y menores en las horas de luz. Además de esta variación diaria, existe una variabilidad estacional.

Aunque la función más conocida de la melatonina es esta función cronobiótica, la melatonina participa en gran variedad de procesos celulares, neuroendocrinos y neurofisiológicos que se detallarán más adelante.

Dentro de las funciones atribuibles a la melatonina, encontramos las siguientes en los animales vertebrados: agente cronobiótico, regulador de la función sexual, antioxidante, antienvjecimiento, oncostático e inmunomodulador (3).

La melatonina también está presente en plantas, bacterias y hongos desarrollando funciones menos conocidas. Se cree que la melatonina puede estar relacionada con la regulación circadiana, función citoprotectora, moduladora del citoesqueleto, promotora del crecimiento de raíces, implicada en los mecanismos de expansión celular y protección frente al estrés (4).

El efecto cronobiótico o de regulación del sueño es uno de los efectos característicos de esta hormona y el más ampliamente estudiado. Los tratamientos clínicos con melatonina vienen aplicándose desde hace tiempo con buenos resultados en medicina humana, especialmente indicados en el tratamiento del sueño en personas de edades avanzadas. Existen estudios que sugieren la posibilidad de utilizar la leche de ordeños nocturnos, rica en melatonina para mejorar los problemas de insomnio en ancianos (5), en los que, como veremos más adelante, la producción endógena de melatonina está reducida.

El efecto regulador de la función sexual es otra de sus aplicaciones de gran interés en producción animal. El control de la reproducción ovina se realiza mediante el uso de implantes subcutáneos de melatonina. Las ovejas son poliéstricas estacionales y su ovulación viene inducida por los bajos niveles de luz y los altos niveles de melatonina. La melatonina actúa en el hipotálamo modulando la secreción de otra hormona, la GnRH, encargada de regular el ciclo estral. Mediante el uso de los implantes de melatonina se consigue asegurar la ovulación de estos animales incluso en meses de más luz para la obtención de corderos según la demanda de los consumidores. La utilización de melatonina no es lo único a tener en cuenta en este control reproductivo, junto con los niveles altos de melatonina es necesaria una buena alimentación para que este control reproductivo sea viable (6).

En el hombre, la melatonina tiene también su papel en la maduración sexual. El desarrollo puberal va ligado a un descenso de la melatonina plasmática, una disfunción pineal puede adelantar la pubertad, mientras que la hiperproducción de melatonina puede retrasarla. En relación al ciclo reproductivo, la especie humana no se caracteriza por la presencia de fuertes patrones estacionales, pero se ha comprobado cierta tendencia hacia la distribución estacional de las concepciones. En las latitudes septentrionales, con dos horas extra de secreción de melatonina en invierno aparecen descensos invernales en la concentración de esteroides y en los embarazos (3).

Con respecto a su papel como antioxidante, según el artículo publicado por Guerrero y otros (3) la melatonina se comporta como un potente antioxidante. En particular, neutraliza el radical hidroxilo con una efectividad que multiplica por 5 y por 14 la del glutatión y la del manitol, respectivamente. Además, la hormona se ha mostrado efectiva en la neutralización del peróxido de hidrógeno, el singlete de oxígeno, el anión peroxinitrilo, y el radical peróxido.

Por otra parte, la melatonina protege del daño oxidativo por vía indirecta. Su efecto se produce a través de la activación de las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa, catalasa y superóxido dismutasa; la potenciación de otros antioxidantes como el glutatión y las vitaminas E y C; y el aumento en la eficacia de la cadena respiratoria. Además existen algunos metabolitos con función antioxidante procedentes de la degradación de la melatonina en tejidos extrahepáticos como el Sistema nervioso central (SNC). Es el caso de la N-acetil-5-metoxikinoramida (AMK) y la N-acetil-N-metil-formil-5-metoxikinoramida (AFMK) actualmente en estudio por su capacidad antioxidante (7,8, 9).

Son relevantes los estudios realizados por Antunes *et al* (10) que sugieren que la melatonina es un buen antioxidante “in vitro” pero “in vivo” las concentraciones fisiológicas son muy bajas para desempeñar la función de inhibir la peroxidación lipídica.

También existen estudios incrementando la ingesta de melatonina de forma externa. Velkov *et al* (11), señalan que el incremento de los niveles de melatonina por vía exógena protege eficazmente las estructuras lipídicas de membrana.

En cuanto a su función antienviejecimiento no existen suficientes datos que permitan afirmar de forma contundente que la melatonina es un agente rejuvenecedor aunque sus acciones sobre distintos procesos biológicos repercuten de forma beneficiosa en el envejecimiento. Además, la síntesis de melatonina no es constante a lo largo de la vida. En el caso del hombre (donde existen más estudios de su concentración a lo largo de la

vida) su producción comienza a los tres o cuatro meses de edad, aumentando hasta un máximo entre los 8 y los 10 años. Entre los 15 y 20 años ocurre una caída en los niveles del 80 % debida probablemente al incremento de la talla del cuerpo, a pesar de la producción constante de melatonina después de la infancia. Durante las décadas siguientes el contenido de melatonina disminuye moderada y progresivamente hasta los 70-90 años, en que sus niveles son los más bajos. Existen estudios sobre la administración de melatonina a roedores adultos, consiguiendo una prolongación de su vida entre un 10 y un 15% (3).

Un potencial uso terapéutico de la melatonina, es su uso como oncostático en humanos. La administración de melatonina reduce el crecimiento tumoral y prolonga la supervivencia, sobre todo en cánceres dependientes de hormonas reproductoras como el de mama o el de ovario (3). Se supone que la melatonina influye directamente en el cáncer de mama a través del sistema inmunitario, e indirectamente por el sistema neuroendocrino que a su vez regula el inmunitario.

La capacidad inmunomoduladora de la melatonina esta demostrada “in vivo” e “in vitro”, siendo la hormona capaz de modular la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, promueve un aumento de peso de órganos inmunitarios y estimula su función a través de la activación de la proliferación celular y de mediadores inmunológicos en timo, bazo y médula ósea. Además, estimula la actividad de neutrófilos, macrófagos y células NK (natural killer) y modula la producción de citoquinas. Respecto a la inmunidad adaptativa, la melatonina favorece el incremento de los linfocitos B y T, regula tanto la respuesta humoral como la celular por medio de la modulación de mediadores, como la 5-lipoxigenasa o la IL-2 (3).

Se han determinado cuatro mecanismos a través de los cuales la melatonina es capaz de realizar las funciones anteriormente descritas. Es capaz de unirse directamente a los receptores de membrana MT_1 y MT_2 . La melatonina es capaz de pasar fácilmente la membrana plasmática debido a su carácter lipofílico, una vez atravesada esta membrana es capaz de actuar directamente como neutralizador de radicales libres o interaccionar con proteínas citosólicas como la calmodulina, proteína quinasa C y la proteína MT_3 . Como último mecanismo conocido está el de interacción directa con los receptores nucleares pertenecientes a la familia RZR\ROR, ya que la melatonina es capaz de llegar al núcleo (3)

Según Hardeland (8), la diversidad de acciones de la melatonina, el número demostrado de lugares de unión, las diferentes proteínas G de acoplamiento de membrana, la existencia de numerosas células y órganos de actuación, la formación pineal y extrapineal de melatonina y la posibilidad de acciones adicionales por los metabolitos formados demuestran una excepcional pleiotropía. Esto puede reflejar la diversidad de funciones, pero también la complejidad del problema cuando se quieren designar acciones específicas en términos experimentales y de aplicación.

1.3. Aplicaciones de la melatonina

En la actualidad la melatonina es consumida en algunos países para combatir los problemas de insomnio, para el *jet-lag* y en ocasiones para ralentizar el envejecimiento. Como hemos comentado anteriormente, también se usa en tratamientos antitumorales.

En España, la melatonina es un producto de investigación clínica y no es fácil adquirirlo, sin embargo en otros países se puede adquirir como suplemento en tiendas

de dietética. La dosis de administración de melatonina oscila entre 0,5 y 3 mg al día, debiendo ingerirse normalmente una hora antes de acostarse.

Según los beneficios que proporciona la melatonina anteriormente vistos, sería interesante conocer los niveles de melatonina en los alimentos para consumo humano ya que, el consumo de alimentos con mayor contenido en melatonina podría beneficiar al consumidor mejorando la regulación del sueño por incrementar los valores en sangre, pudiendo ser también importante por su papel para delimitar el daño oxidativo, como rejuvenecedor, o por su papel defensivo.

La melatonina está presente en diferentes alimentos como la leche, objeto del presente estudio, y en algunos alimentos de origen vegetal en concentraciones sensiblemente superiores como en las cerezas. Su estudio y determinación puede constituir una forma interesante de incrementar el nivel de melatonina en sangre mediante la dieta.

Existe la posibilidad de añadir melatonina sintética a los alimentos, muy utilizado en experimentación y en el tratamiento de algunas enfermedades.

En España, la incorporación de melatonina a la dieta aludiendo a sus propiedades funcionales no está autorizada.

El argumento de que la melatonina está presente de forma natural en ciertos alimentos, no debe ser lo único a tener en cuenta para promocionar su consumo, ya que, aunque la melatonina es bien tolerada por nuestro organismo y los niveles de melatonina en plasma se incrementan por dietas ricas en melatonina o decrecen si esta melatonina ha sido destruida en la comida (8), no debemos olvidar que la melatonina desempeña muchas funciones y son necesarios estudios de seguridad que garanticen que elevar la dosis de esta hormona en el organismo no comporta efectos no deseables para la salud.

1.4. Melatonina en leche

Los datos publicados de reses bovinas indican que los niveles de melatonina en la leche presentan un ciclo similar al visto en plasma, es decir incremento durante las horas sin luz. Los estudios realizados por Eriksson *et al* (12) demuestran que la exposición de las reses bovinas a niveles determinados de melatonina inyectada en sangre produce un efecto correlativo en los niveles de melatonina en la leche con un corto retraso de tiempo (15/30 minutos después).

La concentración de melatonina en leche de vaca puede variar entre 5-25 ppt (13) con las máximas concentraciones a medianoche dependiendo de la hora de ordeño, de los meses en que se realiza y del estado de lactación. Por ello, los mayores niveles de melatonina en la leche se encontraran en los ordeños nocturnos de los meses de invierno.

Existen patentes para la producción de leche y productos lácteos que consideran la relación de estos factores con el contenido de melatonina (14,15).

Además se han comercializado leches ricas en melatonina en otros países, la primera en comercializarse fue en Finlandia en 1999, después le han seguido el Reino Unido, Japón y Tailandia. Su fabricación se basa en la selección de leche de ordeños nocturnos, con un posterior tratamiento térmico leve (pasterización), llevando consigo un incremento considerable de su precio en el mercado frente a la leche en la que no se ha realizado esta selección.

No se han encontrado referencias de estudios de estabilidad térmica de melatonina en la leche de vaca, pero hay que destacar que las leches comerciales “ricas en melatonina” existentes en el mercado sufren un proceso de pasteurización, tratada generalmente con una temperatura de unos 72°C durante 15 segundos, frente a la leche etiquetada como “ultrapasteurizada” o “UHT” que ha sido tratada a una temperatura que ronda los 138° durante un periodo de al menos 2 segundos, suponiendo un descenso de los niveles de melatonina existentes.

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

El objetivo del presente trabajo es el estudio del efecto térmico sobre el nivel de melatonina presente en la leche. En este estudio se entiende por leche, la secreción de la glándula mamaria de los mamíferos, ya que también pueden recibir este nombre algunos productos comercializados de origen vegetal como la leche de soja o la leche de coco.

Nuestro interés se centra en la leche de vaca para consumo humano, tras un procesado de normalización y tratamiento térmico.

Para alcanzar estos objetivos, el trabajo se ha dividido en tres sub-etapas que tratan de alcanzar los siguientes objetivos concretos:

1. Revisión bibliográfica de las técnicas analíticas publicadas por otros autores para la determinación de melatonina
2. Desarrollo y puesta a punto de un método de análisis para la determinación cuantitativa de melatonina en leche que permita determinar cantidades del orden de ppt (partes por trillón = 10^{-12} g/mL).
3. Estudiar la estabilidad térmica de la melatonina mediante aplicación de la técnica analítica desarrollada anteriormente a la leche tratada térmicamente a diferentes temperaturas de ultrapasteurización.

3. REVISION BIBLIOGRÁFICA Y EVALUACIÓN DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE MELATONINA

Las primeras referencias bibliográficas para la determinación cuantitativa de melatonina se refieren a bioensayos en los que se utilizaba la piel de renacuajos. Estos métodos se basaban en la inducción de la agregación de los gránulos de melanina dentro de los melanóforos (melanocitos) dérmicos de renacuajos por parte de la melatonina. Según consta en la la revisión de Harubi *et al* (16), en relación a los trabajos realizados por Ralph *et al* (1997), la valoración de la respuesta de estos melanóforos dérmicos a la melatonina a lo largo de 5 estadios proporcionó una relación lineal entre el logaritmo de la concentración de melatonina de 0.4 a 4.3 pmol/l y el índice de melanóforo.

Los trabajos más recientes están destinados a conocer la cantidad de la hormona en distintos tejidos animales como en la glándula pineal en ratas (17,18,19) o distintos fluidos corporales, como sangre o plasma (20,21), saliva (19), líquido cefalorraquídeo (21) y orina (18, 22).

En el campo de los alimentos, existen estudios de determinación de melatonina en cerezas y derivados (tartas) (23,24), nueces, (25), cerveza (26), uva (27), vino (28) y en

otros alimentos de origen vegetal cuyo contenido en melatonina es inferior como: tomates, pepinos, semillas de girasol, plátanos, manzanas, naranjas, arroz, coles... (29) y cebada (4).

En la revisión realizada por Harumi (16), se recogen algunos de los métodos usados para las determinaciones de melatonina: desde cromatografía plana y distintos tipos de cromatografía líquida, hasta llegar a la cromatografía de gases (CG) y a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que se ha generalizado para este tipo de ensayos.

Dentro de la cromatografía de gases, la más usada es la cromatografía gases / masas (CG-MS). Esta técnica proporciona un método alternativo para una determinación específica, y en algunos ensayos se han podido comprobar mejores niveles de sensibilidad que con HPLC, pero su uso es inferior debido al mayor coste y mantenimiento de la CG.

Existen otros métodos de detección de la hormona, mediante técnicas de unión a receptores de anticuerpos. Dentro de éstas podemos distinguir dos: método ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay/ ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) en la que la unión se realiza por medio de enzimas y radioinmunoanálisis (RIA) en la que existe una unión antígeno-anticuerpo. El uso de estas técnicas para la estimación de melatonina en plasma, suero y algunos alimentos está bien establecido y existen kits comerciales para su determinación (26,27).

Nos centraremos en los métodos que utilizan HPLC, ya que el equipo que nos proporciona la empresa para llevar a cabo el análisis se ajusta a esta técnica de análisis. Además la bibliografía más actual sobre determinación de melatonina en leche se realiza utilizando cromatografía líquida de alta resolución HPLC (30).

La cromatografía líquida de alta resolución, en fase reversa (RP-HPLC) es muy útil para una determinación cualitativa y cuantitativa de indoleaminas. Este tipo de HPLC es la más usada, normalmente se denomina HPLC sin ninguna especificación adicional.

RP-HPLC consiste en una fase inmóvil apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica tratada con RMe_2SiCl , donde la R es una cadena alquílica tal como $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ ó C_8H_{17} . El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

Dentro de esta cromatografía líquida los métodos de detección utilizados han sido la detección por fluorescencia y electroquímica.

Según los artículos consultados, parece que el método de detección asociado a HPLC más adecuado para la detección de la melatonina es la fluorescencia (17, 18,19,20,21,22,23,30,31,32) ya que la melatonina posee fluorescencia cuando es irradiada a ciertas longitudes de onda, por lo tanto se puede utilizar esta capacidad de la hormona para su detección. Además, como veremos mas adelante, existen productos de la oxidación de la hormona que incrementan esta fluorescencia. El tipo de columna asociado a este tipo de análisis son columnas de fase reversa C-18 con una fase estacionaria de dimetil-n-octadecilsilano.

Según los artículos de referencia revisados, la puesta a punto para llevar a cabo nuestro análisis se puede dividir en cuatro puntos.

1. Homogeneización de la muestra, pre-limpieza de la muestra.
2. Derivatización.
3. Extracción para separar compuestos polares.
4. Análisis cualitativo y cuantitativo mediante técnicas de HPLC.

1. Homogeneización de la muestra, pre-limpieza de la muestra

La leche es una matriz compleja donde existen gran cantidad de compuestos que van a interferir en nuestro análisis. Para ello es necesario limpiar las muestras de leche y extraer la melatonina. El paso de la homogeneización no es tan importante, porque partimos ya de una leche previamente normalizada.

Además la cantidad de melatonina en la leche de vaca se encuentra en torno a 5-25 ppt (13). Es una cantidad baja y como veremos insuficiente para un análisis directo (sin concentrar). Por lo que este primer paso tiene una triple función: extraer, limpiar y concentrar la muestra

En la bibliografía se han encontrado distintos métodos para llevar a cabo este primer paso.

Existen estudios sobre cerezas que utilizan una extracción con cloroformo (23,24). En el primer caso (23) se realiza una homogeneización con fosfato potásico 0,05M (pH. 8), centrifugación a 4°C y 3000 rpm durante 5 minutos, añadiendo solución 1M KOH para incrementar el pH de las muestras y posterior extracción con cloroformo (en esta caso se inyecta) y posteriormente la melatonina es medida mediante detección electroquímica. En el segundo caso (24), la homogeneización se realiza también con fosfato potásico, centrifugando a 4°C y 1000 rpm durante 10 minutos, seguida de extracción con cloroformo y adición de solución 1M KOH. Finalmente se seca la muestra, se reconstituye en una solución 0,45% ácido fórmico y se determina mediante HPLC, con detección electroquímica.

Otros autores utilizan una disolución de ácido tricloroacético para precipitar las proteínas (21). Las muestras a analizar, plasma y fluido cerebroespinal, se introducen en hielo durante 10 minutos y se centrifuga a 5000 G durante 10 minutos. Posteriormente se ajusta el pH a 7.4 con 1M NaOH. Tras este paso, se toma el sobrenadante y se realiza una extracción sólido –líquido (ver más adelante).

Otra opción es la utilizada por distintos autores en distintas matrices (saliva, glándula pineal) añadiendo a la muestra metanol y centrifugando a 4500 G durante 5 minutos, tras lo cual se extrae el sobrenadante y se lleva a sequedad (17, 18, 19).

Egoshi (30), cuyos estudios se realizan en leche cruda, utiliza una incubación de la muestra con papaina a 45 °C durante 30 minutos, parando la reacción con ácido tricloroacético y centrifugando. Posteriormente el sobrenadante es extraído con cloroformo, lavado con agua y evaporado a sequedad. También se evalúa por fluorescencia.

2. Derivatización

No todos los autores consultados realizan este paso pero parece útil cuando el método de detección seleccionado es la fluorescencia, como es nuestro caso.

La melatonina presenta fluorescencia que es fácilmente detectable (16), pero se ha demostrado que existen productos de la oxidación de la hormona que aumentan esta fluorescencia, para ello es necesaria la derivatización con el uso de carbonato sódico (medio alcalino) y agua oxigenada (17,18, 19, 30).

Se detecta la melatonina oxidada, que presenta una mejor detección a 245 nm $Ex\lambda$ (energía de excitación) - 380 nm $Em\lambda$ (energía de emisión), mientras que la melatonina sin derivatizada presenta mayor fluorescencia a 280 nm $Ex\lambda$ - 330 nm $Em\lambda$ (pero el índice de detección es inferior a la oxidada). La fluorescencia del compuesto derivatizado de la melatonina a 245 nm $Ex\lambda$ -380 nm $Em\lambda$ presenta una fluorescencia 6,8 veces mayor que la melatonina (18).

La estructura de este compuesto fluorescente fue determinada por Tomita *et al* (18), aunque ya existían estudios previos que utilizaban esta oxidación (17). Se determinó como la N-((6-metoxi-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-il) metil) acetamida (6-MOQMA).

Según los estudios de Tomita *et al* (18). El compuesto formado de la derivatización de la melatonina es estable en solución acuosa durante más de 6 meses a 4°C.

Hay muchos artículos en relación a la oxidación de los indoles incluyendo la melatonina, pensando que se oxida fácilmente a N-formilquinurenina. La oxidación en las posiciones 2° 3° de la fracción indol es bien conocida. De acuerdo con la estructura del nuevo componente fluorescente obtenido en estos métodos, la fracción indol se convierte en la fracción 4-oxo-1,4-dihidroquinolina.

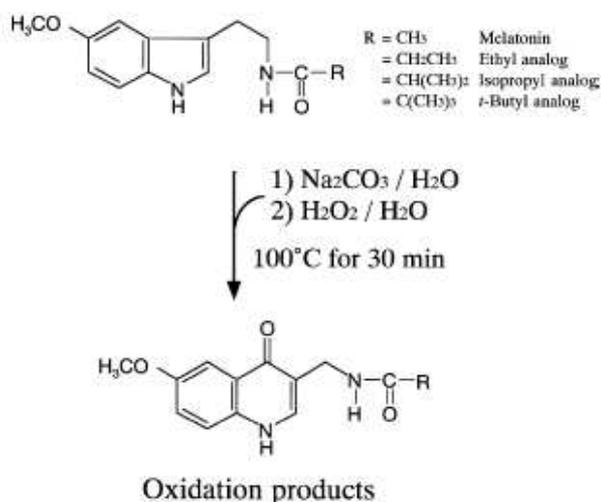


Fig. 1. Oxidation of melatonin and synthesized melatonin analogs.

Figura 3- Oxidación de melatonina para dar N-formilquinurenina, según el esquema de Hamase *et al* 2004 (19).

Egoshi (30) en sus estudios, reduce el tiempo de oxidación, considerando suficiente un tratamiento de 94 a 96°C durante 6 minutos para llevar a cabo la derivatización correctamente con el uso de sulfato de cobre, además del agua oxigenada y el carbonato sódico. Egoshi realiza un estudio con los tiempo /fluorescencia y molaridad de los compuestos utilizados en la derivatización

También existen estudios que valoran realizar esta derivatización con hemin, carbonato sódico y percarbonato sódico (31). Utilizando estos compuestos se estudia la variación de la fluorescencia según el tiempo de calentamiento a 100°C. La fluorescencia del nuevo compuesto derivatizado se mantiene entre 10 y 60 minutos, fijando el tratamiento de calentamiento de la muestra en 15 minutos a 100°C.

Estos mismos autores estudiaron previamente de aumento de la fluorescencia con hexacianoferrato de potasio (III) a 80 °C durante 20 minutos con buena oxigenación (32).

3. Extracción.

El objetivo de esta segunda extracción es la separación de algunos compuestos polares (limpieza) tras la derivatización. Estos compuestos polares pueden interferir en nuestro análisis, además vamos a concentrar más la muestra. Este proceso es necesario cuando se trabaja con muestras complejas biológicas, pero no es necesario cuando las determinaciones se realizan en soluciones simples de melatonina (en agua, metanol, etc). En los procesos realizados por Iizuka *et al* (31 y 32) el paso de derivatización es distinto, y tras esta derivatización inyectan directamente en columna, pero las muestras son disoluciones sencillas de melatonina.

La etapa de extracción, tras la derivatización, se puede llevar a cabo de dos formas

3.1 Extracción sólido –líquido, mediante el uso de cartuchos comerciales

- Cartuchos RP _select B, Merck con lavado posterior de metanol (17).
- Cartucho Waters Oasis HLB (1cc, 30mg) con posterior lavado con metanol (29).

3.2 Extracción líquido-líquido

Esta extracción se puede hacer mediante el uso de acetato de etilo (16, 17), en 3 etapas sucesivas de extracción, posterior desecación y rehidratación con agua, o agua con porcentajes distintos de acetonitrilo. Tomita *et al* (16) consiguen una extracción del 86,9 % de la melatonina derivatizada, con el uso del acetato de etilo, porcentaje de extracción mayor que el obtenido con el dietil éter, benceno y hexano.

Existen estudios en los que no existe el proceso de derivatización, pero si existe este proceso de extracción sólido-líquido (uso de columnas de extracción Chem-Elut) (21).

4. Condiciones de HPLC

En el cuadro adjunto se recogen las condiciones del análisis por HPLC y el tipo de columna utilizada en la determinación de melatonina con detector de fluorescencia a partir de diferentes tipos de muestras.

- Tomita *et al* (17)...Fase móvil condiciones isocráticas ...CH₃CN/TFA/H₂O 10/0,01/90 (v/v), columna CAPCELL PACK 18MG (shiseido), con varios diámetros internos 1.00, 1.5 y 2.00 mm i.d, con flujos de 0.2, 0.1 y 0,05 ml/min para las columnas de 1.00, 1.5 y 2.00 mm i.d respectivamente. Temperatura del horno de la columna 40°C... Exλ 245nm a Exm 380nm
- Tomita *et al* (18).....Fase móvil condiciones isocráticas... TFA/CH₃CN/H₂O 0,01/5/95 (v/v), columna CAPCELL PACK 18MG (shiseido) 1mm x 75mm, con flujo de 0,1ml/min. Temperatura del horno de la columna 40°C. Exλ 380nm a Exm 245nm
- Hamase *et al* (19)...a) Fase móvil condiciones isocráticas... CH₃CN /TFA/H₂O 15/0,05/85 (v/v), columna CAPCELL PACK 18 MG (shiseido) 150mm x 2.00 mm i.d, flujo de 0,2ml/ min. Temperatura del horno de la columna 40°C. Exλ 247nm a Exm 392nm
- Hamase *et al* (19)...b) Fase móvil condiciones isocráticas. CH₃CN /TFA/H₂O 10/ 0,05/ 90 (v/v), columna CAPCELL PACK 18 MG (shiseido) 75mm x 1mm, con flujo 5ml/min. Temperatura del horno de la columna 40°C. Exλ 247nm a Exm 392 nm
- Egoshi *et al* (30)....Fase móvil en gradiente 50mmol/L tampón fosfato de sodio (pH 7) / CH₃CN (0 min., 87/13 25min 82/18 v/v). Columna TSKgel ODS-80Ts i.d 4.6mm x 250mm, y guarda columna 3.2 x15 mm i.d, flujo 0,6 mL/min. Temperatura del horno de la columna 40°C. Exλ 245nm a Exm 380nm
- Iizuka *et al* (31).....Fase móvil condiciones isocráticas. 0,05 mol/ l Tris -HCl tampón (pH 7)/ CH₃CN 90/10 (v/v), Columna Waters XTerra RP18 3.5 μm (2.1 x 150mm) y guarda columna Waters XTerra RP18 3.5 μm (2.1 x 20mm), flujo de 0.15ml/min. Temperatura del horno de la columna 50°C. Exλ 247nm a Exm 384nm

Figura 4. Cuadro con las condiciones de análisis por HPLC con detector de fluorescencia para la determinación de melatonina derivatizada 6-MOQMA

El tipo de elución en la mayoría de los procedimientos vistos, es una elución isocrática excepto en uno de ellos (30) en que se utiliza una elución en gradiente.

La fase móvil de elución es acetonitrilo/agua, cuya concentración varía desde un 5 % (17) a un 18 % (30) de acetonitrilo. La concentración de acetonitrilo va a influir en los tiempos de retención, al tratarse de HPLC-RP se espera que los tiempos de retención de la melatonina se acorten al incrementar el % de acetonitrilo. Esta concentración es necesario ajustarla al tipo de muestra para conseguir tiempos que nos permitan la separación de los compuestos que contienen. También será necesario elegir una longitud y diámetro de columna adecuada al estudio. En sus estudios Hamase (19) utiliza distintas condiciones en cuanto a % de acetonitrilo y columna si el análisis se realiza en glándula pineal o en saliva humana, (a) y (b) respectivamente en el cuadro 2. Cuando el estudio se realiza en saliva, es necesario aumentar el tiempo del análisis.

Otra variable importante es el pH ya que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, algunos métodos utilizan un tampón como el fosfato de sodio (30) o Tris-HCl (31) para controlar el valor del pH. Estos tampones controlan el pH pero también neutralizan la carga o cualquier resto de silica de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contraiones que neutralizan la carga del compuesto. El efecto de los tampones sobre la cromatografía puede variar, pero en

general mejoran la separación cromatográfica. Otro argumento a favor del uso de tampón son los estudios realizados por Iizuka *et al* (31) que indican una mayor fluorescencia a pH entre 7 y 8 e intensidad de 247 nm Emλ - 384 nm Exλ utilizando como fase móvil 10 % de acetonitrilo.

El uso de ácido trifluoroacético (TFA) también ha sido utilizado por algunos autores para mejorar la separación cromatográfica (17, 18, 19), en los que se puede observar que la adicción de TFA no afecta a la fluorescencia.

Para cuantificar, se puede recurrir al uso de patrones internos. Algunos de los más utilizados se indican a continuación:

- El 5-metoxindol-3-ácido-acético (MIAA) por sus cambios similares durante la oxidación. Además el máximo nivel de fluorescencia se registra en el mismo rango que la melatonina, MIAA (17, 18).
- Utilización de análogos de la melatonina, (etil análogos, isopropilo análogos y t-butil análogos) sintetizados a partir de 5-metoxitriptamina y ácidos anhídrido (19). Estos análogos de la melatonina se caracterizan por tener cadenas alcalinas más largas, son oxidados de la misma forma que la melatonina y son más hidrofóbicos que el MIAA (Figura 3), por lo que el análisis con columna HPLC de fase inversa, consiguen retrasar que el tiempo de retención. Estos análogos aparecen después de la melatonina (MIAA, sale antes que el derivado de la melatonina), evitando interferencias con otros compuestos más hidrofílicos.
- Uso de 1, 2, 3,4-tetrahidrocarbazol (31), evaluando la utilización frente al MIAA, 5-metoxigramine, 5metoxi-3indoliacetoneitrilo y 1, 2, 3,4 tetrahydro-β- carboline. Por las semejanzas que presentan estos compuestos tras la derivatización con la melatonina derivatizada (6-MOQMA). Al igual que los etil-análogos, su tiempo de retención va a ser mayor que el 6-MOQMA.

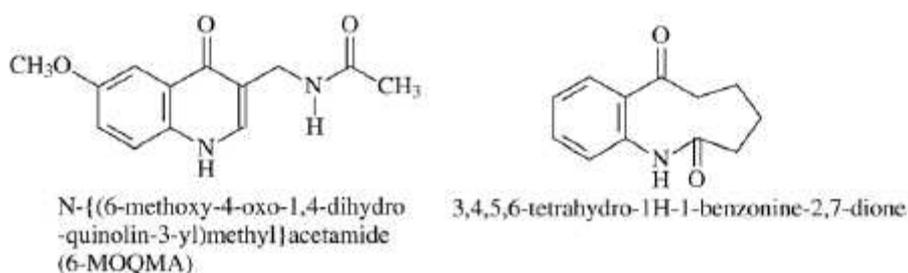


Figura 5. Estructura molecular de la forma oxidada de la melatonina y el compuesto de la oxidación del 1, 2, 3, 4-tetrahidrocarbazol por H. Iizuka *et al.* (31)

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Materiales y reactivos

Materiales

Embudos de separación de 250 ml, matraces de 100ml, 250 ml, 500 ml, matraces aforados de 100 ml y de 1000 ml, micropipetas de 100-1000 μl, pipetas de vidrio de 5 ml, pipetas Pasteur, vasos de precipitados de distintos tamaños, vasos de centrífuga de

150 ml, tubos de 50 ml para turvovap, tubos de ensayo de 10 ml, probetas de 250 ml, sistema de filtración de disolventes para HPLC, filtros de membrana Millipore de nitrocelulosa de 0.45µm, jeringas de 1 ml, viales de 2 ml para inyección en HPLC, insertos para los viales, filtros millipore 0.45 µm de PVDF hidrofílico, centrífuga, turvovap, báscula de precisión, baño multiplazas (para tubos de ensayo), pHmetro Crisol, baño de ultrasonidos.

Reactivos

- Melatonina y patrón interno de laboratorios Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA).
- Acetato de zinc (99,5%), ácido acético glacial (99,7%), hexacianoferrato (II) de potasio 3-hidrato (99-102 %), carbonato sódico anhidro (99,5-102%), fosfato potásico dihidrógeno (99-101%), hidróxido sódico 0,1N de los laboratorios Panreac (Barcelona, España).
- Acetato de etilo multisolvente HPLC (99,86%), acetonitrilo multisolvente HPLC (99,97%), peróxido de hidrógeno 35%v/v, cloroformo, sulfato sódico anhidro (98,5-100.5%) de los laboratorios Scharlau (Setmenat, España).
- Nitrógeno comprimido de carburos metálicos S.A. (Barcelona, España).
- Agua milliQ, purificada por sistema Milli-Q (Millipore).

Preparación de reactivos Carrez.

Protocolo de elaboración según esta recogido en el Diario Oficial de la Unión Europea del 12.2.2008

- Carrez I: Se disuelven 219,5 g de acetato de zinc en agua, en un vaso de precipitados. Se pasan, enjuagando el vaso, a un matraz aforado de 1000 ml, se añaden 30ml de ácido acético, se mezclan bien y se enrasa con agua
- Carrez II: Se disuelven 106,0 g de hexacianoferrato (II) de potasio en agua, en un vaso de precipitados. Se pasan, enjuagando el vaso, a un matraz aforado de 1000 ml, se mezcla bien y se enrasa con agua.

Ambas soluciones pueden conservarse un máximo de 6 meses a temperatura ambiente.

Preparación de compuestos derivatizantes

- Na₂CO₃ 2M: Se pesan 21,198 gr de carbonato sódico anhidro en un vaso de 250 ml, se disuelven en agua ultrapura MilliQ, se traspara a un matraz aforado de 100 ml. Posteriormente se lleva a un baño de ultrasonidos para favorecer la disolución y se enrasa.
- H₂O₂ 50 mM: En un matraz aforado de 100 ml, tomamos 86,7µl de peróxido de hidrógeno 35 % v/v y enrasamos con agua ultrapura MilliQ.

Preparación de la fase móvil, tampón (Ph 7) 50 mm/l KH₂PO₄.

Se pesan 7,8 gr. de KH₂PO₄, y se disuelven en agua ultrapura MilliQ, ajustando el pH a 7 con hidróxido sódico 0,2 N (sosa) y enrasando el matraz de 1000 ml. Antes de utilizarse como fase móvil, se pasa la disolución por un sistema de filtración de disolventes para HPLC con un filtro de membrana Millipore de nitrocelulosa de 0.45µm.

4.2. Equipo HPLC y condiciones del ensayo

El equipo de HPLC que nos proporciona la empresa para llevar a cabo los análisis es el siguiente: Sistema de bomba con inyector Waters 2695 Separations Module (Alliance), detector de fluorescencia Waters 474 Scanning Fluorescent Detector (Alliance), compartimento termostatzado de columna con un sistema Waters 410, Differential Refractometer 410 (Alliance), columna de 4,6 x 250 mm, 5 μ m (Gemini 5u C18 110A de Phenomenex), columna de 4,6 x 150 mm , 5 μ m (ZORBAX Eclipse XDB -C18 de Agilent Technologies), guarda columna (SecurityGuard cartridge Gemini C18 4 x 3mm phenomenex).

Solfawe: Empore 2, Build 2154 Waters (copyright 2005-2008 waters corporation)

Las condiciones para llevar a cabo el análisis fueron, el uso de la columna de 4,6 x 250 mm, 5 μ m (Gemini 5u C18 110A de Phenomenex), y la guarda columna (SecurityGuard cartridge Gemini C18 4 x 3 mm phenomenex.). Gradiente con fase móvil 50 mmol/L tampón fosfato (pH=7) / acetonitrilo (0 min., 87/13- 25min 82/18 v/v) flujo 0,6 ml/min. EL volumen de inyección se fijó en 100 μ l. La temperatura del horno de la columna se fijó en 40 °C

Los parámetros de detección de fluorescencia se fijaron en Ex λ 245nm a Em λ 380nm.



Figura 6. Foto del equipo HPLC.

4.3. Planta piloto para el tratamiento térmico

Las pruebas de estabilidad térmica de la melatonina se llevaron a cabo en la planta piloto de la empresa Pascual S.A.U. Las características de la planta permiten controlar las condiciones de temperatura y tiempos. Una de las finalidades de esta planta es llevar a cabo estudios cinéticos y de estabilidad térmica bajo diferentes condiciones de operación para el diseño de nuevos productos. A diferencia de la planta industrial en

donde el tratamiento térmico UHT se realiza por contacto directo con vapor, en la planta piloto el tratamiento térmico se realiza con intercambiadores de calor.

La planta se puede configurar según las necesidades del proceso mediante distintos codos que se van colocando manualmente para establecer un circuito concreto. Las partes fundamentales son: recipiente de recogida de muestra, pre-calentador, homogeneizador, pasteurizador, esterilizador, pre -enfriador, segundo homogeneizador, enfriador, zona de envasado (aséptico o no aséptico). En las Figuras adjuntas se muestran el diagrama de flujo de la planta piloto y fotografías. Se trata de un equipo montado por la empresa ROSSI CATELLI (Parma, Italia).



Figura 7. Diagrama de flujo de la planta piloto



Figura 8. Fotos de la planta piloto con indicación de algunas de sus zonas: 1. Depósito de recepción, 2. Homogeneizador, 3. Pasteurizador, 4. Esterilizador.

En esta planta se puede controlar la temperatura de paso por las distintas zonas, así como el tiempo que permanece en cada zona que depende de la presión, de la longitud y sección del intercambiador y de la densidad del alimento.

Un ciclo de operación conlleva la realización de tres etapas:

1. Esterilización: con agua, siempre antes de que se introduzca cualquier alimento.
2. Operación: bajo las condiciones de establecidas para el tratamiento concreto.
3. Limpieza: siempre tras el proceso de trabajo, mediante el uso de sosa (hidróxido sódico, Na OH) y ácido nítrico (HNO₃) en el caso de leche.

Las condiciones de temperatura establecidas en los ensayos del presente trabajo fueron: T^a de pre-calentador: 60 °C, T^a del pasteurizador 85 °C, T^a del esterilizador 120°C /130 °C/140 °C/150 °C., T^a del pre-enfriador 50 °C, T^a del enfriador 4 °C. Tiempos de permanencia: t en el pasteurizador= 30 s, t en la unidad UHT = 60 s, t hasta enfriamiento = 5 s.

Para las pruebas de estabilidad térmica se trabajó con 4 litros de leche normalizada entera (grasa 3,5%). A cada litro de leche se le sometió una temperatura distinta en el esterilizador de la planta piloto. Tras este tratamiento las muestras se congelaron en vasos de 150 ml hasta su análisis según el método desarrollado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE MELATONINA EN LECHE

Homogenización y prelimpieza

Para llegar al método definitivo se han probado múltiples procesos de prelimpieza.

Uno de los principales compuestos que interfieren en el análisis son las proteínas, por lo que es necesario que precipiten previamente, junto con la eliminación de la grasa.

Se intento realizar este primer paso con metanol y centrifugación, tomando el sobrenadante y llevándolo a sequedad (nitrógeno y 50°C). Durante este proceso de secado precipitan parte de las proteínas que no han precipitado previamente y van a interferir en el análisis.

Otra posibilidad que se estudió fue el uso de ácido tricloroacético con posterior extracción de la melatonina del sobrenadante con cloroformo. La muestra en un primer momento está más limpia y es posible seguir con el proceso. Cuando se deseca la muestra mediante el uso de nitrógeno se forma un precipitado en los tubos y es necesario replantearse el uso de otros compuestos.

Basándonos en el mismo proceso que el ácido tricloroacético, utilizamos reactivos Carrez, de uso común como agente clarificante, para la determinación de azúcares, consiguiéndose un mejor resultado que con TCA. A la vista de los resultados obtenidos se decide utilizar Carrez y posteriormente el uso de cloroformo para la extracción de melatonina del sobrenadante.

El problema radica en que la cantidad de melatonina es muy baja y con los posteriores pasos se pierde, por lo que es necesario un gran volumen de muestra. Se empezó con 25 ml de muestra inicial, rehidratando en 1 ml antes de inyectarlo a HPL. Finalmente fue necesario incrementar el volumen inicial de muestra a 100 ml de muestra y rehidratar en la mitad de volumen.

La opción finalmente elegida es tratar las muestras con Carrez, centrifugar, extraer con cloroformo, secar la muestra y pasar al siguiente paso de derivatización. Las muestras quedan limpias y permiten una mejor determinación.

Derivatización

Se estudió la posibilidad de evitar la derivatización, pero finalmente se consideró necesaria para aumentar la sensibilidad. Si no se realiza este paso la melatonina no es detectada, sólo es posible detectarla cuando a la muestra de leche se le adicionan grandes concentraciones de melatonina.

En la Figura adjunta se reflejan los resultados de las muestras patrones en agua con distintas concentraciones de melatonina y analizadas en las mismas condiciones cromatográficas sin derivatizar y muestras derivatizadas. Se observa que se obtiene un resultado mejor cuando las muestras sufren el proceso de derivatización descrito (ver gráfico).

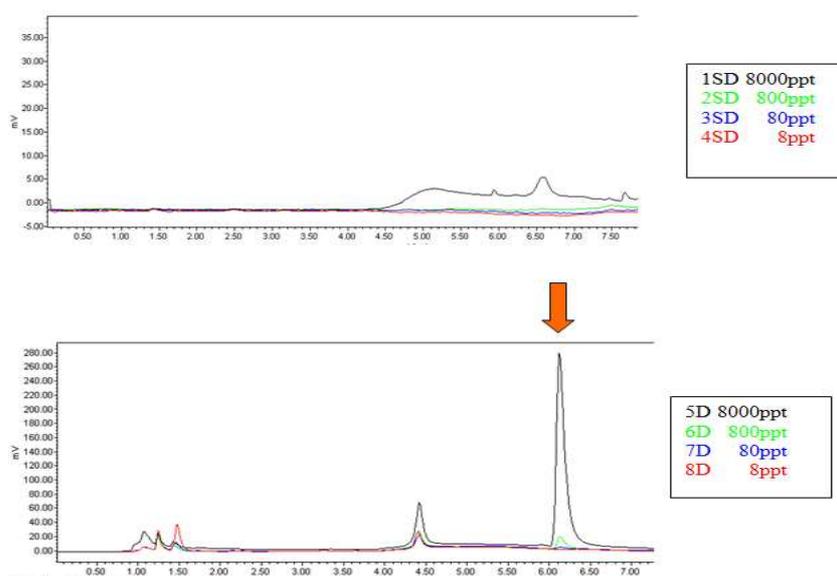


Figura 9. Condiciones de análisis: Muestras de concentraciones conocidas de agua con melatonina derivatizadas e inyección de 100µl en el cromatografo. Uso de columna de 4,6 x 150mm, 5µm (ZORBAX Eclipse XDB –C18 de Agilent Technologies). Uso de gradiente 5/95 acetonitrilo /agua (durante 4,5minuto) pasando a 48/10 acetonitrilo agua (desde el minuto 4,5 al minuto 7) y 90/10 acetonitrilo/agua (del minuto 7 al 10), flujo 1ml/min. T columna 40 °C, detección de fluorescencia se fijaron en Exλ 245nm y Emλ 380nm. SD:muestras sin derivatizar. D: muestras derivatizadas.

Extracción líquido-líquido

Se realizó en la etapa posterior a la derivatización. Como disolvente se utilizó acetato de etilo y la extracción se realizó en primer lugar sobre muestras patrón de concentración conocida de melatonina en agua. El grado de recuperación de melatonina fue en torno a un 60%.

La etapa de extracción se reveló necesaria con las muestras de leche ya que si no se realiza tenemos picos que interfieren al mismo tiempo que la melatonina derivatizada.

Condiciones HPLC.

Se realizaron ensayos con dos columnas diferentes para determinar el tipo de columna, la longitud de la columna y el tiempo de ensayo.

Las dos columnas probadas fueron las siguientes:

- columna de 4,6 x 150 mm , 5 μ m (ZORBAX Eclipse XDB –C18 de Agilent Technologies)
- columna de 4,6 x 250mm, 5 μ m (Gemini 5u C18 110A de Phenomenex).

La columna más corta sólo es útil si probamos patrones conocidos de melatonina en agua. Si el análisis se realiza con muestras de leche, obtenemos mejor resultado con la columna más larga. La columna larga nos permite realizar una mayor separación de los compuestos, aunque también es necesario un tiempo mayor para llevar a cabo el análisis. El tiempo del cromatograma fue ajustado a 25 minutos con la columna larga.

La adición de un tampón a pH=7 se reveló necesaria ya que se obtuvieron respuestas con mayor fluorescencia de la melatonina derivatizada y evitó ruido.

Con el método establecido es posible determinar la presencia de melatonina en la leche UHT comercial con un tiempo de respuesta del HPLC en torno a 11,568 minutos (*Figura 10*).

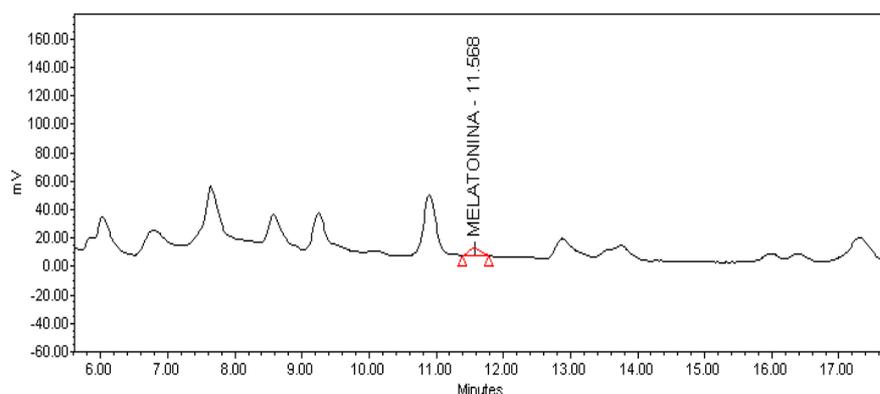


Figura 10: Muestra de leche UHT, tratada con las condiciones del método propuesto.

Preparación de las muestras

En un tubo de centrifuga de 150 ml se depositan 100 ml de muestra, a continuación se añaden 8 ml de reactivo Carrez I, agitando ligeramente la muestra. Posteriormente se adicionan 8 ml de reactivo Carrez II, agitando ligeramente la muestra. Tras este paso, se centrifuga la muestra a 5000 G durante 10 min. Tomamos el sobrenadante en un matraz de 100 ml. Con este sobrenadante se realiza una extracción con 200 ml de cloroformo en un embudo de separación de 250 ml, agitando suavemente durante 10 minutos (si agitamos muy fuerte se formará una emulsión). Recogemos la capa de cloroformo en un matraz de 250 ml lavándolo con 10 ml de agua y se lleva a sequedad mediante el uso de nitrógeno (turvovap) a una temperatura de 40 °C, primero en tubos de 50 ml, cuando quedan menos de 10 ml se traspasan a un tubo de ensayo de 10 ml mediante el uso de pipetas Pasteur, lavando los tubos de 50 ml con 0,5 ml de cloroformo 2 veces, donde se termina de secar la muestra.

Para la derivatización de la melatonina se añaden en el tubo de ensayo 1 ml de agua miliQ, 125 µl de Na₂CO₃ 2M, 125 µl de H₂O₂ 50 Mm al residuo y se calienta a 100 °C durante 30 min en un baño. La melatonina derivatizada es extraída tres veces con 3,5 ml de acetato de etilo en tubos de 10 ml previa agitación y con el uso de pipetas Pasteur. La capa de disolvente es llevada a sequedad mediante el uso de nitrógeno a una temperatura de 50 °C. Tras esta etapa, se añade al residuo 0,5 ml de acetonitrilo al 15 %, mediante el uso de jeringas de 1ml y filtros Millipore 0.45 µm, se traspasa la muestra a viales del cromatógrafo de 2ml, con insertos cilíndricos de vidrio para poder llegar al nivel de inyección.

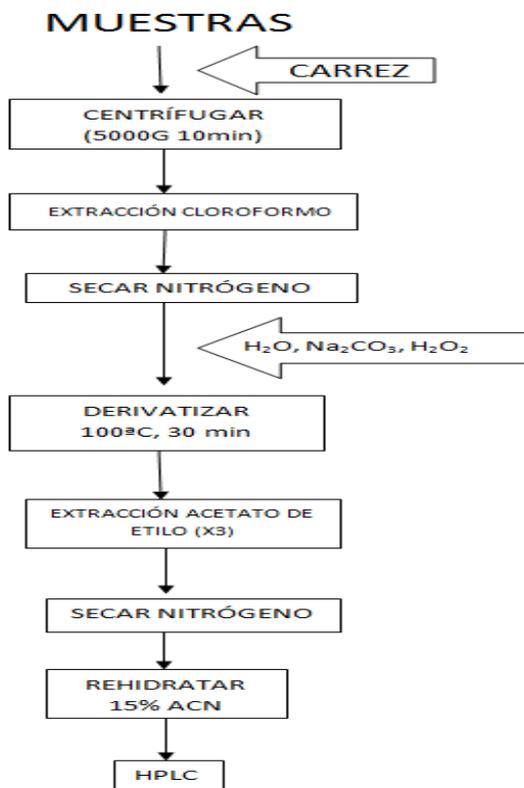


Figura 11. Esquema del método de análisis

Curva de calibrado

Se valoró la posibilidad de utilizar disoluciones de melatonina en agua o en leche para la elaboración de la curva de calibrado.

Lo ideal sería utilizar una matriz similar a la leche en la que el contenido de melatonina sea igual a cero, pero esto no es tan fácil porque otras bebidas de origen vegetal también tienen melatonina. Ej: leche de soja.

Se realizaron pruebas utilizando como matriz agua y leche UHT. Los resultados experimentales mostraron mejores resultados con disoluciones en leche sometidas al mismo método de análisis (pretratamiento, derivatización y extracción) que las muestras problema.

Se preparan disoluciones de melatonina en leche entera comercial UHT “Pascual” de 2 ppt, 5 ppt, 10 ppt y 20 ppt. Además de muestras de leche entera comercial UHT “Pascual” sin adicionar melatonina. De cada una de las disoluciones se toman 100 ml y se las sometió al procedimiento descrito en la Fig. 11. Los ensayos de HPLC se realizaron por triplicado.

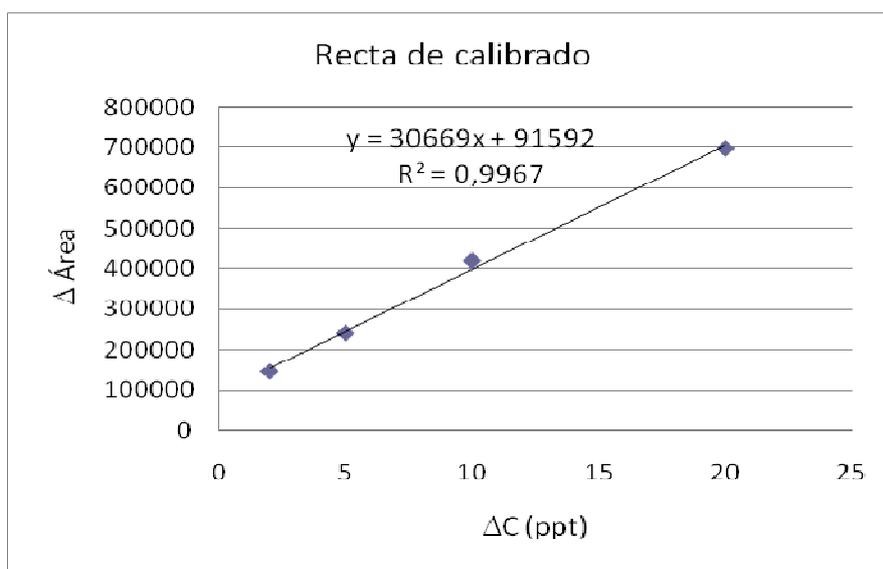


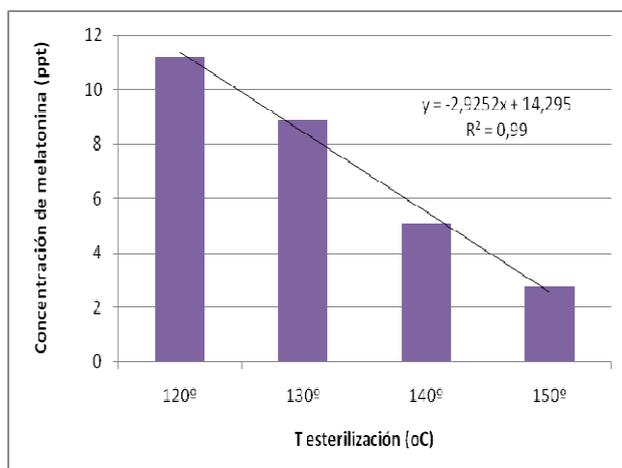
Figura 12. Recta de calibrado

5.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA DESTRUCCIÓN TÉRMICA DE MELATONINA

Todos los ensayos en planta piloto se realizaron a partir de la misma leche, recogida del mismo tanque de la planta de producción, la cual ha sufrido un tratamiento de normalización – homogenización sin tratamiento térmico.

Las muestras tratadas térmicamente en la planta piloto y congeladas, fueron descongeladas a temperatura ambiente y tratadas con el procedimiento descrito para la

determinación de melatonina por HPLC. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla adjunta. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.



T esterilización (°C)	Concentración (ppt)
120	11,212 ± 0,391
130	8,896 ± 0,682
140	5,090 ± 0,373
150	2,730 ± 1,059

Tabla 1. Concentraciones de las muestras con distintos tratamientos térmicos.

A medida que aumenta la temperatura, disminuye la cantidad de melatonina en la leche tratada. La estabilidad térmica se ajusta a un comportamiento lineal. En el intervalo de temperaturas estudiado entre 120 °C y 150 °C, la estabilidad térmica de la melatonina se ajusta a un comportamiento lineal con valores de concentración decreciente entre 11, 21 y 2,73 ppt de melatonina en la leche tratada.

6. CONCLUSIONES DEL TRABAJO

El método desarrollado para la determinación cuantitativa de melatonina en leche es un método laborioso pero con alta sensibilidad, de tal manera que permite la determinación de pequeñas concentraciones de melatonina en leche, del orden de ppt (10^{-9} g/L).

El tratamiento térmico influye en la cantidad de melatonina presente en la muestra, observándose una reducción de la concentración en la leche tratada térmicamente a medida que aumenta la temperatura del proceso.

En el intervalo comprendido entre 120 y 150 °C, los niveles de concentración de melatonina en la leche tratada térmicamente se ajustan a un comportamiento lineal con disminución de la concentración entre 11,21 y 2,73 ppt.

El trabajo presentado constituye el primer paso para poder abordar un estudio más riguroso sobre la cinética de destrucción térmica de melatonina que permita la optimización de las variables Temperatura – tiempo en un proceso de tratamiento térmico de la leche.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Wurtman R.J, Axelrod J. (1965). The pineal gland. *Sci Amer.* 213(1), 50-60
- [2] Lerner A.B, Case J.D, Takahas Y, Lee T.H and Mori W.(1958). Insolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J.Am. Chem. Soc* 80, 2587-2592
- [3] Guerrero J.M, Carrillo-Vico A y Lardone P.J. (2007). La melatonina. *Investigación y ciencia.* Octubre 2007, 30/38.
- [4] Arnao M.B and Hernandez J. (2009). Assessment of different sample processing procedures applied to the determination of melatonin in plants. *Phytochem analysis.* 20, 14 – 18.
- [5] Valtonen M, Niskanen L, Kangas A.P & Koskinen T. (2005).Effect of melatonin-rich night- time milk on sleep and activity in elderly institutionalized subjects. *Nordic Journal of Psychiatry.* 59, 217-221.
- [6] Vazquez M.I, Forcada F, Casao A, Sosa C, Palacin I, Abecia J.A. (2009).Effects of melatonin and undernutrition on the viability of ovine embryos during anestrus and the breeding season. *Animal reproduction science.* 112, 83-94.
- [7] Tan D.X, Manchester L.C, Burkhardt S, Mayo J.C, Kohen R, Shohami E, Huo Y.S, Hardeland R and Reiter R.J. (2001).N-acetyl-formyl-5-methoxikynoramide, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *Faseb J.* Agosto 17, 2294-2297.
- [8] Hardeland R. (2008). Melatonin, hormone of Darkness and more-occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 65, 2001/2018
- [9] Hardeland, R. and Pandi-Perumal S.R. (2005).Melatonin, a potent agent in antioxidative defense actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr. Metab (Lond).* Sep 10, 2-22.
- [10] Antunes F, Barclay L.R.C, Ingold K.U, King M, Norris J.Q, Scaiano J.C & Fengde X. (1999). On the antioxidant activity of melatonin. *Free radical biology & medicine.* Vol 26, n^o 1/2, 117-128.
- [11] Velkov Z.A, Yansen Z.Y, Galunska B.T, Paskalev D.N and Tadjer A.V. (2009).Melatonin: quantum-chemical and biochemical investigation antioxidant activity. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 44(7), 2834-2839.
- [12] Eriksson L, Valtonen M, Laitinen J.T, Paanenem M & Kaikkonen M. (1998). Diurnal rhythm of melatonin in bovine milk: pharmacokinetics of exogenous melatonin in lactating cows and goats. *Acta veterinaria Scandinavia.* 39(3), 301-330.
- [13] Jouan P-N, Pouliot Y, Gauthier S. F & Laforest J-P. (2006). Review Hormones in bovine milk and milk products: A survey, *International Dairy Journal.* 16,1408-1414.
- [14] Haigh Barrie S. (2003). Method for producing milk with an enhanced content of naturally expressed melatonin. GB2387099 (A).
- [15] Gnann T. (2007). Method for the production of milk or milk products having a high melatonin content. WO2007068361 (A1).
- [16] Harumi T, Matsushima S. (2000). Separation and assay methods for melatonin and its precursors. *Journal of chromatography B.* 747, 95/110.
- [17] Tomita T, Hamase K, Hayashi H and Zaitzu K. (2001). Attomole análisis of melatonin by precolumn derivatization reversed- phase micro-HPLC. *Chromatography.* Vol 22, n 1.
- [18] Tomita T, Hamase K, Hayashi H, Fukuda H, Hirano J and Zaitzu K. (2003).

- Determination of endogenous melatonin in the individual pineal glands of inbred mice using precolumn oxidation reversed-phase micro-high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*. 316, 154-161.
- [19] Hamase K, Hirano J, Kosai Y, Tomita T, Zaito K. (2004). A sensitive internal standard method for determination of melatonin in mammals using precolumn oxidation reversed phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography B*. 811, 237-241.
- [20] Peniston-Bird J.F, Di W, Street C.A, Kadva A, Stalteri M.A and Silman R.E. (1993). HPLC assay of melatonin in plasma with fluorescence detection. *Clinical chemistry*. Vol 39, N 11, 2242-2247.
- [21] Rizzo V, Porta C, Moroni M, Scoglio E and Remigio M. (2002). Determination of free and total (free plus protein-bound) melatonin in plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with fluorescent detection. *Journal of chromatography B*. 774, 17-24.
- [22] Minami M, Takahashi H, Inagaki H, Yamano Y, Onoue S, Matsumoto S, Sasaki T, Sakai K. (2009). Novel tryptamine-related substances, 5-sulphatoxydiacetyltryptamine, 5-hydroxydiacetyltryptamine, and reduced melatonin in human urine and the determination of those compounds, 6-sulphatoxymelatonin, and melatonin with fluorometric HPLC. *Journal of Chromatography B*. 877, 814-822.
- [23] Burkhardt S, Tan D.X, Manchester L.C, Hardeland R and Reiter R.J. (2001). Detection and quantification of the antioxidant melatonin in Montmorency and Balaton Tart Cherries (*Prunus cerasus*). *J.Agric.Food Chem*.49, 4898-4902.
- [24] González D, Lozano M, Fernández M.F, Ayuso M.C, Bernalte M.J and Rodrigues A.B. (2009). Detection and quantification of melatonin and serotonin in eight sweet cherry cultivars (*Prunus avium L.*). *European Food Research Technology*.229 (2), 223-229.
- [25] Reiter R.J, Manchester L.C and Tan D.X. (2005). Applied nutritional investigation Melatonin in walnuts: Influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition*. 21, 920-924.
- [26] Maldonado M.D, Moreno H and Calvo J.R. (2009). Melatonin present in beer contributes to increase the levels of melatonin and antioxidant capacity of the human serum. *Clinical Nutrition*. 28 188-191.
- [27] Iriti M and Faoro F. (2006). Grape phytochemicals: A bouquet of old and new nutraceuticals for human health. *Medical Hypotheses*. 67, 833-838.
- [28] Mercoli L, Saracino M.A, Bugamelli F, Ferranti A, Malaguti M, Hrelia S, Raggi M.A. (2008). HPLC-F analysis of melatonin and resveratrol isomers in wine using an SPE procedure. *J.Sep .Sci*.31, 1007-1014.
- [29] Dubbels S.R, Reiter R.J, Klenke E, Goebble A, Schnakenberg E, Ehlers C, Schiwara H.W, Schloot W. (1995). Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance chromatography-mass-spectrometry. *J. Pineal Res*.18, 28-31.
- [30] Egoshi K, Oka T & Yamashita H. (2007). Quantitative analysis of melatonin in raw milk by HPLC. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*. Vol.54, N° 3, 113-117.
- [31] Iizuka H, Someya K and Yajima T. (2007). Hemin-mediated fluorometric determination of melatonin by high-performance liquid chromatography. *International Congress Series*. 1304, 409-414.
- [32] Iizuka H and Yajima T. (2003). Potassium hexacyanoferrate (III)-mediated fluorometric determination of melatonin. *Advances in Experimental Medicines and Biology* 527, 587-592.