



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas

**“Desarrollo de metodologías cromatográficas
HPLC para la evaluación de la capacidad
antioxidante de polifenoles que interactúan con
albúmina”**

Patrocinante y Director
Dr. Javier Morales Valenzuela
Departamento de Ciencias y
Tecnología Farmacéuticas
Universidad de Chile

Co Director
QF. Guillermo Montero Leal
Departamento de Ciencias y
Tecnología Farmacéuticas
Universidad de Chile

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

JUAN CARLOS TORRES MANRÍQUEZ

Santiago de Chile

2018

AGRADECIMIENTOS

Agradecer en primer lugar al proyecto FONDECYT N°1160757 por el financiamiento de este trabajo.

Dar las gracias al profesor y Director de esta memoria, Dr. Javier Morales Valenzuela por permitir que hiciera este trabajo en su laboratorio, por todo el apoyo brindado en cada momento del proceso y por todo el conocimiento y experiencia entregada en cuanto a las técnicas y manejo de este estudio. Al Codirector de este proyecto, Guillermo Montero Leal por toda su buena disposición y voluntad en cuanto a dudas y sugerencias establecidas.

Agradecer a mi familia, en especial a mis padres Juan Torres Norambuena y Yolanda Manríquez Matamala, por todo el esfuerzo dedicado en la formación académica, por todos los valores entregados y por todo el apoyo en los momentos más difíciles. A mis hermanos y primos por toda la confianza que me han depositado durante todo el proceso estudiantil.

A mis amistades y compañeros de pregrado por compartir cada experiencia y unidad en los momentos más críticos que implica el ambiente de formación, en forma particular agradecer a mis compañeros y amigos Katty, Dani, Nico y Max, cuya amistad espero que nunca se acabe.

También agradecer a mis compañeros del Laboratorio de Farmacocinética Cata, Pancho, Mati, por todos los momentos y experiencias entregadas en un ambiente muy grato de trabajo. Por último a todo el personal del Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas de la Universidad de Chile, por toda la cordialidad, amabilidad y buen ambiente entregado, haciendo de esta una muy grata estadía.

ÍNDICE

	Páginas
I. RESUMEN	VI
II. SUMMARY.....	VII
III. ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
IV. ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
1) INTRODUCCIÓN.....	1
2) OBJETIVO GENERAL	7
3) OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
4) PLAN DE TRABAJO	8
5) MATERIALES	9
6) INSTRUMENTACIÓN.....	10
7) METODOLOGÍA.....	10
✓ Implementación del equipo HPLC para desarrollar las metodologías analíticas propuestas	10
✓ Preparación de soluciones stock de cada flavonoide	12
✓ Preparación de solución stock de albúmina (BSA)	12
✓ Fotodegradación de los polifenoles en estudio.....	12

✓	Desarrollo de metodologías analítica HPLC	13
	1) Linealidad.....	13
	2) Precisión	13
✓	Interacción de los compuestos con proteína albúmina BSA	14
✓	Procedimiento de interacción polifenol-BSA.....	14
✓	Extracción del polifenol que está interactuando con BSA	14
8)	RESULTADOS	16
	1. Desarrollo de una metodología para la separación de supuestos productos de degradación de polifenoles ocupando una columna C18.	16
	Análisis de morina dihidratada	17
	Análisis de quercetina.....	18
	1.1 Fotodegradación de polifenoles ocupando peróxido de hidrogeno (H ₂ O ₂) al 1 % ..	18
	Fotodegradación de morina dihidratada	19
	Fotodegradación de quercetina	20
	1.2 Adaptación de la metodología para aumentar el t _R de los polifenoles: modificación de la proporción de la fase móvil.....	21
	1.3 Comparación de la señal de morina dihidratada versus morina monohidratada	22
	1.4 Efecto del flujo de fase móvil en la forma de la señal de morina monohidratada..	23
	2. Desarrollo de una metodología para la separación de supuestos productos de degradación de polifenoles ocupando una columna C8.	25

2.1	Fotodegradación de morina monohidratada en metanol.....	27
2.2	Fotodegradación de quercetina en metanol	28
2.3	Fotodegradación de morina monohidratada en tampón pH 7,4.....	31
2.4	Determinación de la composición del tampón pH 7,4 óptimo para el seguimiento del efecto antioxidante de flavonoides por HPLC	36
1)	Quercetina en medio TRIS pH 7,4	37
2)	Quercetina en medio PBS pH 7,4.....	38
3)	Morina en medio TRIS pH 7,4.....	39
4)	Morina en metanol	40
5)	Morina en medio PBS pH 7,4	42
2.5	Estudio de linealidad de metodología en columna C8 KROMASIL para morina en tampón PBS pH 7,4	44
3.	Desarrollo de una metodología HPLC para el seguimiento del consumo de flavonoides utilizando una columna C18.....	46
3.1	Estudio de linealidad para metodología de consumo de morina	49
	Linealidad en agua Milli Q.....	50
	Linealidad en tampón pH 7,4	51
3.2	Estudio de precisión para metodología de consumo de morina	52
4.	Evaluación de la interacción de morina con albúmina BSA en la metodología de consumo	53

5. Determinación del porcentaje de recuperación de morina interactuando con BSA aplicando la metodología desarrollada	55
6. Evaluación preliminar de la eficiencia antioxidante	57
9. CONCLUSIONES.....	64
10. BIBLIOGRAFIA	65
11. ANEXO.....	70

I. RESUMEN

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que se encuentran distribuidos en el reino vegetal. Las propiedades antioxidantes de estos compuestos se relacionan con su capacidad de atrapar radicales libres (ej. radical hidroxilo) y apagar especies excitadas (ej. oxígeno singlete).

Los flavonoides poseen la capacidad de interactuar con distintas proteínas desde que se administran, al estar en la circulación sanguínea, con proteínas estructurales celulares, pudiéndose modificar tanto su biodisponibilidad como sus efectos farmacológicos. Estudios recientes sugieren que la unión con albúmina afecta la absorción, biodisponibilidad y actividad de los flavonoides, dependiendo de la estructura del polifenol.

El objetivo general de este trabajo es desarrollar metodologías cromatográficas HPLC para la determinación del efecto antioxidante frente al radical hidroxilo, de polifenoles que están interactuando con albúmina en medio acuoso tampón pH 7,4, siguiendo el consumo del polifenol en función del tiempo.

Así, se desarrollaron dos metodologías analíticas por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). Una fue desarrollada con la finalidad de lograr una óptima separación del flavonoide y sus respectivos productos de oxidación. Para esta metodología se utilizó una columna de fase reversa C8 y una gradiente de elución isocrática. Por otra parte, el seguimiento del consumo de cada flavonoide en función del tiempo se realizó en una columna C18, donde estos compuestos eluyen a tiempos menores en comparación con la metodología utilizada para la separación de los posibles productos de oxidación. Ambas metodologías fueron validadas en forma preliminar utilizando concentraciones del rango micromolar, presentando una adecuada relación lineal entre la señal cromatográfica y la concentración.

La metodología se aplicó eficientemente para la determinación del efecto antioxidante de morina cuando está interaccionando con albúmina en medio acuoso tampón pH 7,4 y se comparó con el medio homogéneo. Los resultados muestran que morina presenta una mayor reactividad con el radical hidroxilo cuando está interactuando con la proteína, lo que indica que aumenta su eficiencia antioxidante.

II. SUMMARY

Flavonoids are polyphenolic compounds that are distributed in the plant kingdom. The antioxidant properties of these compounds are related to their ability to trap free radicals (eg. hydroxyl radical) and quench excited species (eg. singlet oxygen).

Flavonoids have the ability to interact with different proteins since they are administered, being in the bloodstream, with cellular structural proteins, being able to modify both their bioavailability and their pharmacological effects. Recent studies suggest that binding with albumin affects the absorption, bioavailability and activity of flavonoids, depending on the structure of the polyphenol.

The general objective of this work is to develop HPLC chromatographic methodologies for the determination of the antioxidant effect against the hydroxyl radical of polyphenols that are interacting with albumin in aqueous buffer pH 7.4, following the consumption of polyphenol as a function of time.

Thus, two analytical methodologies were developed by High performance Liquid Chromatography (HPLC). One was developed with the purpose of achieving an optimum separation of the flavonoid and its respective oxidation products. For this methodology, a C8 reverse phase column and an isocratic elution gradient were used. On the other hand, the monitoring of the consumption of each flavonoid as a function of time was carried out in a C18 column, where these compounds elute at shorter times in comparison with the methodology used for the separation of the possible oxidation products. Both methodologies were validated in a preliminary way using concentrations of the micromolar range, presenting an adequate linear relationship between the chromatographic signal and the concentration.

The methodology was applied efficiently for the determination of the antioxidant effect of morin when interacting with albumin in an aqueous buffer pH 7.4 and was compared with the homogeneous medium. The results show that morin presents a greater reactivity with the hydroxyl radical when it is interacting with the protein, which indicates that it increases its antioxidant efficiency.

III. ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
• Figura 1. Estructura básica de los flavonoides.....	1
• Figura 2. Estructura básica de flavonoles canferol, quercetina y morina.....	2
• Figura 3. Estructura proteica de albúmina de suero humana (HSA) y albúmina de suero de bovino (BSA).....	4
• Figura 4. Estructura química de quercetina.....	7
• Figura 5. Estructura química de morina.....	7
• Figura 6. Procedimiento operativo de funcionamiento de HPLC marca SHIMADZU.....	11
• Figura 7. Cromatograma de HPLC para el compuesto morina usando metodología de análisis columna C18 CHROMOLITH ®.....	17
• Figura 8. Cromatograma de HPLC para el compuesto quercetina usando metodología de análisis columna C18 CHROMOLITH ®.....	18
• Figura 9. Cromatogramas de HPLC para morina bajo condiciones de fotoxidación usando metodología de análisis columna C18 CHROMOLITH ®.....	19
• Figura 10. Cromatogramas de HPLC para quercetina bajo condiciones de fotoxidación usando metodología de análisis columna C18 CHROMOLITH ®.....	20
• Figura 11. Comparación de Cromatogramas HPLC para el compuesto morina usando la modificación de la metodología de análisis en columna C18 CHROMOLITH ®.....	22

- **Figura 12.** Comparación de cromatograma HPLC de morina monohidratada versus morina dihidratada usando la metodología de análisis en columna C18 CHROMOLITH®.....23
- **Figura 13.** Comparación de cromatogramas HPLC de morina monohidratada a diferentes valores de flujo de fases usando la metodología de análisis en columna C18 CHROMOLITH®..... 24
- **Figura 14.** Cromatogramas HPLC correspondientes a morina, mostrando las diferentes modificaciones de proporciones de fases para el desarrollo de metodología en columna C8 KROMASIL®..... 25
- **Figura 15.** Cromatogramas HPLC correspondientes a morina bajo una fotodegradación exhaustiva en medio metanólico, usando metodología en columna C8 KROMASIL®.....27
- **Figura 16.** Cromatogramas HPLC correspondientes a quercetina bajo una fotodegradación exhaustiva en medio metanólico, usando metodología en columna C8 KROMASIL®.....29
- **Figura 17.** Comparación de cromatogramas HPLC de morina en medio TRIS pH 7,4 y en medio metanólico usando metodología en columna C8 KROMASIL®..... 31
- **Figura 18.** Influencia del oxidante H₂O₂ en la señal de morina cuando está en medio TRIS pH 7,4. La señal se compara con un blanco de muestra que contiene sólo el medio TRIS 7,4 más el oxidante..... 32

- **Figura 19.** Cromatogramas HPLC de morina en medio TRIS pH 7,4 bajo una fotodegradación por reacción de radical hidroxilo a un tiempo máximo de exposición de 240 minutos.....33
- **Figura 20.** Comparación de los cromatogramas correspondientes a fotodegradación de morina en medio metanólico y en medio TRIS pH 7,4 usando metodología en columna C8 KROMASIL®..... 35
- **Figura 21.** Cromatogramas HPLC para quercetina en medio TRIS pH 7,4 a diferentes concentraciones lineales.....37
- **Figura 22.** Cromatogramas HPLC para quercetina en medio PBS pH 7,4 a diferentes concentraciones lineales.....38
- **Figura 23.** Cromatogramas HPLC para morina en medio TRIS pH 7,4 a diferentes concentraciones lineales.....39
- **Figura 24.** Relación lineal entre concentración de morina (M) y área en tampón TRIS pH 7,4..... 40
- **Figura 25.** Cromatogramas HPLC para morina en medio metanólico a diferentes concentraciones lineales.....41
- **Figura 26.** Relación lineal entre concentración de morina (M) y área en medio metanólico.....41
- **Figura 27.** Cromatogramas HPLC para morina en tampón PBS pH 7,4 a diferentes concentraciones lineales.....42
- **Figura 28.** Relación lineal entre concentración de morina (M) y área en medio PBS pH 7,4..... 43

- **Figura 29.** Relación lineal de áreas para las 3 series de soluciones de morina realizadas a 5 puntos de concentraciones distintas..... 45
- **Figura 30.** Variaciones en las proporciones de fase móvil y ajustes de flujo para el desarrollo de una metodología de consumo en una columna C18 INERTSUSTAIN®.....47
- **Figura 31.** Modificaciones de proporción de acetonitrilo después de 20 minutos para adaptación del método a morina monohidratada.....48
- **Figura 32.** Relación lineal para las 6 concentraciones distintas de morina en agua milli Q usando metodología de consumo en columna C18 INERTSUSTAIN®.....50
- **Figura 33.** Relación lineal para las 6 concentraciones distintas de morina en tampón pH 7,4 usando metodología de consumo en columna C18 INERTSUSTAIN®.....51
- **Figura 34.** Variación en la forma de la señal de morina por uso de solución de extracción.....53
- **Figura 35.** Cromatogramas HPLC para la verificación de posibles señales correspondiente a albúmina BSA.....55
- **Figura 36.** Variaciones en porcentajes de consumo de morina en agua Milli Q a los respectivos tiempos de fotodegradación..... 57
- **Figura 37.** Variaciones en porcentajes de consumo de morina en tampón pH 7,4 a los respectivos tiempos de fotodegradación.....60

- **Figura 38.** Variaciones en porcentajes de consumo de morina interactuando con BSA en tampón pH 7,4 a los respectivos tiempos de fotodegradación.....62
- **Figura 39.** Comparaciones en los porcentajes de fotoconsumo de morina en los tres medios estudiados..... 63

IV. ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
• Tabla 1. Señales de posibles productos de degradación para morina en medio metanólico	30
• Tabla 2. Señales de posibles productos de degradación para quercetina en medio metanólico.....	30
• Tabla 3. Concentración real de morina (M) y área en tampón TRIS pH 7,4.....	40
• Tabla 4. Concentración real de morina (M) y área en medio metanólico	41
• Tabla 5. Concentración real de morina (M) y área en medio PBS pH 7,4	43
• Tabla 6. Promedio y desviación estándar de las áreas para las tres series de morina a 5 concentraciones diferentes en el estudio de linealidad.....	44
• Tabla 7. Valores de concentraciones y áreas para estudio de linealidad de morina en Milli Q usando metodología de consumo en columna C18 INERTSUSTAIN ®	50
• Tabla 8. Valores de concentraciones y áreas para estudio de linealidad de morina en tampón pH 7,4 usando metodología de consumo en columna C18 INERTSUSTAIN ®	51
• Tabla 9. Valores promedios de áreas y tiempos de retención para las diluciones en triplicados de las 2 soluciones stock ocupadas en estudio de precisión.	52
• Tabla 10. Valores promedios de áreas para las diluciones en triplicado de las 3 soluciones de referencia y soluciones estándares para cálculo de porcentaje de recuperación	56
• Tabla 11. Valores promedios de áreas y porcentajes de consumo para los distintos tiempos de exposición de morina a una misma concentración en agua Milli Q	58
• Tabla 12. Valores promedios de áreas y porcentajes de consumo para los distintos tiempos de exposición de morina a una misma concentración en tampón pH 7,4	59

- **Tabla 13.** Valores promedios de áreas y porcentajes de consumo para los distintos tiempos de exposición de morina interactuando con BSA a una misma concentración en tampón pH 7,461

1) INTRODUCCIÓN

Los **flavonoides** son compuestos polifenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y alimentos variados como el té negro, la cocoa, el café, la cerveza y el vino ^[1-4]. Estructuralmente pueden ser simples moléculas fenólicas hasta compuestos polimerizados con pesos moleculares superiores a los 30.000 Dalton ^[2-4]. Poseen una estructura que presenta un esqueleto hidrocarbonado del tipo C6-C3-C6 (difencilpirano), compuesto de dos anillos bencénicos (A y B) ligados a través de un anillo pirano C. Los átomos de carbono del anillo C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Figura 1) ^[2-4].

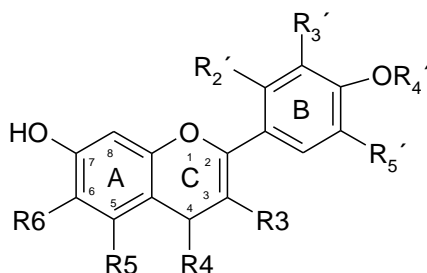
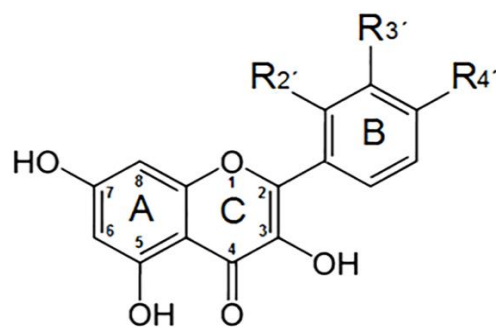


Figura 1. Estructura básica de los flavonoides.

Se han identificado más de 5000 flavonoides, los cuales se pueden clasificar en función de sus características estructurales en flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, chalconas, dihidrochalconas, dihidroflavonoles, antocianidinas, leucoantocianidinas, isoflavonoides, biflavonoides, proantocianidinas o taninos condensados.

Quercetina, canferol y morina son tres flavonoides pertenecientes al subgrupo de los flavonoles cuyo núcleo estructural es la 3-hidroxiavona. Presentan diferencias estructurales importantes que son relevantes, como por ejemplo, el número y posición de los grupos hidroxilos (Figura 2).



	R2'	R3'	R4'
kaempferol	H	H	OH
quercetin	H	OH	OH
morin	OH	H	OH

Figura 2. Estructura básica de flavonoles canferol, quercetina y morina

La actividad de los flavonoides como **antioxidantes** depende en parte de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural en diferentes zonas del esqueleto de la molécula ^[5-6]. Las propiedades antioxidantes de los flavonoides se relacionan con su capacidad de atrapar radicales libres (ej. radical hidroxilo) y apagar especies excitadas (ej. oxígeno singlete). Esta actividad aumenta en relación a los grupos hidroxilos sustituidos en el anillo B.

Se ha demostrado que la capacidad de **atrapar radicales hidroxilos** disminuye en el siguiente orden: quercetina > morina >> canferol. Quercetina es el flavonoide más abundante encontrado en vegetales y frutas ^[7,8], estando presente principalmente en su forma glicósida ^[9]. Además de su reportada actividad antioxidante, se ha demostrado que quercetina actúa como inhibidor de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad mediada por neutrófilos ^[10].

En el año 2012, Morales y col. y en 2015 Günther y col. informaron sobre la desactivación de oxígeno singlete por flavonoles tanto en medios homogéneos como heterogéneos ^[11,12]. La desactivación de esta especie por los flavonoles quercetina, canferol y morina que se encontraban en la interfase de vesículas y/o membranas de eritrocitos, no mostraba diferencias significativas con valores reportados en medio homogéneo.

García y col. analizaron la estabilidad de flavonoides en presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por foto-irradiación de riboflavina y eosina. Quercetina y rutina son los que presentaron más baja actividad desactivadora de oxígeno singlete, actuando principalmente como desactivadores físicos, mientras que morina se considera un "*scavenger sacrificial*", ya que el 80% de la desactivación de oxígeno singlete corresponde a su degradación ^[13]. Turnaire y col. y Mukai y col. sugirieron posibles mecanismos de foto-oxidación de flavonoides por oxígeno singlete ^[14, 15].

Diversos estudios sugieren una relación entre la interacción de flavonoides con membranas lipídicas y la actividad biológica de éstos ^[16-22]. Se ha reportado que algunos flavonoides presentan actividad antitumoral, la cual es mediada por cambios funcionales inducidos en diversas proteínas asociadas a membranas. La extensión de la interacción de flavonoides con membranas lipídicas depende principalmente de su hidrofobicidad y localización dentro de la bicapa lipídica. De acuerdo a la estructura química, grado de sustitución y pKa de sus grupos hidroxilos, los flavonoides pueden estar localizados tanto en la zona hidrofóbica de la bicapa lipídica o en la interface de la membrana, pudiendo generar alteraciones en la fluidez o en su rigidez ^[23-28]. En cuanto al aumento de la hidrofobia de los flavonoides, se ha indicado que la presencia de un grupo hidroxilo en posición 5 del anillo A incrementa significativamente su lipofilicidad cuando se compara con la presencia de grupos hidroxilos en otras posiciones de la molécula ^[29].

Por otra parte, los antioxidantes poseen la capacidad de interactuar con distintas proteínas desde que se administran (por ejemplo, algunas catequinas con la caseína de la leche), al estar en la circulación sanguínea (flavonoides con albúmina), con proteínas estructurales celulares (glicoforina de eritrocitos), pudiéndose modificar tanto su biodisponibilidad como sus efectos farmacológicos. Una de las proteínas importantes para la distribución de compuestos bioactivos en el organismo es la proteína albúmina de suero humano (HSA). La unión de sustancias a la proteína induce muchas veces modificaciones de interacciones débiles, lo que resulta en cambios en la estructura y en la estabilidad de HSA ^[30-33].

La **albúmina de suero bovino (BSA)** es una de las proteínas más estudiadas dentro de los tipos de albúminas, debido principalmente a la similitud estructural que existe con la albúmina de suero humana (HSA) ^[34] (Figura 3). Esta proteína es utilizada con frecuencia

como modelo en estudios toxicológicos y en la interacción de moléculas bioactivas (fármacos y moléculas naturales como los polifenoles) [35, 36]. Estudios recientes sugieren que la unión con BSA afecta la absorción, biodisponibilidad y actividad de los flavonoides, dependiendo de la estructura del polifenol [37].

HSA es una proteína globular compuesta de 585 aminoácidos con un peso molecular de 66.500 Da, que se caracteriza por la presencia de estructuras alfa-hélices [38]. Posee tres dominios homólogos (dominios I-III), a su vez divididos en 2 subdominios (A y B), con múltiples sitios de unión de ligando localizados en cada uno de estos subdominios [38, 39]. HSA tiene innumerables funciones: es una de las principales responsables de la presión oncótica del plasma y la más importante es el ser transportadora de compuestos endógenos y exógenos presentes en el cuerpo humano [40]. Su papel en el transporte de sustancias en la sangre es tan importante que la biodisponibilidad de muchos compuestos biológicamente activos está relacionada con la interacción y unión sucesiva con HSA [41]. La unión de sustancias a macromoléculas induce muchas veces modificaciones de interacciones débiles, lo que resulta en cambios en la estructura y estabilidad de HSA [42-45].

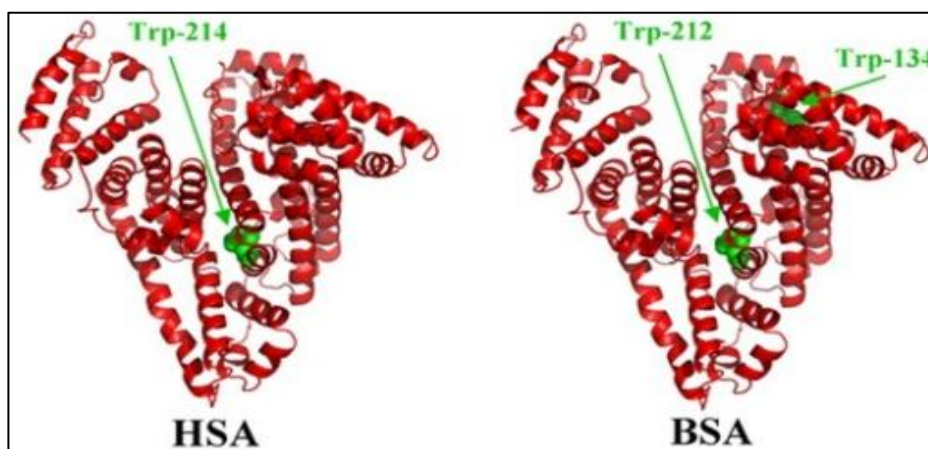


Figura 3. Estructura proteica de albúmina de suero humana (HSA) y albúmina de suero de bovino (BSA)

Si bien hay marcadas similitudes entre BSA y HSA en sus composiciones, HSA tiene solo un residuo de triptófano Trp-214, mientras que BSA contiene dos triptófano Trp-212 y Trp-134 como fluoróforos (Figura 3).

Existen varios estudios respecto a la **interacción de polifenoles con albúmina**, destacando el de Fickel y col. en 2006 [46], quienes han demostrado la alta afinidad que

posee el ácido tánico con proteínas, la cual se ve reflejada en base a un aumento de las interacciones hidrofóbicas entre el polifenol y las proteínas, tal como señala Hofmann y col. en su trabajo en 2006 ^[47]. Otras investigaciones han estudiado el efecto de los grupos galoiol en la afinidad con proteína ^[48], donde los puentes de hidrógeno se forman a partir de los 3 grupos hidroxilos proporcionados por cada grupo galiol, así como las uniones hidrofóbicas debido al anillo benceno, inducen un aumento de la afinidad por BSA, existiendo además prevalencia de un mecanismo estático por sobre uno dinámico. En 2015, Li y col. estudiaron la interacción de catequina con HSA por técnicas de UV-Vis, espectroscopia de fluorescencia, dicroísmo circular y calorimetría de titulación isotérmica ^[49]. La intensidad de fluorescencia de HSA disminuye en función a la cantidad de (+)-catequina, indicando que la unión del polifenol con HSA desactiva la fluorescencia intrínseca de HSA.

Existen diversas metodologías analíticas que han sido empleadas para la determinación de flavonoides, tanto en plantas, como en fluidos humanos o productos alimenticios. Dentro de ellas encontramos las técnicas de separación que permiten aislar e identificar componentes de una mezcla, obteniéndose señales para realizar análisis cualitativos y cuantitativos.

En la actualidad la técnica de separación más empleada en estudios de flavonoides es la cromatografía. El análisis cualitativo de esta técnica se basa en la medición de parámetros específicos como por ejemplo el tiempo de retención (t_R) y el análisis cuantitativo se basa en mediciones de áreas relacionadas con la concentración de los compuestos.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es la técnica analítica más utilizada para la separación e identificación de compuestos polifenólicos. Dentro de sus variantes existe la de fase reversa la cual se caracteriza por el empleo de una fase estacionaria de naturaleza apolar y una fase móvil de naturaleza polar. Se emplean fases estacionarias a base de sílice químicamente modificada conteniendo usualmente cadenas hidrocarbonadas de 8 átomos de carbono (C8) y de 18 átomos de carbono (C18). Dentro de los solventes orgánicos polares más comunes que componen la fase móvil se encuentra el acetonitrilo (ACN) y el metanol, los cuales se emplean teniendo en cuenta características fisicoquímicas de los polifenoles a analizar (solubilidad, grado de ionización, coeficiente de partición, entre otros).

Existen diversos estudios que abarcan el empleo de esta técnica para el análisis de flavonoides que se encuentran interactuando con proteína albúmina de suero humano. Dufour y col. informaron sobre la actividad antioxidante de quercetina y sus productos de oxidación en un modelo de interacción con proteína HSA asociada a lípidos de ácido linoléico mediante una metodología por HPLC ^[50]. Julianto y col. Desarrollaron una metodología por HPLC con detección UV para la determinación del flavonoide α -tocoferol en plasma humano realizando los tratamientos previos antes de la inyección ^[51].

2) OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es desarrollar metodologías cromatográficas HPLC para la determinación del efecto antioxidante frente al radical hidroxilo, de polifenoles que están interactuando con albúmina en medio acuoso tampón pH 7,4, siguiendo el consumo del polifenol en función del tiempo.

Los compuestos seleccionados en este estudio son los flavonoles **quercetina** y **morina** (Figuras 4 y 5). Éstos fueron escogidos debido a que se encuentran comúnmente presentes en productos de la dieta y además, por su relación estructura química-actividad antioxidante.

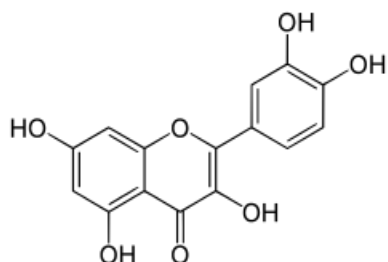


Figura 5. Estructura química de quercetina

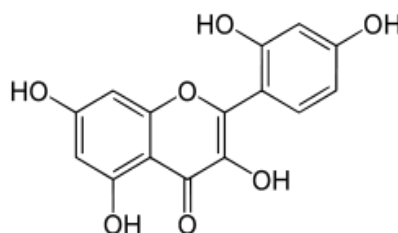


Figura 4. Estructura química de morina

3) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Implementar un equipo HPLC recientemente adquirido para desarrollar las metodologías analíticas propuestas
- ✓ Desarrollar metodologías analíticas por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para la óptima separación de los compuestos polifenólicos y sus productos de oxidación y/o seguimiento del consumo en función del tiempo.
- ✓ Aplicar una metodología para la determinación del efecto antioxidante de los polifenoles cuando están interaccionando con albúmina en medio acuoso tampón pH 7,4.

4) PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo se estructuró de acuerdo al siguiente orden:

1.- Implementación del equipo HPLC para desarrollar las metodologías analíticas propuestas.

2.- Desarrollo de metodología HPLC

- Oxidación de los polifenoles en tampón pH 7,4 por reacción con radical hidroxilo generado por fotólisis de peróxido de hidrógeno.
- Selección de condiciones cromatográficas de separación óptima de los polifenoles y sus productos de oxidación (columna, fase móvil, flujo, elución por gradiente, volumen de inyección)
- Selección de longitud de onda donde los compuestos obtuvieran una adecuada sensibilidad.

3.- Aplicación del método para la interacción del polifenol con albúmina.

- Oxidación del polifenol que está interactuando con albúmina en tampón pH 7,4 por reacción con radical hidroxilo generado por fotólisis de peróxido de hidrógeno.
- Extracción del polifenol desde la muestra
- Aplicación u optimización del método HPLC para ser aplicado.

5) MATERIALES

Reactivos

Los flavonoles seleccionados en este trabajo, quercetina dihidratada (sobre 98%), morina dihidratada (sobre 98%) y morina monohidratada (sobre 99,9%) fueron adquiridas en el comercio (Sigma Aldrich).

La albúmina empleada corresponde a albúmina de suero de bovino 100% (BSA 66000 g mol^{-1}) fracción V adquirida en el comercio (CALBIOCHEM) y almacenada a una temperatura menor a 4°C.

Solventes

Los solventes metanol (grado HPLC), acetonitrilo (grado HPLC), tetrahidrofurano (grado HPLC), etanol (grado HPLC) y ácido trifluoroacético (grado HPLC) fueron adquiridos a Merck. El agua fue purificada y desionizada usando un sistema milli Q.

El tampón TRIS pH 7,4 fue preparado para un volumen total de 500 mL, pesando alrededor de 30,5 g de TRIS base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, adquirido en el comercio por WINKLER.) ajustando a pH 7,4 utilizando HCl fumárico.

El tampón fosfato salino (PBS) fue preparado para un volumen total de 500 mL, utilizando 4,03 g de NaCl, 0,11 g de KCl, 0,575 g de Na_2HPO_4 y 0,02 g de KH_2PO_4 , que posteriormente fue ajustado a pH 7,4 utilizando soluciones de NaOH y HCl.

Además, se preparó una solución tampón pH 7,4 constituido por 50 mL de KH_2PO_4 y 39 mL de NaOH, ambas soluciones de concentración 0,1 M. Se ocupó HCl fumante para ajustar.

6) INSTRUMENTACIÓN

El sistema de medición cromatográfica consistió de un equipo HPLC SHIMADZU® con detector de Diodos (SPD-M20A). Las columnas cromatográficas utilizadas fueron una columna C-18 CHROMOLITH ® de 100 x 4,6 mm de diámetro interno, con poros de 2 µm, una Columna C-8 KROMASIL ® (100-5C8) 150 x 4,6 mm de diámetro interno y una columna C-18 INERTSUSTAIN ® de 250 x 4,6 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 µm.

La centrifugación de las muestras se realizó en una centrífuga Hermle Labortechnik GmbH, modelo Z326K.

La fotólisis de las muestras fue realizada con una lámpara de mercurio Black-Ray, modelo B100AP.

7) METODOLOGÍA

✓ **Implementación del equipo HPLC para desarrollar las metodologías analíticas propuestas.**

Se dispuso de un equipo operativo HPLC marca SHIMADZU® el cual fue adquirido en noviembre de 2016. La puesta en marcha del equipo se efectuó en los meses siguientes realizando los acondicionamientos previos correspondientes (filtrado y desgasificación de fases, purga de bomba y de autosampler, lavado de inyector y acondicionamiento de columnas empleadas, entre otros). Una vez llevadas a cabo las tareas anteriores, se desarrollaron las metodologías correspondientes para la separación de los productos de fotodegradación y consumo de los polifenoles.

Antes de desarrollar las metodologías que se proponen en este trabajo, se puso en operación el sistema HPLC, desarrollando para ello un instructivo tipo “procedimiento operativo”, el cual se aplica a todo el personal (estudiantes, investigadores y/o profesores) que tengan como objetivo realizar análisis en el equipo detallado. Se describió el

funcionamiento básico del equipo de manera sistemática, estandarizada y concisa, para todo tipo de procedimiento que requiera ser detallado. (Ver anexo).



 <p>Universidad de Chile Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Departamento de Química y Tecnología Instrumental</p>	<p>Funcionamiento equipo HPLC marca "SHIMADZU"</p>	<p>NPD 01 Versión: 01</p>
		<p>Total página: 9 Fecha: 08/06/2017</p>
<p>Objetivo: describir el funcionamiento básico del equipo de análisis HPLC marca SHIMADZU de manera sistemática, estandarizada y concisa, para todo tipo de procedimiento que requiera ser detallado.</p> <p>Alcance: el instructivo aplica a todo el personal (estudiantes, investigadores y/o profesores) que tengan como objetivo realizar análisis en el equipo detallado.</p> <p>Definiciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> - DGU-20ASR: unidad desgasificadora - Pump LC-20ATX2units (bomba): sistema de bombeo de solvente - Autosampler SIL-20A: sistema de inyección automático de muestra - Column oven CTO-20A: columna de separación - Detector SPD-M20A: detector de señal - Labsolutions: es el software controlador del equipo, el cual incorpora funciones de alto grado. En él se pueden realizar funciones específicas como por ejemplo, control de datos instrumentales y analíticos, análisis y revisión de datos, creación de métodos y ajustes. <p>Desarrollo:</p> <p>Se enciende cada módulo del equipo de manera sincronizada, procurando encender primero la bomba, luego el autosampler, después la columna y por último el detector.</p> <p>Se enciende el computador y se verifica que el icono del servicio del software "labsolutions" se encuentre de color verde. En caso de estar amarillo significa que el controlador está en proceso de iniciarse, y en caso de estar rojo, significa que ha ocurrido un error y por lo tanto se debe reiniciar.</p>  <p>Se procede a iniciar el software labsolutions con un doble "click" y se ingresa el perfil de método con la contraseña correspondiente. En caso de no poseer perfil, se entra en modo administrador sin colocar contraseña.</p>		

Figura 6. Procedimiento operativo de funcionamiento de HPLC marca SHIMADZU

El sistema HPLC consta de las siguientes unidades:

- **DGU-20ASR:** unidad desgasificadora
- **Pump LC-20ATX2units (bomba):** sistema de bombeo de solvente
- **Autosampler SIL-20A:** sistema de inyección automático de muestra
- **Column oven CTO-20A:** columna de separación
- **Detector SPD-M20A:** detector de señal
- **Labsolutions:** software controlador del equipo, el cual incorpora funciones de alto grado. En él se pueden realizar funciones específicas como por ejemplo el control de datos instrumentales y analíticos, análisis y revisión de datos, la creación de métodos y ajustes, entre otros.

✓ **Preparación de soluciones stock de cada flavonoide**

Se prepararon soluciones estándares de cada uno de los flavonoides estudiados, pesando en balanza analítica en forma exacta, aproximadamente 1 mg de cada compuesto, que posteriormente fue agregado a un matraz volumétrico de 5 mL. Luego los compuestos fueron disueltos en metanol. Finalmente, cada una de las soluciones fueron sometida a agitación en vórtex y luego fueron llevadas a volumen y guardadas a 5° C.

✓ **Preparación de solución stock de albúmina (BSA)**

Se pesó alrededor de 100 mg de proteína BSA (66000 g mol^{-1}) en forma exacta en balanza analítica, en un matraz volumétrico de 10 mL. La muestra fue disuelta en solución acuosa tampón pH 7,4, se agitó en vórtex y se adicionaron gotas de etanol para disminuir espuma antes del aforo. Se completó volumen con la misma solución tamponante. La solución de BSA preparada se sometió a sonicación por 5 min y se almacenó a una temperatura de 5°C.

✓ **Fotodegradación de los polifenoles en estudio**

Este procedimiento se realizó ocupando una lámpara de mercurio, la cual emite radiación UV suficiente para generar especies reactivas de oxígeno (radical hidroxilo) mediante la degradación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a 254 nm.

Se adicionaron 2 mL de muestra de análisis a una cubeta de fluorescencia, junto con el volumen necesario de peróxido para una concentración de 1% (20 μL de H_2O_2). Se agitó la muestra para homogenizar la solución.

Se utilizó una distancia fija de 25 cm desde el foco de emisión de la lámpara hasta la cubeta con la muestra y se tomaron los tiempos necesarios de exposición con uso de cronómetro.

✓ Desarrollo de metodologías analítica HPLC

1) Linealidad

Como parámetro analítico se determinó la linealidad en las metodologías HPLC desarrolladas de la siguiente manera:

Se realizaron pruebas de linealidad con respecto a la columna **C8 KROMASIL®** colocando a prueba tres medios diferentes (tampón TRIS 7,4; MEOH y tampón PBS 7,4). Se prepararon soluciones estándares de cada uno de los compuestos por separado, pesando en balanza analítica aproximadamente 1 mg de compuesto en un matraz volumétrico de 5 mL y disuelto en MEOH. Finalmente cada una de las soluciones fueron sometidas a agitación en vórtex. Para la medición cromatográfica, a partir de cada una de las soluciones estándares se prepararon 5 diluciones de distinta concentración aforando con los medios mencionados anteriormente. Las 5 diluciones para cada medio se analizaron por HPLC.

Respecto a la columna **C18 INERTSUSTAIN®** se realizaron estudios de linealidad sólo con morina monohidratada en 2 medios distintos (agua milli Q y tampón pH 7,4 constituido por KH_2PO_4 y NaOH). Para esto se prepararon soluciones stock de morina pesando alrededor de 2 mg de compuesto en un matraz volumétrico de 5 mL y aforando con metanol. Se prepararon 6 diluciones de distinta concentración para los dos medios empleados y se analizaron por HPLC.

2) Precisión

Se realizó un estudio de precisión respecto a la columna **C18 INERTSUSTAIN®** preparando dos soluciones stock de morina monohidratada en etanol, pesando alrededor de 4,8 mg de compuesto en matraces de 2 mL, aforando con etanol. Cada solución madre se diluyó en triplicado a una concentración objetivo de $2,47 \times 10^{-5}$ M (24,7 μM) ocupando tubos Eppendorf a un volumen final de 1800 μL . Las 6 diluciones se realizaron en tampón pH 7,4 agitando en vórtex cada tubo.

✓ **Interacción de los compuestos con proteína albúmina BSA**

Este procedimiento se realizó como simulación de la interacción entre el polifenol y la proteína albúmina humana, a modo de evaluar la capacidad antioxidante que tendrá el compuesto cuando se encuentre distribuido en el organismo.

Se realizó un protocolo de interacción entre el polifenol y la proteína albúmina de suero de bovino (BSA), seguido de la respectiva extracción para inyectar el polifenol libre de fracción proteica. Los procedimientos se detallan a continuación.

✓ **Procedimiento de interacción polifenol-BSA**

En un matraz de 2 mL se adicionaron alícuotas respectivas de solución stock BSA y solución stock de morina, de tal manera que ambos componentes estuvieran a una misma concentración (4×10^{-5} M). Se llevó a volumen con solución tampón pH 7,4, agitando en vórtex y dejando en reposo por un tiempo superior a 30 minutos, para llevar a cabo la interacción de manera eficiente.

Transcurrido el tiempo necesario de interacción, se sacó un volumen de 500 μ L de muestra a un tubo Eppendorf para realizar el proceso de extracción previo a la inyección en HPLC.

✓ **Extracción del polifenol que está interactuando con BSA**

Este procedimiento se realizó con el objetivo de eliminar la fracción proteica de la muestra en interacción, para evitar problemas instrumentales debido a la posible precipitación que puede tener la albúmina por acción de solventes orgánicos ocupados en la metodología. Para tal efecto, se debe preparar una solución de extracción compuesta por solventes orgánicos que sea capaz de disminuir la solubilidad de la albúmina en el medio de interacción, facilitando su posterior precipitación para dejar libre al polifenol en el medio. Este proceso recibe el nombre de “**desproteínización**” [52].

Se preparó una solución de extracción adicionando en una probeta 30 mL de acetonitrilo (ACN) y 20 mL de tetrahidrofurano (THF), obteniéndose una mezcla de proporciones 3:2 ACN/THF ^[51].

Para realizar el proceso de manera eficiente, la proporción entre los volúmenes de muestra y solución de extracción debe ser de 1:2. Para tal efecto se adicionaron 1000 µL de solución de extracción a 500 µL de muestra en tubos Eppendorf, agitando en vórtex por 2 minutos.

Las muestras fueron centrifugadas por **5 minutos** a **20000 rcf** ^[50] y luego fueron filtradas en viales de análisis ocupando jeringas con filtros de 0,22 µm.

8) RESULTADOS

1. Desarrollo de una metodología para la separación de supuestos productos de degradación de polifenoles ocupando una columna C18.

Para desarrollar una metodología de seguimiento de los productos de degradación de los polifenoles en estudio, es necesario encontrar las condiciones adecuadas que permitan obtener un buen rango de tiempo entre la señal del frente de solvente y la señal característica del polifenol. De esta manera se desarrolla una metodología que trate de extender en lo posible el tiempo de retención del compuesto principal para dejar un buen rango de observación de los productos de degradación.

Los posibles productos de degradación que serán analizados, son los resultantes de la oxidación del flavonoide frente a una reacción con radical hidroxilo. Estos productos se caracterizan por tener una naturaleza más polar en relación al compuesto de origen, lo cual se verá reflejado en los tiempos de retención de sus señales que serán menores en relación al flavonoide.

El primer estudio se realizó ocupando una columna C18 marca **CHROMOLITH**® cuyas características fueron descritas anteriormente. Las fases móviles a utilizar fueron acetonitrilo (fase C) y una solución acuosa acidificada con ácido trifluoroacético al 0,05% (fase D).

La metodología de análisis desarrollada parte de los siguientes parámetros

- 0 - 10 min: 22% fase C/ 78% fase D (isocrático)
- 10 - 20 min: 50% fase C/ 50% fase D (isocrático)
- 20 - 25 min: 65% fase C/ 35% fase D (isocrático)
- 25 - 30 min: 22% fase C/ 78% fase D (isocrático - condición inicial)
- Flujo: 1 mL/min
- Longitud de onda de análisis: 255 nm
- Volumen de inyección: 30 µL
- Temperatura de columna: 25°C

La longitud de onda elegida para los análisis cromatográficos fue de 255 nm, correspondiente a la primera banda de absorción de los flavonoides en estudio y también es la longitud de onda donde los productos de fotooxidación presentan la mayor sensibilidad.

La concentración de las muestras de polifenoles a analizar fue de 5×10^{-5} M en metanol.

Análisis de morina dihidratada

La señal del compuesto se muestra en el siguiente cromatograma a 255 nm.



Figura 7. Cromatograma de HPLC para el compuesto morina usando metodología de análisis columna C18 CHROMOLITH®

Se observó que la señal de morina aparece a un tiempo de retención (t_R) de 5,4 min y a su vez aparece una señal de impureza característica alrededor de los 16 min.

Análisis de quercetina

La señal del compuesto se muestra en el siguiente cromatograma a 255 nm.

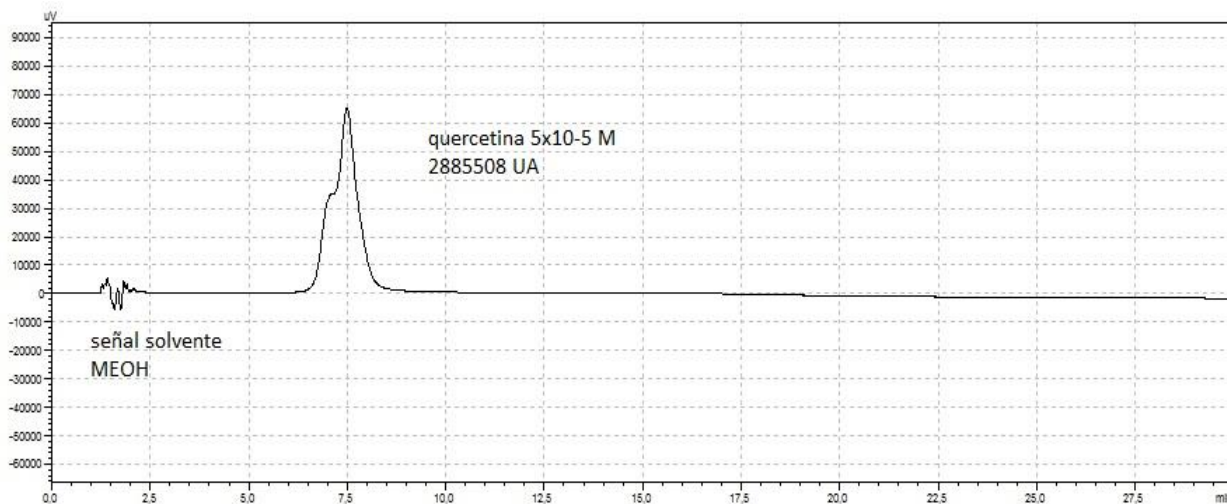


Figura 8. Cromatograma de HPLC para el compuesto quercetina usando metodología de análisis columna C18 CHROMOLITH ®

Se observó que la señal de quercetina aparece a un tiempo de retención (t_R) de 7,49 min, sin presentar señal de impureza como en el caso de morina dihidratada.

Se realizó un primer procedimiento de fotodegradación para los dos polifenoles ocupando una concentración de oxidante (H_2O_2) de 1% en un volumen total de muestra de 2 mL. El procedimiento de fotodegradación se detalla a continuación.

1.1 Fotodegradación de polifenoles ocupando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 1 %

Se tomaron alícuotas respectivas de soluciones stock de polifenol, las cuales se traspasaron a un matraz de 2 mL (para una concentración de 5×10^{-5} M) y se completó a volumen con metanol. Se agitó la solución y se traspasó a una cubeta de fluorescencia. Luego se adicionaron 20 μ L de oxidante peróxido de hidrógeno para que esté a una concentración de 1% en el volumen total de muestra (2 mL). Se agitó la solución y se sometió a exposición lumínica (lámpara UV) a tiempos establecidos.

Terminado el tiempo de exposición necesario se agitó la cubeta y se sacaron alrededor de 1000 μL de muestra fotolizada a un vial de análisis HPLC.

Los resultados de los cromatogramas para las muestras fotolizadas a los respectivos tiempos de exposición se muestran a continuación.

Fotodegradación de morina dihidratada

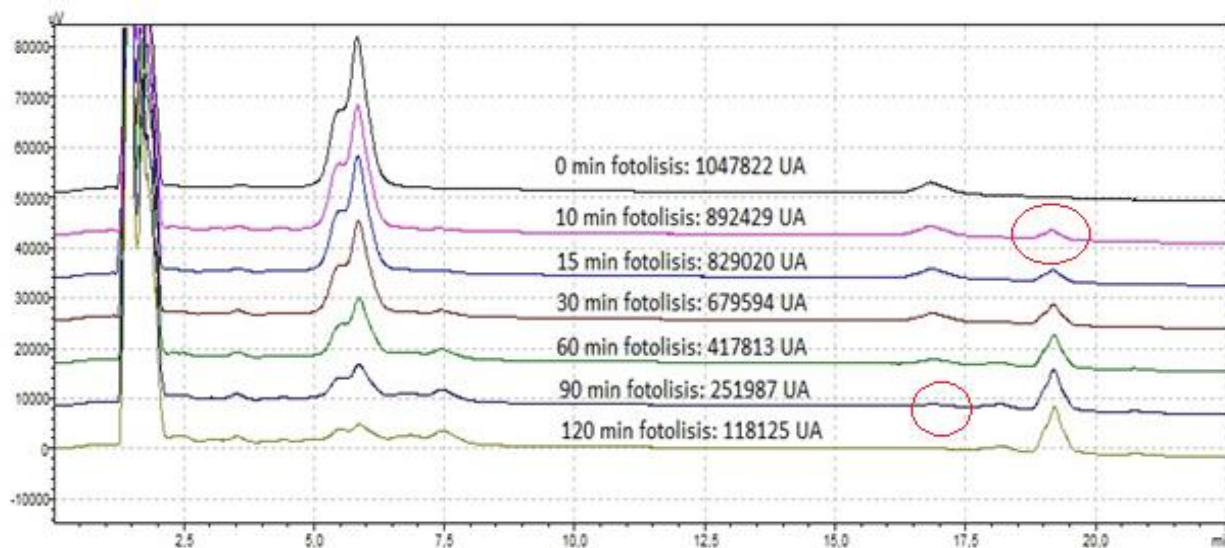


Figura 9. Cromatogramas de HPLC para morina bajo condiciones de fotoxidación usando metodología de análisis columna C18 CHROMOLITH ®

Se observó que a los 10 minutos de fotodegradación empieza a aparecer una señal con t_R de 19,0 min. Esta señal va aumentando su área a medida que progresa la fotólisis.

El área de la señal de morina empieza a disminuir a medida que progresa la fotodegradación, generándose un ensanchamiento de banda que se ve reflejado en una pérdida en la definición de la señal.

Se observa también que con el aumento en los tiempos de exposición se van generando nuevos productos de degradación que aparecen antes de la señal del compuesto (t_R 5,4 min), siendo necesario desarrollar una metodología de tal manera que se puedan seguir adecuadamente las señales respectivas.

A medida que progresa la fotólisis, la señal de la impureza (t_R 16,5 min) empieza a desaparecer, perdiendo su forma a los 90 minutos de foto exposición.

Fotodegradación de quercetina

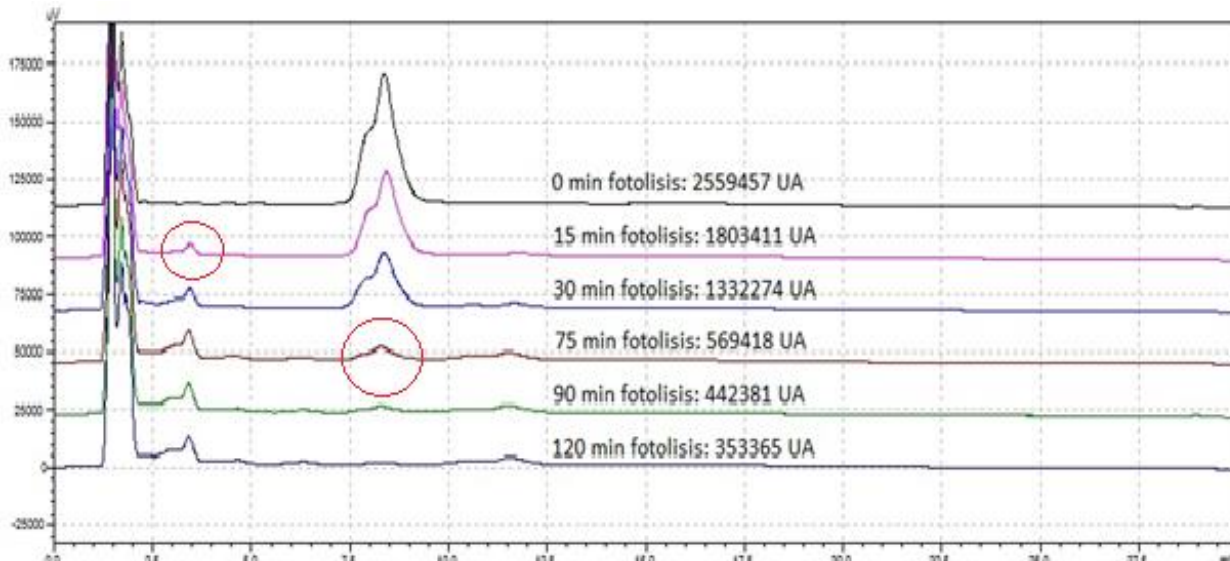


Figura 10. Cromatogramas de HPLC para quercetina bajo condiciones de fotoxidación usando metodología de análisis columna C18 CHROMOLITH ®

Se observó que a 15 min de fotodegradación aparece una señal con un t_R de 3,5 min, que va incrementando su intensidad a medida que transcurren los tiempos de exposición.

A simple vista se puede apreciar que el consumo de quercetina es mayor en comparación al de morina, lográndose ver una señal poco perceptible a los 75 min de fotodegradación.

1.2 Adaptación de la metodología para aumentar el t_R de los polifenoles: modificación de la proporción de la fase móvil

Se realizaron cambios en la metodología anteriormente descrita para aumentar los respectivos tiempos de retención de las señales de los compuestos en estudio, para poder facilitar la separación de sus productos de degradación.

Para esto se decidió realizar una prueba con morina, ya que presenta menor t_R en comparación a quercetina.

Se aumentó la proporción de la fase acuosa (fase D TFA 0,05%) a 80% y por ende, se disminuyó la proporción de la fase orgánica (fase C acetonitrilo) a un 20% en los primeros 15 min de corrida de muestra para ver si se prolongaba el t_R de morina. Los parámetros de la nueva metodología se muestran a continuación.

- 0 - 15 min: 20% fase C/ 80% fase D (isocrático)
- 15 - 20 min: 50% fase C/ 50% fase D (isocrático)
- 20 - 25 min: 65% fase C/ 35% fase D (isocrático)
- 25 - 30 min: 22% fase C/ 78% fase D (isocrático - condición inicial)
- Flujo: 1 mL/min
- Longitud de onda de análisis: 255 nm
- Volumen de inyección: 30 μ L
- Temperatura de columna: 25°C

Los resultados se muestran a continuación a una longitud de detección de 255 nm.

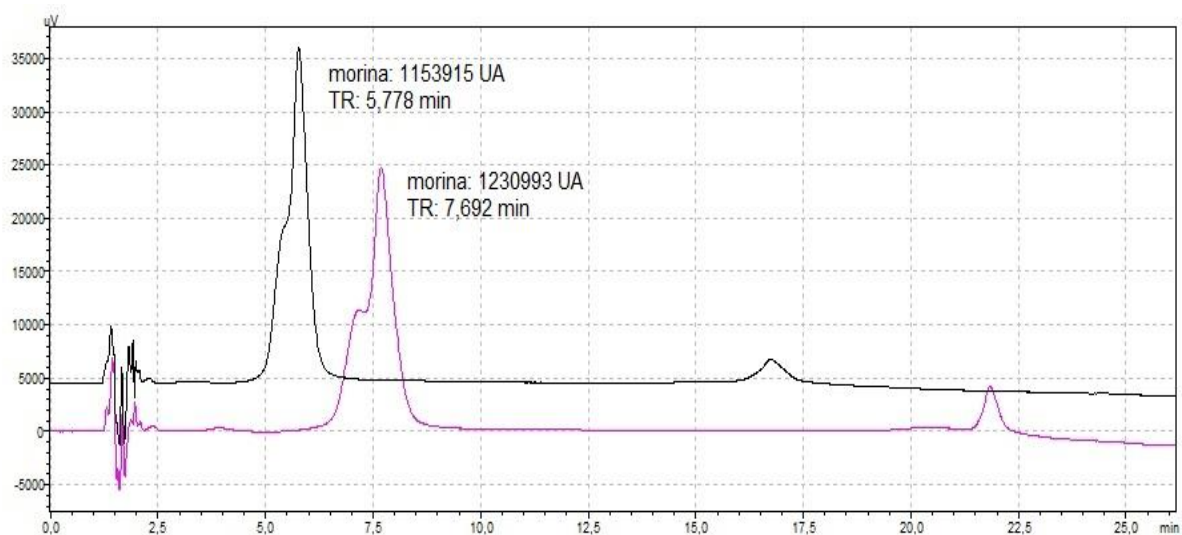


Figura 11. Comparación de Cromatogramas HPLC para el compuesto morina usando la modificación de la metodología de análisis en columna C18 CHROMOLITH®

Se observó que aumentando la proporción de fase acuosa D (de 78 a 80%) y prolongado el tiempo de inicio (hasta 15 min) en modo isocrático, se logra ver un desplazamiento del t_R de la señal de morina de 5,7 a 7,6 min. Además se vio un aumento del área del compuesto debido a un leve ensanchamiento de banda de la señal.

A pesar de las modificaciones realizadas anteriormente, la señal de impureza sigue apareciendo de manera notoria, por lo tanto se decidió evaluar la influencia de ocupar morina de distinto origen, reemplazando la morina dihidratada por una **monohidratada**.

1.3 Comparación de la señal de morina dihidratada versus morina monohidratada

Se preparó una solución stock de morina monohidratada en un matraz de 5 mL aforando con metanol. Se sacaron alícuotas correspondientes a un matraz de 2 mL para una concentración de 5×10^{-5} M. Se agitaron y se sacaron alrededor de 1000 μ L ocupando para ello un vial de análisis HPLC.

Los resultados de los cromatogramas se observan en la siguiente imagen, seguida a 255 nm.

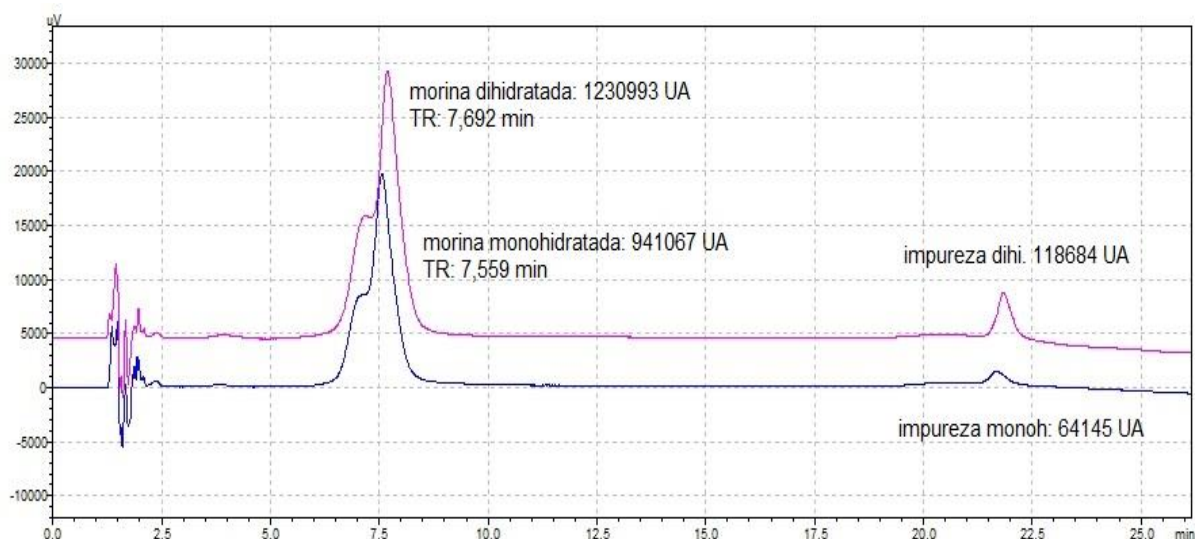


Figura 12. Comparación de cromatograma HPLC de morina monohidratada versus morina dihidratada usando la metodología de análisis en columna C18 CHROMOLITH®

Se observó que con morina monohidratada la señal de impureza disminuye un 46 % respecto a la impureza de morina dihidratada. En relación a la señal del compuesto también se produce una reducción en el valor del área en un 23,5%. La longitud de onda que otorga un mayor valor de área de morina monohidratada es a 251 nm.

En base a estos resultados, **se decidió cambiar el compuesto morina dihidratada a morina monohidratada** para todos los análisis presentes en este estudio.

En base al compuesto seleccionado se realizaron ajustes de flujo de fases para que la señal de morina tenga una forma más perfilada.

1.4 Efecto del flujo de fase móvil en la forma de la señal de morina monohidratada

Se mantuvo la misma metodología creada (80% TFA 0,05/ 20% acetonitrilo, por 15 min) y se modificaron los valores de flujo de fase móvil (mayor a 1 mL/min) para analizar el cambio en la forma de la señal.

Los valores de flujo a evaluar serán de 1,1; 1,3 y 1,5 mL/min, monitorizando a una longitud de onda de detección de 251 nm (máxima área para morina monohidratada).

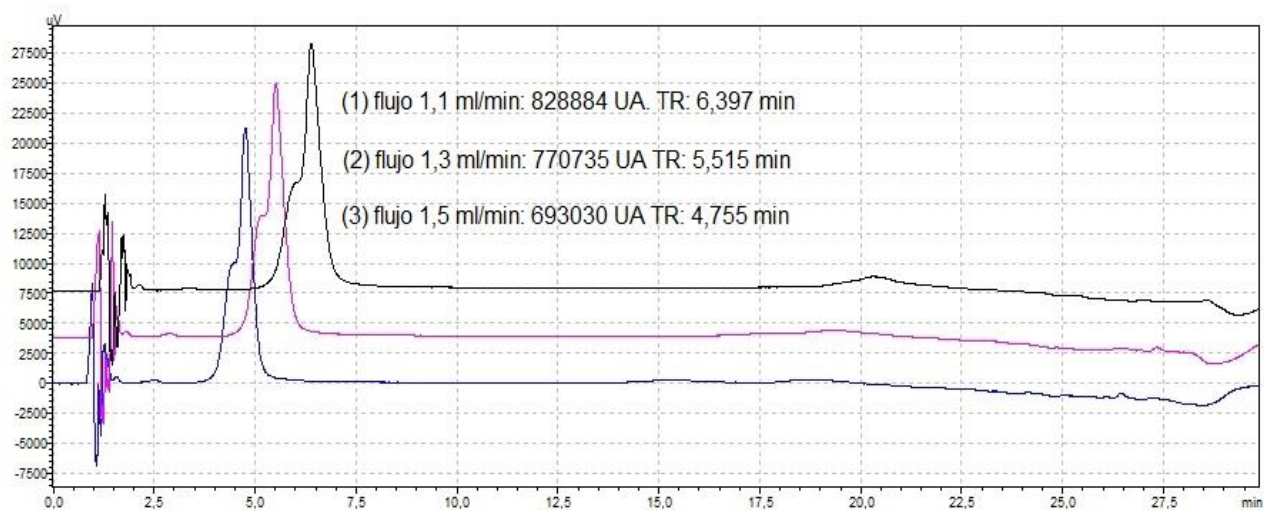


Figura 13. Comparación de cromatogramas HPLC de morina monohidratada a diferentes valores de flujo de fases usando la metodología de análisis en columna C18 CHROMOLITH ®

Se observó que a flujo 1,5 mL/min (tercer cromatograma) se mejora la resolución al momento de disminuir la señal de la impureza y a la vez al ajustar la señal de morina por disminución del área. El problema que se presenta es la proximidad del t_R de la señal de morina a medida que se aumenta el flujo de fase móvil, de esta manera se está reduciendo el rango de tiempo entre señal del solvente y del compuesto, lo que dificulta para observar los productos de degradación. Por lo tanto no se realizó modificación en el flujo de fase en la metodología desarrollada

Surgió la necesidad de probar otra columna de diferentes características a la anterior en cuanto a polaridad y longitud. Se cambió la columna C18 a una columna C8 la cual se caracteriza por tener una menor hidrofobia y un mayor largo de longitud. De esta manera se espera una mejor resolución de los productos de degradación de los compuestos en estudio.

2. Desarrollo de una metodología para la separación de supuestos productos de degradación de polifenoles ocupando una columna C8.

Para el desarrollo de esta metodología se ocupó una columna C8 marca **KROMASIL®** en la cual se realizaron los respectivos ajustes de proporción de fases y flujo de caudal. Para este estudio se utilizó una solución de morina en metanol a una concentración de 5×10^{-5} M.

La proporción de inicio fue de 70% solución TFA al 0,05% (fase D) con 30% de acetonitrilo (fase C) en modalidad isocrática a flujo 1 mL/min. Se realizaron ajustes posteriores para prolongar el t_R del compuesto y mejorar la resolución de la señal.

Los respectivos ajustes realizados para obtener esta metodología se muestran en la siguiente imagen, monitorizada a 255 nm.

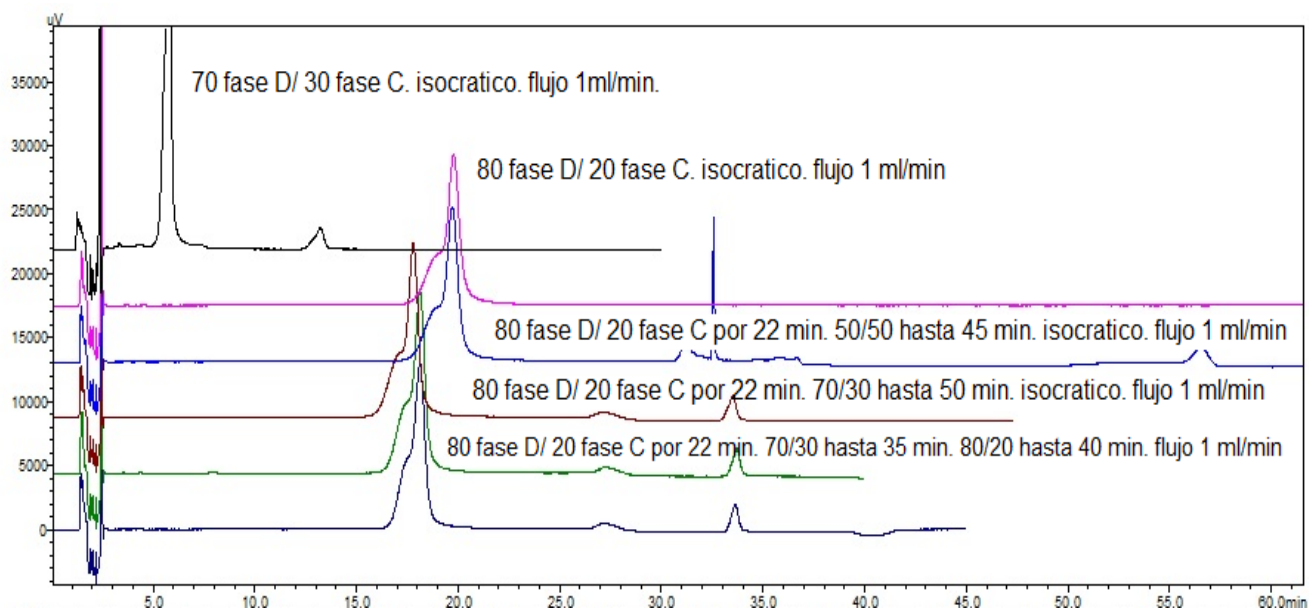


Figura 14. Cromatogramas HPLC correspondientes a morina, mostrando las diferentes modificaciones de proporciones de fases para el desarrollo de metodología en columna C8 **KROMASIL®**

Se observó que con las condiciones iniciales establecidas (70% fase D y 30% fase C) la señal del compuesto aparece a un t_R temprano (5,5 min), lo cual dificulta la observación de los posibles productos de degradación. En base a lo anterior, se decidió aumentar la proporción de fase acuosa (fase D) a un 80%, aumentando de esta manera el t_R del compuesto a 20 min. Se obtuvo de esta forma un amplio rango de tiempo para el seguimiento de los posibles productos. Se realizaron ciertas modificaciones sobrepasando los 22 minutos de elución, para disminuir el t_R de impureza propio de la muestra. Esto se observa en los respectivos cambios de proporciones a partir del tercer cromatograma. Para esto, se aumentó la proporción de fase orgánica después de los 22 minutos quedando finalmente en 30% hasta 35 minutos, volviendo a su condición inicial de 20% hasta 40 minutos finales para obtener 5 minutos de ambientación de columna. El flujo de fase se mantuvo en todo momento en 1 mL/min.

Los parámetros de la nueva metodología se muestran a continuación:

- 0 - 22 min: 20% fase C/ 80% fase D (isocrático)
- 22 - 35 min: 30% fase C/ 70% fase D (isocrático)
- 35 - 40 min: 20% fase C/ 80% fase D (isocrático - condición inicial)
- Flujo: 1 mL/min
- Longitud de onda de análisis: 255 nm
- Volumen de inyección: 30 μ L
- Temperatura de columna: 25°C

Se realizaron procedimientos de fotodegradación para los dos compuestos en estudio ocupando la nueva metodología desarrollada, observando las diferentes nuevas señales que van apareciendo en el rango de tiempo establecido.

2.1 Fotodegradación de morina monohidratada en metanol

Se realizó una fotodegradación exhaustiva del compuesto en medio metanólico con una duración de tiempo máximo de exposición de 300 minutos.

Las señales respectivas de los productos se muestran en la siguiente imagen, monitorizada a 255 nm:

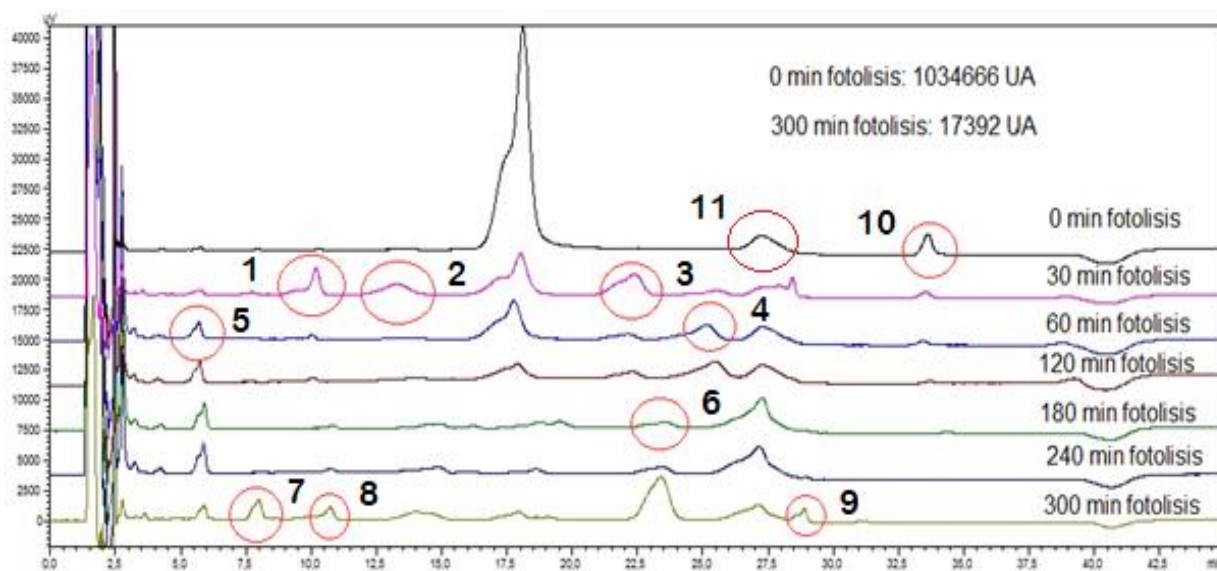


Figura 15. Cromatogramas HPLC correspondientes a morina bajo una fotodegradación exhaustiva en medio metanólico, usando metodología en columna C8 KROMASIL®

Se observó que con 60 minutos de fotodegradación el consumo de morina monohidratada en medio metanólico es de un 80 %. Este cálculo se realizó comparando los valores de áreas del compuesto a tiempo inicial 0 min y tiempo final 60 minutos.

Con esta nueva metodología desarrollada se logran separar algunos productos de degradación de una manera más amplia en comparación con la metodología que utilizó una columna C18.

En cuanto a los tiempos de exposición empleados se observa que a los 30 min se generaron nuevos productos de degradación con tiempos de retención de 10,0 min, 13,5 min y 22,5 min (señal 1, 2 y 3, respectivamente). Las señales de estos productos empiezan a desaparecer a medida que transcurren los tiempos de fotólisis. Por ejemplo, las señales que aparecieron a t_R de 10,0 y 13,5 min ya no se encuentran a los 60 min de exposición y la

señal a t_R 22,5 min empieza a ir desapareciendo gradualmente hasta los 120 minutos de exposición.

Se generaron 2 nuevos productos a los 60 minutos de exposición con t_R de 5 min y 25 min (señal 5 y 4 respectivamente). El producto correspondiente a la señal 5 aumentó su intensidad hasta los 240 min de exposición, luego se empieza a consumir transcurridos los 300 minutos finales. El producto correspondiente a la señal 4 disminuyó por completo su intensidad a 180 minutos de fotólisis.

Se observó que a 180 minutos de exposición, se generó un nuevo producto con t_R de 23,5 min (señal 6), el cual obtuvo una gran intensidad a los 300 minutos de fotólisis.

En cuanto a este último tiempo de exposición se observaron tres nuevos productos de degradación cuyos tiempos de retención son de 8,0 min, 10,5 min y 29,0 min (señal 7, 8 y 9 respectivamente). A este tiempo de exposición la señal de morina monohidratada ya es casi imperceptible, alcanzando un valor de área de integración de 17392 UA.

Por último, se analizaron las variaciones correspondientes a las impurezas de la muestra (señal 10 y 11) las cuales obtienen distintos comportamientos. Para la señal 10, se observó un consumo completo a 60 minutos de exposición. En cambio la señal 11 que tiene un t_R de 27,5 min empieza a ir variando su forma en los distintos tiempos de fotodegradación.

2.2 Fotodegradación de quercetina en metanol

Se realizó una fotodegradación exhaustiva del compuesto en medio metanólico con una duración de tiempo máximo de exposición de 300 minutos.

Las señales respectivas de los productos se muestran en los siguientes cromatogramas, monitorizados a 255 nm.

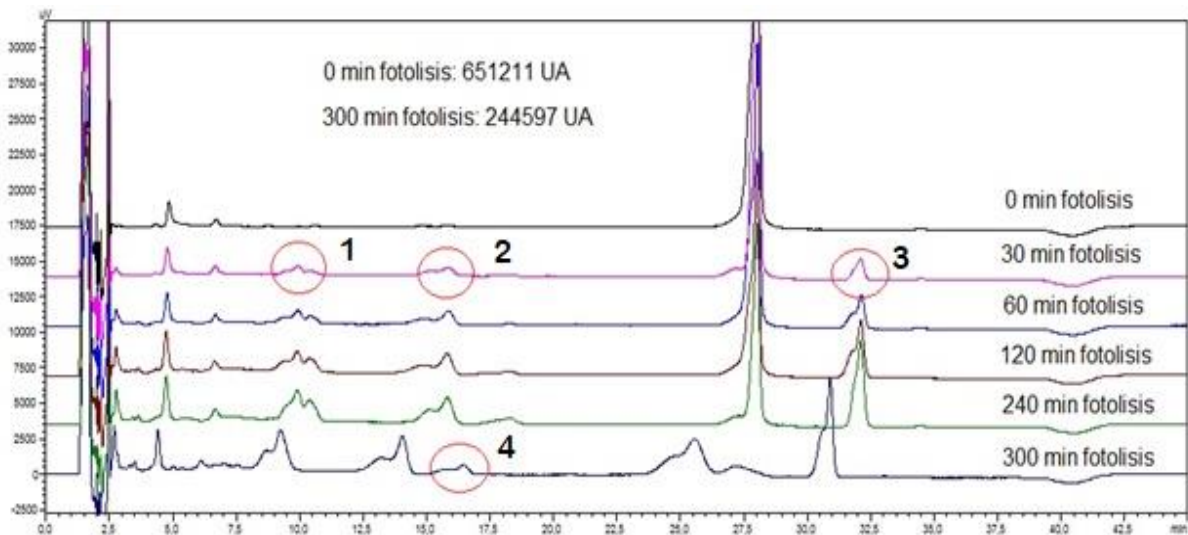


Figura 16. Cromatogramas HPLC correspondientes a quercetina bajo una fotodegradación exhaustiva en medio metanólico, usando metodología en columna C8 KROMASIL®

Se observó que a 300 min de fotooxidación la quercetina se consume en un 62,43%. La nueva metodología desarrollada también es apta para observar los nuevos productos de degradación que van apareciendo para el compuesto de origen quercetina.

A 30 min de exposición se observaron 3 nuevos productos que van aumentando su intensidad a medida que transcurre el proceso. Estas nuevas señales aparecen con t_R de 9,5 min, 15,5 min y 32,0 min (señal 1, 2 y 3 respectivamente)

A 300 minutos de exposición se generó un nuevo compuesto de baja intensidad con t_R de 16,5 min (señal 4).

La señal de quercetina empieza a perder forma a medida que transcurre la fotooxidación, alcanzando un área de 244597 a los 300 min de exposición. El cromatograma que se generó en este tiempo empleado, se adelantó debido a que la fotólisis de 300 minutos se realizó un día posterior a los 5 tiempos anteriores.

En las siguientes tablas se muestra un resumen de las principales señales de los posibles productos de degradación de morina y quercetina en medio metanólico.

Tabla 1. Señales de posibles productos de degradación para morina en medio metanólico

Número de señal	Tiempo de retención (t_R)	Descripción
1	10 min	Se genera a 30 min de fotodegradación y se consume a 60 min.
2	13,5 min	Se genera a 30 min de fotodegradación y se consume a 60 min.
3	22,5 min	Se genera a 30 min de fotodegradación y se consume a 120 min de exposición
4	25 min	Se genera a 60 min de fotodegradación, disminuyendo por completo su intensidad a 180 min de exposición
5	5 min	Se genera a 60 min de fotodegradación, aumentando su intensidad hasta 240 min de exposición, luego disminuye.
6	23,5 min	Se genera a 180 min de fotodegradación, aumentando su intensidad a 300 min de exposición
7	8 min	Se genera a 300 min de fotodegradación
8	10,5 min	Se genera a 300 min de fotodegradación
9	29 min	Se genera a 300 min de fotodegradación

Tabla 2. Señales de posibles productos de degradación para quercetina en medio metanólico

Número de señal	Tiempo de retención (t_R)	Descripción
1	9,5 min	Se genera a 30 min de exposición, aumentando su intensidad a medida que progresa la fotodegradación
2	15,5 min	Se genera a 30 min de exposición, aumentando su intensidad a medida que progresa la fotodegradación
3	32 min	Se genera a 30 min de exposición, aumentando su intensidad a medida que progresa la fotodegradación
4	16,5 min	Se genera a 300 min de exposición con una intensidad baja

2.3 Fotodegradación de morina monohidratada en tampón pH 7,4

Se empleó la metodología para realizar una fotodegradación en un medio acuoso pH 7,4 que sirva de simulación de un medio biológico para el seguimiento de los posibles productos de degradación. Para tal procedimiento se utilizó una solución stock de morina (preparada en metanol), la cual se diluyó a una concentración final de 5×10^{-5} M en un matraz de 2 mL, aforando con tampón TRIS pH 7,4 preparado en forma previa. Para controlar la solubilidad del compuesto en este medio acuoso, las muestras se sonicaron por un tiempo de 5 minutos antes de llevar al vial.

En la siguiente imagen se compara la señal del compuesto en los dos medios empleados.

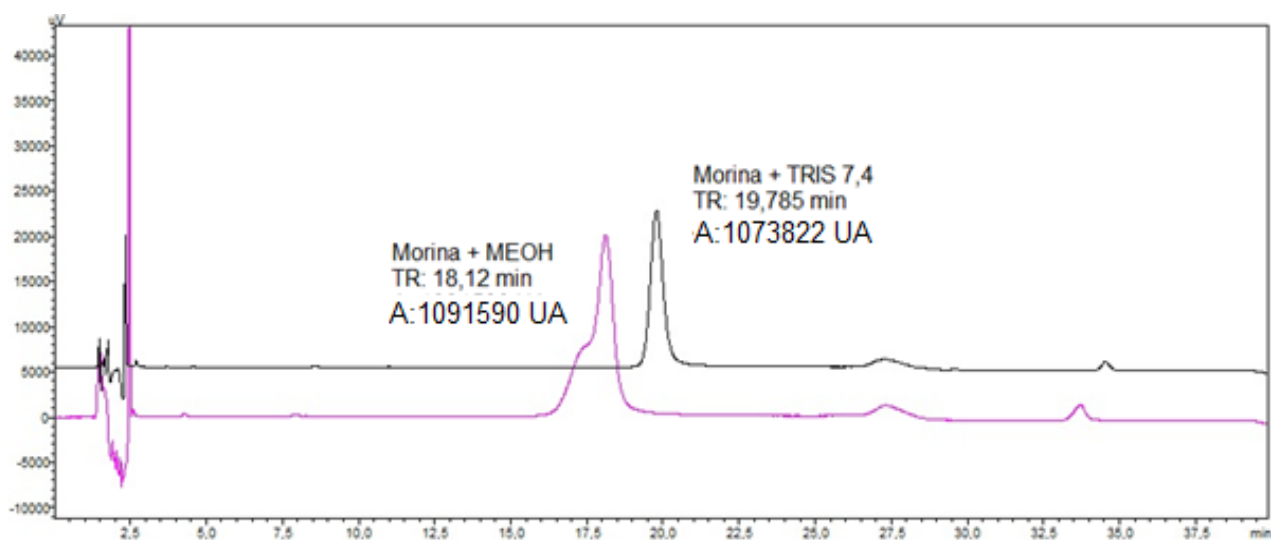


Figura 17. Comparación de cromatogramas HPLC de morina en medio TRIS pH 7,4 y en medio metanólico usando metodología en columna C8 KROMASIL®

Se observó que la señal de morina en tampón pH 7,4 es más perfilada en comparación con medio metanólico. De esta manera no se produce la deformación característica que se observa cuando se encuentra diluida en metanol, disminuyendo su área de integración en un 1,6%.

Con respecto a las señales de impureza, estas mantienen su forma e intensidad en los dos medios de estudio, sin sufrir grandes cambios.

Se evaluó el consumo del compuesto en presencia del oxidante H_2O_2 al 1% sin exponer a luz UV (0 minutos de exposición). Este procedimiento se realizó con la finalidad de observar el consumo intrínseco del compuesto por reacción con peróxido (sin presencia de radical hidroxilo).

Los valores de área respectivos se muestran en la siguiente imagen, monitorizada a 255 nm.

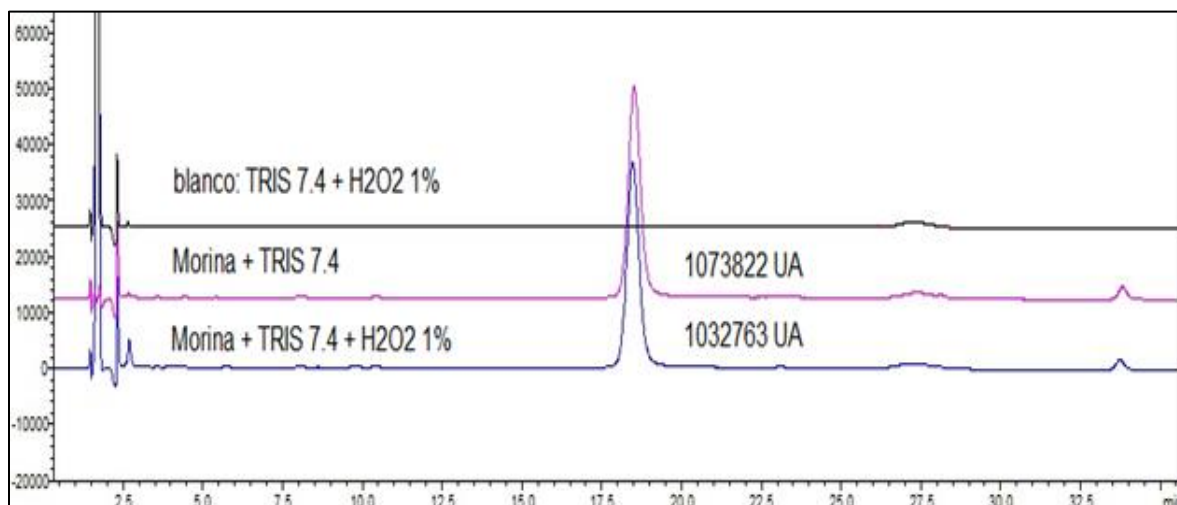


Figura 18. Influencia del oxidante H_2O_2 en la señal de morina cuando está en medio TRIS pH 7,4. La señal se compara con un blanco de muestra que contiene sólo el medio TRIS 7,4 más el oxidante.

Se calcula que morina presenta un consumo intrínseco de 3,8% respecto a la señal del compuesto sin presencia de oxidante. Este resultado sirvió para realizar el

procedimiento de fotodegradación de manera rápida y sincronizada para cada muestra a analizar.

La fotodegradación del compuesto se realizó a un tiempo máximo de **240 minutos**, sonicando cada muestra 5 minutos previos a la adición del oxidante. Los resultados se muestran en los siguientes cromatogramas, monitorizados a 255 nm.

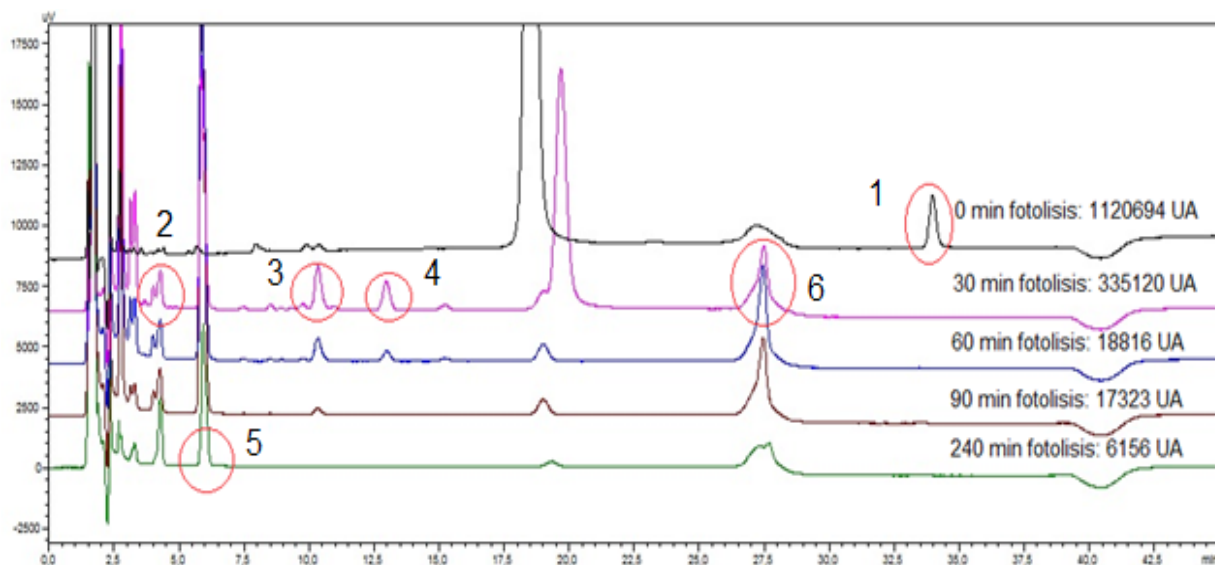


Figura 19. Cromatogramas HPLC de morina en medio TRIS pH 7,4 bajo una fotodegradación por reacción de radical hidroxilo a un tiempo máximo de exposición de 240 minutos.

Se observó que el consumo del compuesto en tampón TRIS pH 7,4 a 240 minutos de exposición fue de un **99,4%**, muy distinto a lo ocurrido en medio metanólico donde a 300 minutos de exposición el compuesto se consumió en un 98,3%. De esta manera se aprecia que en medio acuoso pH 7,4 el consumo del compuesto es mucho mayor en relación a otros medios como el metanólico. Según literatura ^[53] cuando la morina se encuentra en un medio tamponado pH 7,4, el hidroxilo ubicado en la posición 2' del anillo B se encuentra ionizado obteniendo una carga negativa (anión). La presencia de esta carga contribuye a una cinética de reacción más rápida con el radical hidroxilo en comparación con otros medios de estudio como el metanólico, de esta manera se refleja un consumo mayor en medio tamponado.

En cuanto a la señal de impureza que aparece a t_R de 34 min (señal 1), se observó su consumo completo transcurrido 30 minutos de exposición. En medio metanólico, esta señal obtiene su consumo completo a los 60 minutos de exposición.

A 30 minutos de exposición se observaron 5 señales (2, 3, 4, 5 y 6) de posibles productos de degradación, donde algunos coinciden con tiempos de retención analizados en medio metanólico.

La señal número 2 aparece a un t_R de 4,0 min. Esta señal mejora su resolución a medida que transcurre el proceso de fotólisis, obteniendo una buena visualización en este medio, muy distinto a lo que ocurre en metanol donde esta señal no se logra apreciar debido a la poca definición que otorga este medio.

Con respecto a la forma de los cromatogramas, se observó que en medio TRIS pH 7,4 se obtiene una mejor resolución de las señales en comparación a medio metanólico donde las señales presentaban un ensanchamiento de banda que dificultaba la visualización de los productos.

En la Figura 20 se muestra una comparación de los cromatogramas correspondientes a la fotoxidación de morina en medio metanólico y en medio TRIS pH 7,4, observándose los cambios en las formas de las señales de los compuestos principales y su respectiva resolución.

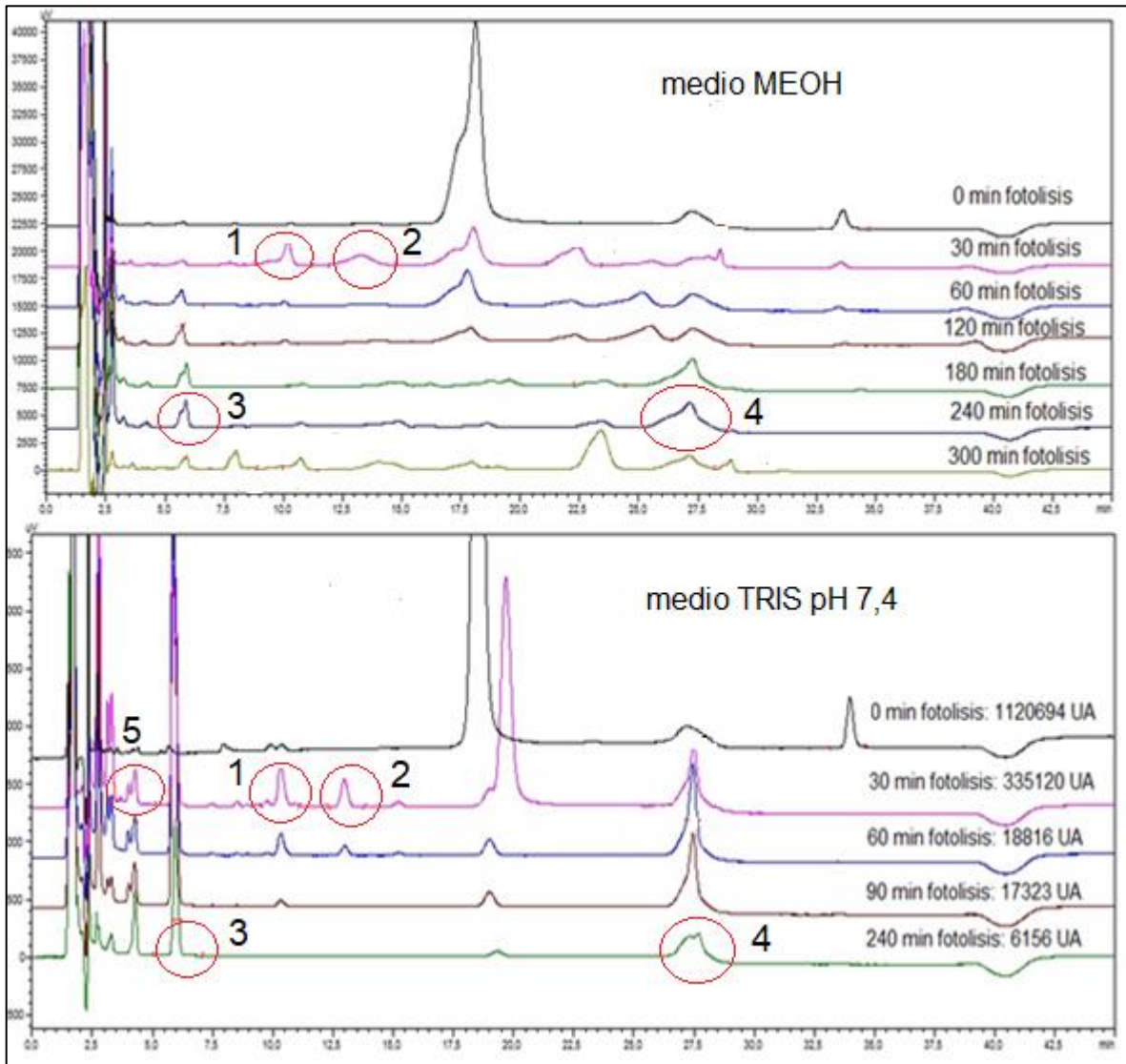


Figura 20. Comparación de los cromatogramas correspondientes a fotodegradación de morina en medio metanólico y en medio TRIS pH 7,4 usando metodología en columna C8 KROMASIL®

Comparando las señales que aparecen en los dos medios se observan 4 coincidencias que aparecen todas a 30 minutos de fotodegradación (señales 1, 2, 3 y 4).

Con respecto a la señal 1, esta obtiene un t_R de 10,0 min en los dos medios estudiados consumiéndose a 60 min de exposición en medio metanólico y a 90 min en pH 7,4.

La señal número 2 tiene un t_R de 12,5 min en medio pH 7,4 y de 13,5 min en medio metanólico, su consumo se produce a los 60 min de exposición en los dos medios.

Con respecto a la señal número 3, esta tiene un t_R de 6,0 min en los dos medios estudiados. Se caracteriza por ser una señal muy pronunciada en medio pH 7,4 que tiende a disminuir su intensidad pasando los 240 min de exposición.

La señal número 4 aparece a un t_R de 27,5 min en los dos medios estudiados. Esta señal tiene una muy baja resolución en medio metanólico lo cual impide seguir su monitorización. Muy por el contrario, se observa con buena resolución en medio pH 7,4 disminuyendo su intensidad a 90 min de exposición.

2.4 Determinación de la composición del tampón pH 7,4 óptimo para el seguimiento del efecto antioxidante de flavonoides por HPLC

Para la determinación del efecto antioxidante de un polifenol a través de la medida de su consumo seguido por HPLC, es imprescindible realizar pruebas en un medio similar al biológico, es decir, en tampón pH 7,4. Este tampón puede ser obtenido usando distintos reactivos, siendo los más utilizados el TRIS-HCl, el PBS y la mezcla de fosfatos. Así, se debió evaluar el efecto de estos medios en la determinación del compuesto en estudio.

Primero se determinó la linealidad de la señal cromatográfica en función de la concentración. La linealidad de la metodología desarrollada se debe establecer en un rango de concentraciones de trabajo que muestre dicha relación en base a los valores de áreas. Para este estudio se establecieron 5 puntos distintos de concentraciones (incluyendo la concentración de trabajo de 5×10^{-5} M). Estas concentraciones se evaluaron en tres medios diferentes (medio TRIS pH 7,4, medio PBS pH 7,4 y otro) determinándose de esta manera el tampón ideal para una buena determinación del compuesto.

Los 5 puntos definidos se prepararon en matraces de 2 mL, adicionando las alícuotas respectivas de solución stock (preparada en metanol) y aforando con los medios especificados.

1) Quercetina en medio TRIS pH 7,4

Se adicionan las alícuotas correspondientes de solución stock de quercetina para cada concentración en matraces de 2 mL, y se afora con solución **TRIS pH 7,4** preparada previamente. Las soluciones fueron sonicadas por 5 minutos y luego se traspasa a viales de análisis HPLC.

Los cromatogramas y los valores reales de concentración se muestran en la siguiente imagen monitorizada a 255 nm.

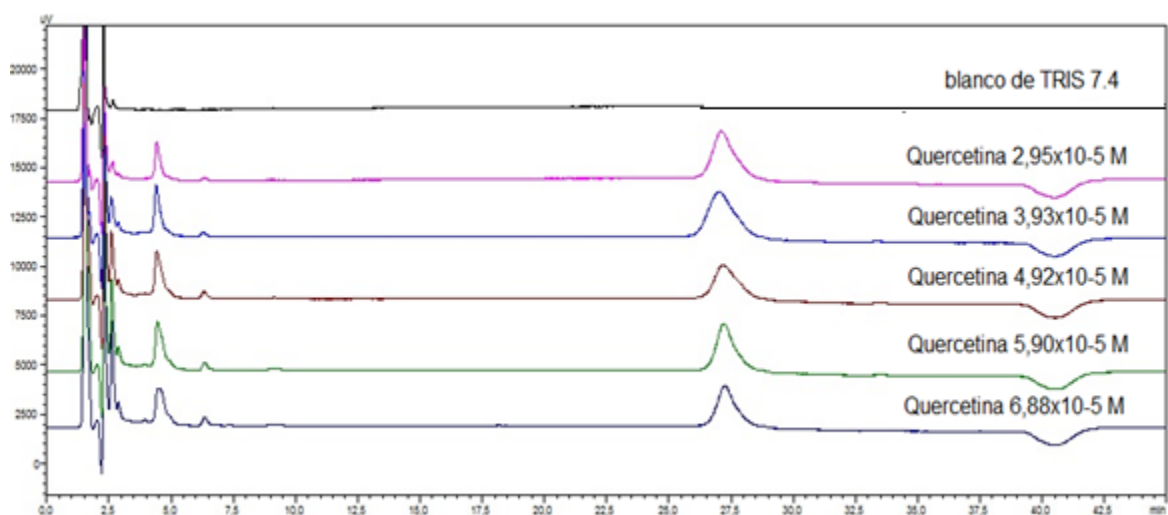


Figura 21. Cromatogramas HPLC para quercetina en medio TRIS pH 7,4 a diferentes concentraciones lineales.

Se observó que la señal de quercetina aparece a un t_R de 27,5 min y presenta una variación en la forma de la señal a las diferentes concentraciones establecidas, Además no existe una relación lineal entre el área de la señal y la concentración. Esto es debido a una disminución en la solubilidad del compuesto en este tampón y por lo tanto, se descarta este medio para el desarrollo de una curva de linealidad.

2) Quercetina en medio PBS pH 7,4

Bajo un procedimiento similar al anterior, se decide evaluar la variación de la señal de quercetina a las mismas concentraciones, cambiando el medio a **tampón PBS pH 7,4**. Los resultados de las concentraciones reales y sus respectivos cromatogramas se muestran en la siguiente imagen.

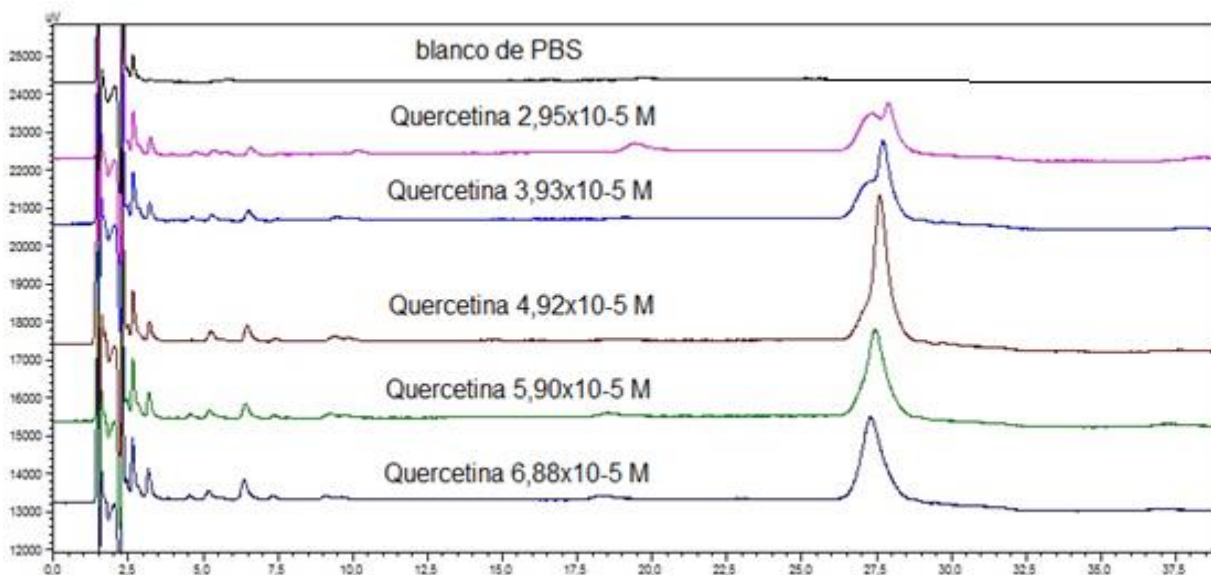


Figura 22. Cromatogramas HPLC para quercetina en medio PBS pH 7,4 a diferentes concentraciones lineales

En primera instancia se observa una señal mucho más definida y más perfilada en comparación con medio TRIS pH 7,4. El aumento en la forma perfilada varía según la concentración de trabajo, obteniéndose una señal óptima a una concentración cercana a la de trabajo (cuarto cromatograma). Después de dicha concentración se tiende a perder la forma establecida, volviendo a generar problemas en la búsqueda de linealidad de la metodología para quercetina.

Los principales problemas vistos anteriormente son reflejo de la poca solubilidad que tiene quercetina en ambos medios estudiados (TRIS pH 7,4 y PBS pH 7,4).

Se evaluó las variaciones de la señal de morina a distintas concentraciones en los mismos medios tamponados vistos anteriormente.

1) Morina en medio TRIS pH 7,4

Se adicionaron alícuotas correspondientes de solución stock de morina monohidratada (en metanol) en matraces de 2 mL aforando con solución tampón TRIS pH 7,4. Los matraces fueron sonicados por 5 minutos antes de adicionar la solución en vial de análisis HPLC.

Los valores de las concentraciones reales junto con sus respectivos valores de áreas y cromatogramas se muestran en la siguiente imagen.

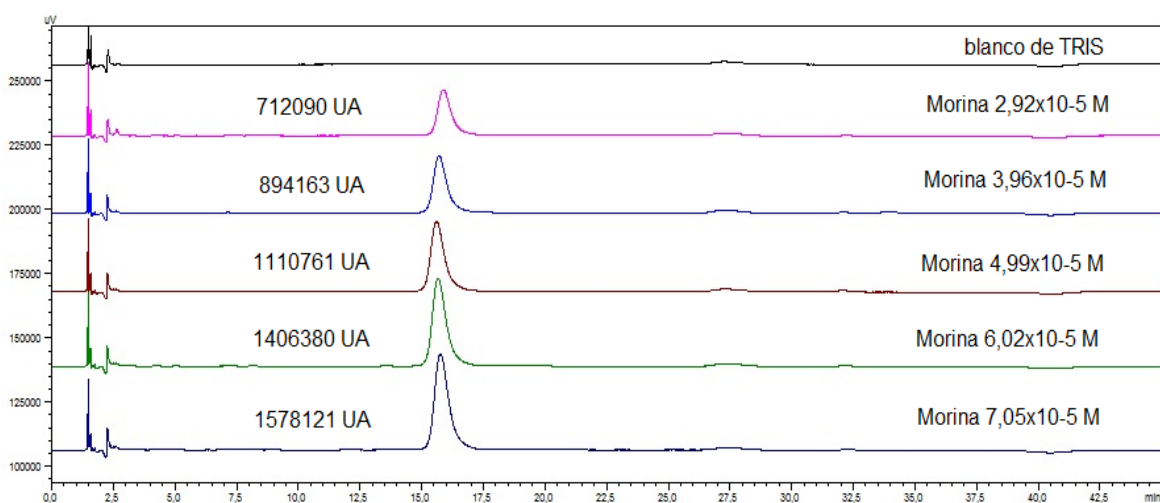


Figura 23. Cromatogramas HPLC para morina en medio TRIS pH 7,4 a diferentes concentraciones lineales

La señal de morina aparece a un t_R 15,7 minutos. Esta señal es mucho más perfilada e intensa en comparación a la señal de quercetina que aparece en este mismo medio. Se logra ver una relación lineal directa entre el aumento de la concentración y el respectivo aumento de área. Los valores de correlación lineal y el respectivo gráfico se observa en la siguiente tabla.

C. real (μM)	ÁREA (UA)
29,2	712090
39,6	894163
49,9	1110761
60,2	1406380
70,5	1578121

Tabla 3. Concentración real de morina (μM) y área en tampón TRIS pH 7,4

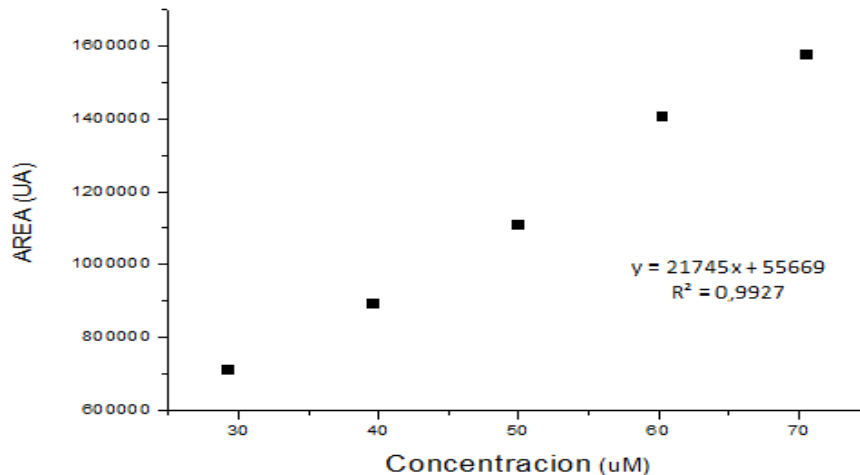


Figura 24. Relación lineal entre concentración de morina (μM) y área en tampón TRIS pH 7,4

En base a los resultados mostrados anteriormente, es posible realizar un estudio de Linealidad de morina en medio TRIS pH 7,4.

2) Morina en metanol

Se adicionaron alícuotas correspondientes de solución stock de morina monohidratada (en metanol) en matraces de 2 mL aforando con metanol. Los matraces fueron sonicados por 5 minutos antes de adicionar la solución en vial de análisis HPLC.

Los valores de las concentraciones reales junto con sus respectivos valores de áreas y cromatogramas se muestran en la siguiente imagen.

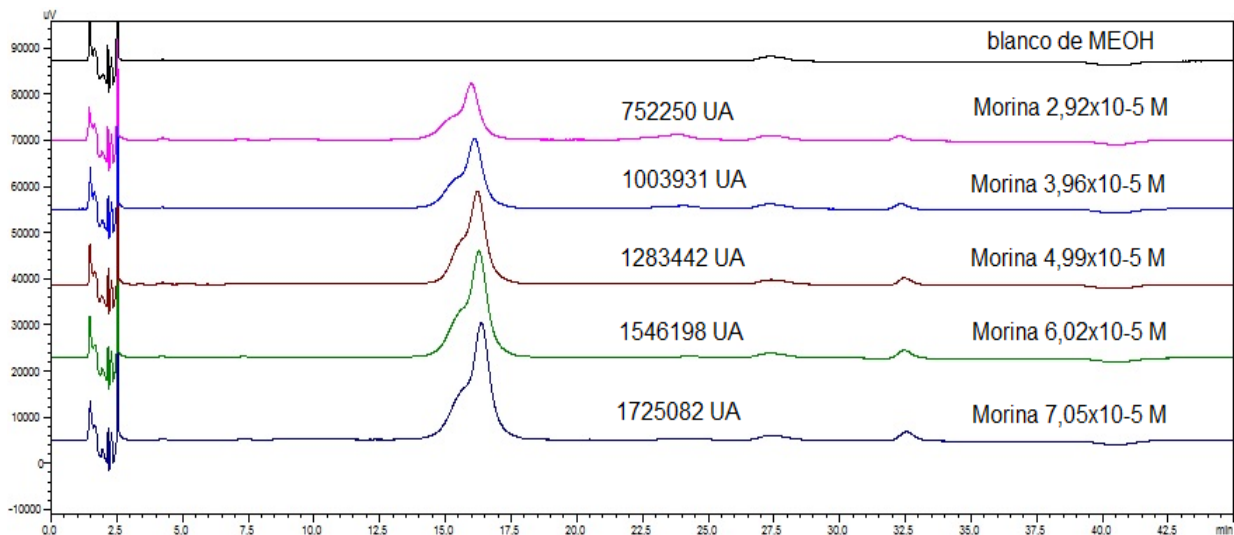


Figura 25. Cromatogramas HPLC para morina en medio metanólico a diferentes concentraciones lineales

Se observa que en medio metanólico se produce una deformación de la señal de morina debido a una cierta interacción que se genera con este solvente. Se mantiene la misma forma de la señal a medida que aumenta la concentración, y los valores de áreas muestran una relación lineal con dicho aumento.

Los valores de correlación lineal y el respectivo gráfico se muestran a continuación.

C. real (μM)	ÁREA (UA)
29,2	752250
39,6	1003931
49,9	1283442
60,2	1546198
70,5	1725082

Tabla 4. Concentración real de morina (μM) y área en medio metanólico

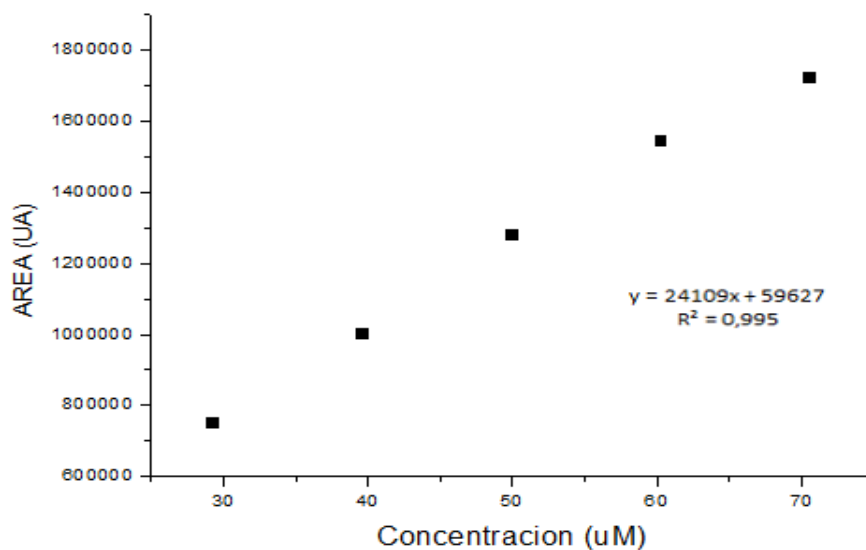


Figura 26. Relación lineal entre concentración de morina (μM) y área en medio metanólico

En base a los resultados mostrados anteriormente, es posible realizar una curva de linealidad de morina en metanol a las concentraciones establecidas.

3) Morina en medio PBS pH 7,4

Bajo el mismo procedimiento, se aforaron los matraces de 2 mL con solución tampón PBS pH 7,4. Los resultados de las concentraciones reales y sus respectivos cromatogramas se muestran en la siguiente imagen.

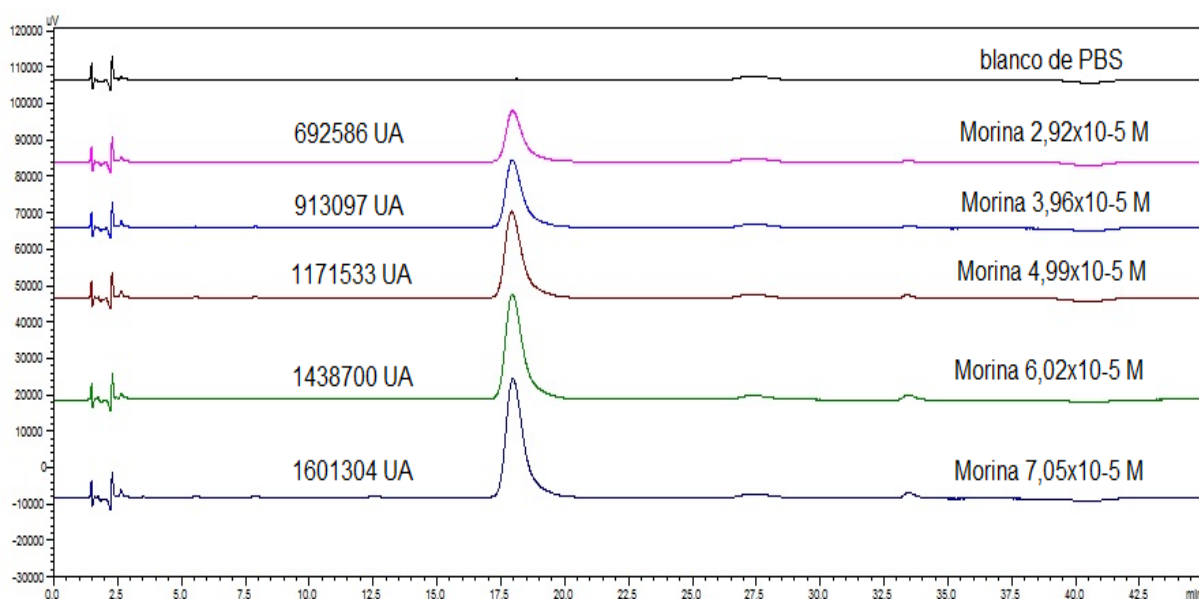


Figura 27. Cromatogramas HPLC para morina en tampón PBS pH 7,4 a diferentes concentraciones lineales.

En cuanto a la forma de la señal del compuesto se observa que es definida en todo el rango de concentración, con una asimetría del tipo “posterior” (tailing posterior). Esta forma es muy distinta a la que se muestra en medio TRIS 7,4, donde la forma de la señal era de tipo “gaussiana”.

Respecto a la relación lineal existente entre el aumento de concentración y área se observa una tendencia lineal con un valor R de 0,995 muy similar al valor dado en medio metanólico.

Los resultados de correlación lineal y su respectiva curva se muestran a continuación.

C. real (μM)	ÁREA (UA)
29,2	692586
39,6	913097
49,9	1171533
60,2	1438700
70,5	1601304

Tabla 5. Concentración real de morina (μM) y área en medio PBS pH 7,4

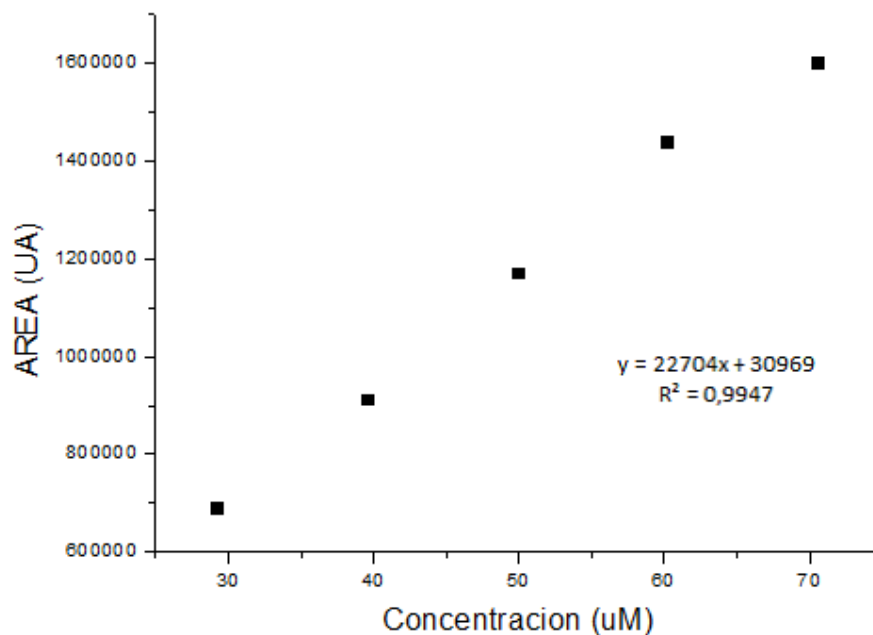


Figura 28. Relación lineal entre concentración de morina (μM) y área en medio PBS pH 7,4

En base a los resultados mostrados anteriormente, es posible realizar una curva de linealidad de morina en tampón PBS a las concentraciones establecidas.

El medio tampón pH 7,4 más adecuado para realizar un estudio de linealidad de la metodología es PBS, por lo tanto este estudio se llevó a cabo utilizando sólo morina como compuesto en estudio, debido a que presenta una solubilidad adecuada en los medios descritos anteriormente.

Del análisis de las pendientes de las curvas de calibración se observa que la sensibilidad de la metodología aplicada a los tres medios es idéntica.

2.5 Estudio de linealidad de metodología en columna C8 KROMASIL para morina en tampón PBS pH 7,4

El rango de concentración utilizado para este estudio fue de 25,8 μM hasta 103 μM utilizando 5 puntos de medición. El rango establecido fue un poco más amplio que el asignado para el estudio de determinación de tampón pH 7,4 (29,2 μM – 70,5 μM) para observar si la tendencia lineal se mantiene a rangos superiores.

El estudio se realizó en triplicado (3 series) colocando la alícuota respectiva de solución stock de morina (en metanol) en matraces de 2 mL aforando con solución tampón PBS pH 7,4. Para las tres series analizadas se observó una tendencia lineal entre las curvas de dispersión en el rango de concentración estudiado.

Los valores de concentración real y área para cada punto se muestran en la siguiente tabla (Tabla 6) con la respectiva curva de linealidad de acuerdo al promedio de las áreas (Figura 29).

C. real (μM)	Área serie A (UA)	Área serie B (UA)	Área serie C (UA)	Promedio Área (UA)	Desviación estándar (Áreas)
25,8	1070276	1005963	1022497	1032912	33397,5
43,0	1539390	1573507	1496950	1536615	38353,8
60,2	1897435	1963554	1858155	1906381	53265,9
86,0	2578278	2680657	2559834	2606256	65089,4
103,2	2941901	3013072	2935418	2963463	43084,1

Tabla 6. Promedio y desviación estándar de las áreas para las tres series de morina a 5 concentraciones diferentes en el estudio de linealidad.

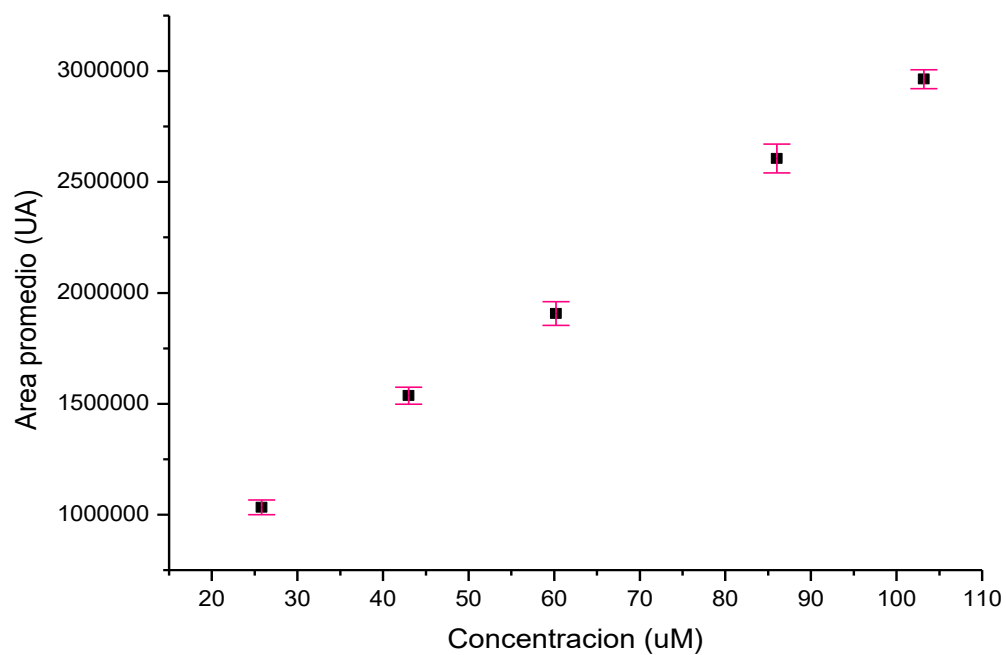


Figura 29. Relación lineal del promedio de las áreas para las 3 series de soluciones de morina realizadas a 5 puntos de concentraciones distintas

3. Desarrollo de una metodología HPLC para el seguimiento del consumo de flavonoides utilizando una columna C18

Se desarrolló una metodología HPLC para evaluar el consumo de los polifenoles en estudio utilizando una columna C18 marca “**INERTSUSTAIN ®**”, donde solamente interesa ver la señal del compuesto y no sus productos de degradación. De esta manera se seleccionó una longitud de onda de **360 nm** correspondiente a la máxima absorción de los compuestos en estudio.

La metodología desarrollada se debió optimizar de tal manera que sea de uso rápido (las señales deben salir lo más temprana posible) y que tenga buena resolución (la forma de la señal debe ser lo más gaussiana posible).

Se realiza una primera prueba con una muestra de quercetina en metanol a una concentración de 5×10^{-5} M. La fase orgánica del método es acetonitrilo (ACN) mientras que la fase acuosa consistió en una disolución de ácido trifluoroacético al 0,05% (TFA). Se comienza con una proporción de 90% ACN/ 10% TFA a un flujo inicial de 1 mL/min en modalidad isocrática.

En los análisis posteriores se fueron modificando los porcentajes de tal manera que la fase orgánica disminuyera en unidades de 10% hasta obtener la señal de quercetina en un tiempo razonable y con la mayor resolución posible.

En la siguiente imagen se muestra las respectivas variaciones en los porcentajes tanto de fase orgánica como de fase acuosa y la variación en el flujo para obtener una señal acorde a las características buscadas:

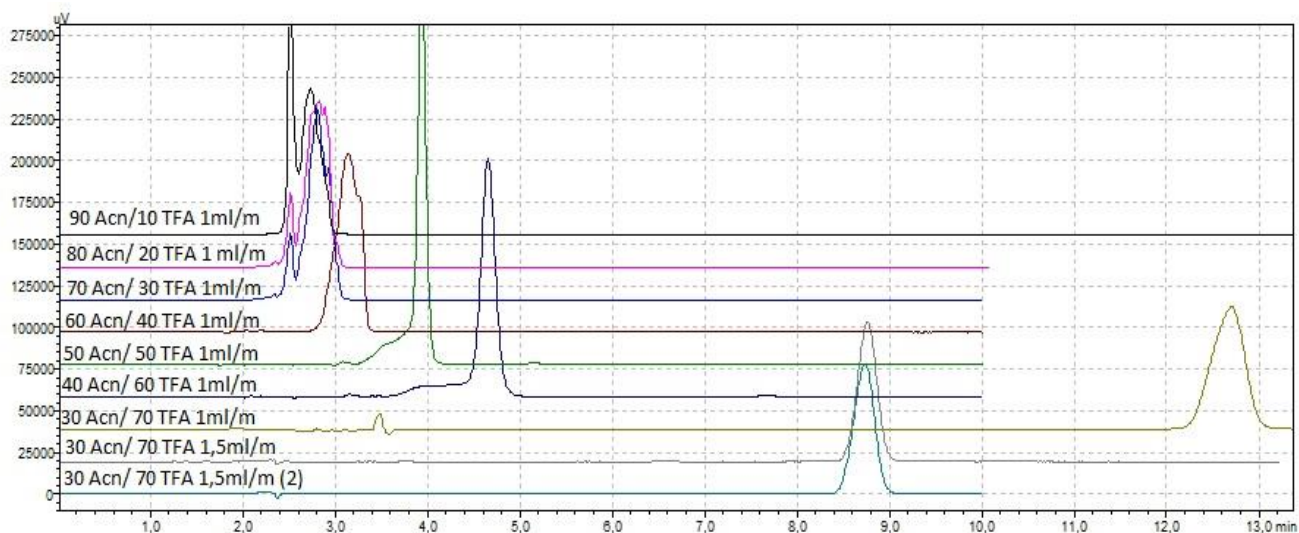


Figura 30. Variaciones en las proporciones de fase móvil y ajustes de flujo para el desarrollo de una metodología de consumo en una columna C18 INERTSUSTAIN ®

En la imagen anterior se observa que a mayor proporción de fase orgánica (ACN) la señal del polifenol tiende a aparecer a menores tiempos de retención, junto con la señal del frente de solvente (primer cromatograma). A medida que la fase orgánica va disminuyendo su proporción y la fase acuosa va aumentando se observa que la señal tiende a separarse del frente de solvente, aumentando su tiempo de retención y mejorando su resolución (séptimo cromatograma, cuyas proporciones fueron 30% ACN y 70% TFA a flujo 1 mL/min).

Para mejorar la rapidez de la metodología se decide aumentar el flujo de fase móvil de 1 mL/min a 1,5 mL/min, obteniéndose una señal de quercetina a un tiempo de retención de 8,7 min y con una resolución adecuada. Esta última modificación se analiza en duplicado (octavo y noveno cromatograma).

Una vez desarrollada la metodología para quercetina, se decidió adaptar el método para morina, la cual se trabaja con la misma concentración de compuesto en metanol (5×10^{-5} M). La muestra se analiza con la misma metodología desarrollada para quercetina (30% ACN/ 70% TFA a flujo 1,5 mL/min en modo isocrático).

Con el método detallado anteriormente se observa que la señal de morina aparece a t_R de 6,6 min mostrando dos impurezas a tiempo de retención 9,0 y 17,0 min. Surgió la necesidad de aumentar la proporción de fase orgánica (a 100%) pasando los 10 min de corrida de muestra para acelerar la elución de la impureza de 17 min y de esta manera se

pueda optimizar el tiempo de análisis. Los resultados de dichas modificaciones se muestran en la siguiente imagen.

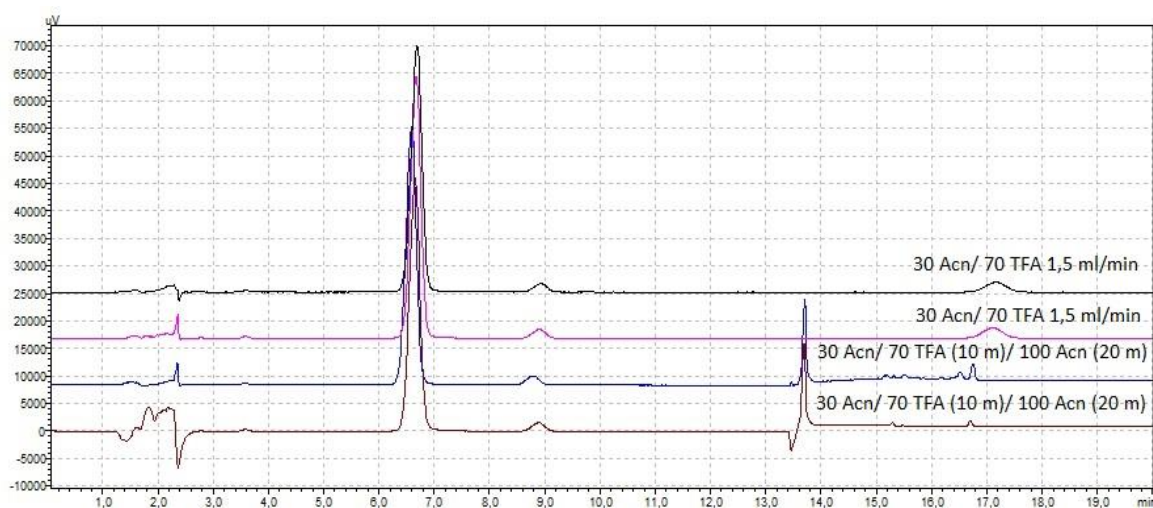


Figura 31. Modificaciones de proporción de acetonitrilo después de 20 minutos para adaptación del método a morina monohidratada

Por lo tanto la metodología de consumo desarrollada para los dos polifenoles en estudio queda de la siguiente manera:

- 30% acetonitrilo/ 70% ácido trifluoroacético (al 0,05% v/v) por 10 minutos (isocrático)
- 100% acetonitrilo hasta los 20 minutos (isocrático)
- Flujo: 1,5 mL/min
- Longitud de onda: 360 nm
- Temperatura de columna: 25°C

La metodología desarrollada anteriormente puede ser empleada para realizar el seguimiento del consumo de los dos polifenoles en estudio (quercetina y morina). Pese a que la metodología se desarrolló con quercetina en medio metanólico, no es posible efectuar un seguimiento de este compuesto en medio acuoso pH 7,4 por la baja solubilidad que presenta el compuesto en este tipo de medios (vista anteriormente en estudio de determinación de tampón pH 7,4 en columna C8 KROMASIL). Por lo tanto para los

estudios que vienen a continuación, se realizará el seguimiento de consumo sólo con morina por presentar una solubilidad adecuada en medios acuosos a pH 7.4

Como simulación de medio biológico pH 7,4 se trabajará con un tampón constituido por una solución acuosa de 50 mL de KH_2PO_4 y 39 mL de NaOH ajustada al pH requerido. De esta manera se excluye el uso de tampón PBS (utilizado en estudio) por tener una mayor carga de sales que pueden contribuir a una disminución de la solubilidad del compuesto.

3.1 Estudio de linealidad para metodología de consumo de morina

La linealidad fue evaluada para 2 medios de dilución (agua milli Q y tampón pH 7,4) tomando 6 puntos de concentración para cada uno. Los puntos a tomar se encuentran dentro de intervalos de concentración distintos debido al uso de dos soluciones stock distintas de morina para cada medio. Estos intervalos tomaron valores entre 2,8 μM – 43 μM para agua milli Q y entre 3,52 μM – 49 μM para tampón pH 7,4.

Los coeficientes de relación lineal (R) dieron sobre 0,999 para los dos medios evaluados obteniéndose la mayor linealidad para tampón pH 7,4 y los valores de sensibilidad para los dos medios dieron sobre 1×10^{10} . Estos resultados se muestran en las siguientes tablas y gráficos.

Linealidad en agua Milli Q

Concentración stock (M)	Alícuotas de s. stock (μL)	Volumen final (μL)	Concentración final (μM)	Área (UA)
$1,72 \times 10^{-3}$	3	1800	2,86	26768
$1,72 \times 10^{-3}$	9	1800	8,60	82259
$1,72 \times 10^{-3}$	15	1800	14,3	139688
$1,72 \times 10^{-3}$	30	1800	28,6	270334
$1,72 \times 10^{-3}$	40	1800	38,2	369795
$1,72 \times 10^{-3}$	45	1800	43,0	420696

Tabla 7. Valores de concentraciones y áreas para estudio de linealidad de morina en Milli Q usando metodología de consumo en columna C18 INERTSUSTAIN ®

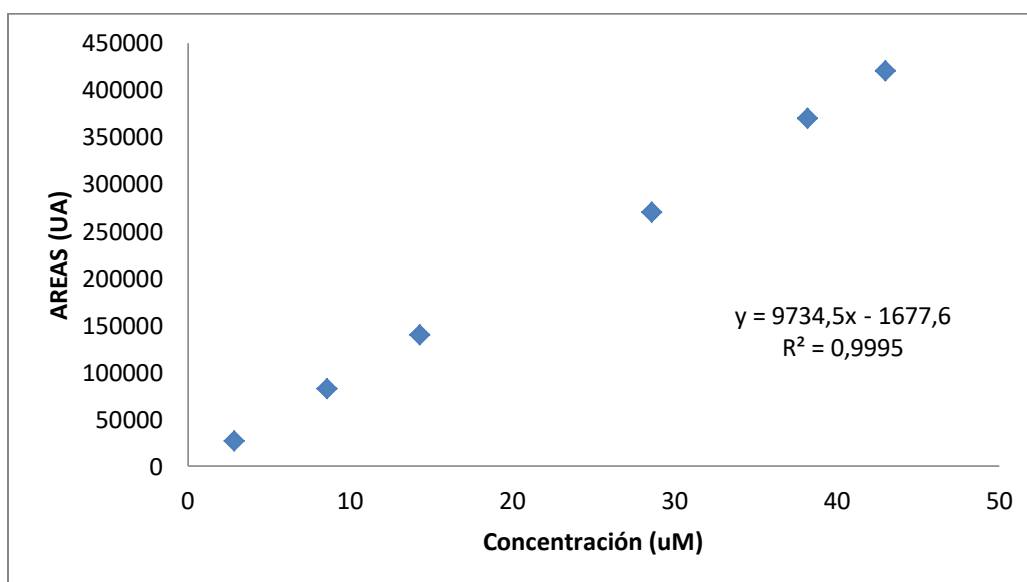


Figura 32. Relación lineal para las 6 concentraciones distintas de morina en agua milli Q usando metodología de consumo en columna C18 INERTSUSTAIN ®

Linealidad en tampón pH 7,4

Concentración stock (M)	Alícuotas de s. stock (µL)	Volumen final (µL)	Concentración final (µM)	Área (UA)
$3,18 \times 10^{-3}$	2	1800	3,52	43569
$3,18 \times 10^{-3}$	5	1800	8,82	109739
$3,18 \times 10^{-3}$	8	1800	14,1	185310
$3,18 \times 10^{-3}$	11	1800	19,4	258831
$3,18 \times 10^{-3}$	14	1800	24,7	331988
$3,18 \times 10^{-3}$	28	1800	49,4	669444

Tabla 8. Valores de concentraciones y áreas para estudio de linealidad de morina en tampón pH 7,4 usando metodología de consumo en columna C18 INERTSUSTAIN®

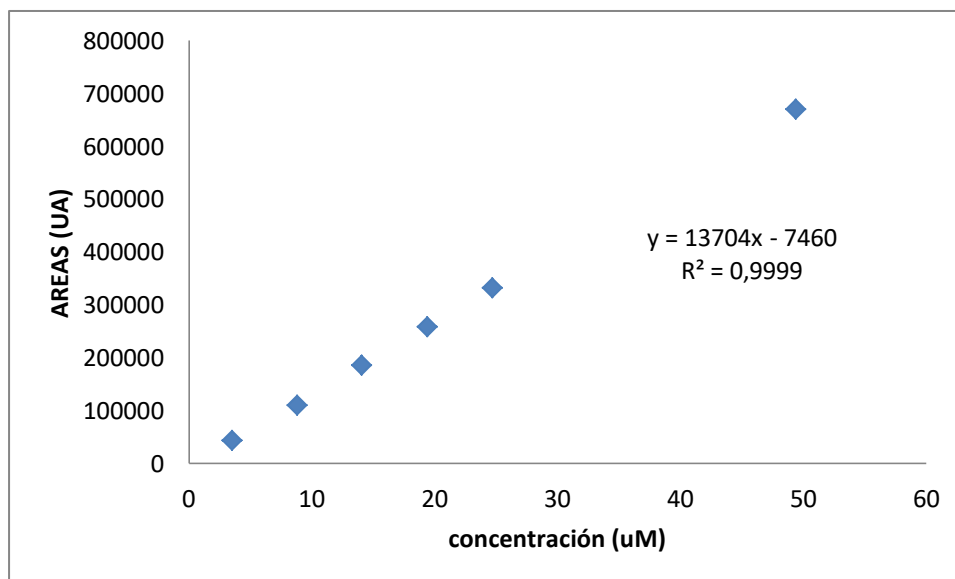


Figura 33. Relación lineal para las 6 concentraciones distintas de morina en tampón pH 7,4 usando metodología de consumo en columna C18 INERTSUSTAIN®

3.2 Estudio de precisión para metodología de consumo de morina

La precisión del método indica el grado de dispersión en una serie de mediciones de una misma muestra. Se evaluó la precisión de la metodología preparando dos soluciones madres de morina en etanol que luego fueron diluidas (en triplicado) a una concentración de $2,47 \times 10^{-5}$ M con tampón pH 7,4. La concentración final de dilución se encuentra dentro del rango de linealidad de la metodología. Las soluciones madres se prepararon pesando alrededor de 4,8 mg de compuesto en un matraz de 2 mL aforando con etanol. Las diluciones se llevaron a cabo utilizando tubos Eppendorf a un volumen final de 1800 μ L.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Concentración vial (M)	t_R (min)	Áreas (UA)
$2,47 \times 10^{-5}$	6,641	326843
	6,608	323208
	6,591	335126
$2,46 \times 10^{-5}$	6,740	345086
	6,704	328115
	6,674	341847
promedio (UA)	6,660	333371
Desviación estándar	0,057	8782,8
CV (%)	0,859	2,6346

Tabla 9. Valores promedios de áreas y tiempos de retención para las diluciones en triplicados de las 2 soluciones stock ocupadas en estudio de precisión.

4. Evaluación de la interacción de morina con albúmina BSA en la metodología de consumo

Se evalúa cómo influye el proceso de interacción de morina con BSA en la señal del compuesto. Para esto se preparó una solución stock de morina en etanol ($9,26 \times 10^{-4}$ M) y otra en metanol ($3,18 \times 10^{-3}$ M). Se trabajó con una concentración de análisis cercana a 4×10^{-5} M para morina y para BSA en medio pH 7.4. Se llevó a cabo la extracción ocupando la solución de acetonitrilo / tetrahidrofurano (3:2) realizando el proceso de centrifugación (duración 5 minutos a 20000 rcf) y posterior filtración. A continuación se analiza cómo varía la forma de la señal de morina en el proceso de extracción.

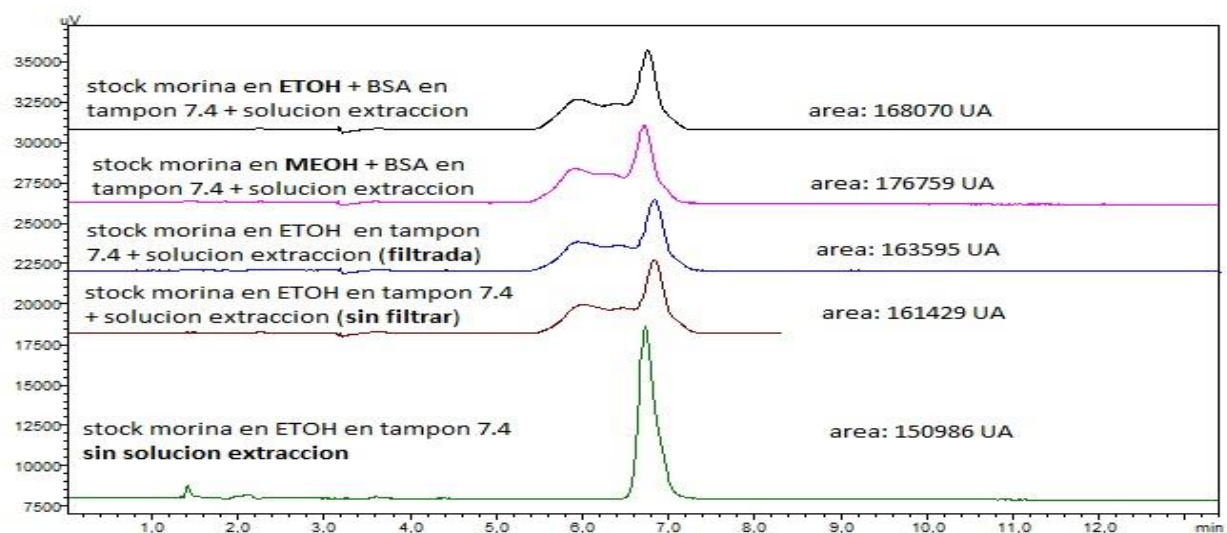


Figura 34. Variación en la forma de la señal de morina por uso de solución de extracción

Los cromatogramas mostrados anteriormente dan cuenta del origen de la deformación de la señal de morina debido al uso de la solución de extracción empleada para desproteinizar la solución con albumina antes de la inyección.

Los dos primeros cromatogramas indican la posible influencia del solvente de disolución empleado para preparar las muestras stock de morina. En este caso se evalúa si metanol o etanol influyen en la deformación de la señal. Como estos cromatogramas mantienen la misma forma, se descarta la influencia de estos solventes en la deformación.

El tercero y cuarto cromatograma muestran la posible influencia del proceso de filtración de la muestra antes de inyectar. Para esto se sacó una alícuota correspondiente al stock de morina en etanol y se llevó a volumen (2 mL) con tampón pH 7,4 sin presencia de albúmina (para los dos cromatogramas). Luego se sacaron 500 μ L de esta solución y se diluyeron con 1000 μ L de solución ACN/THF (3:2). Una de las muestras fue filtrada antes de inyectar (tercer cromatograma) mientras que la otra se inyectó directamente (cuarto cromatograma). Como resultado se mantuvo la misma forma de la señal de morina descrita anteriormente, descartando el efecto del filtrado en la deformación de la señal.

Por último se decide preparar los mismos 2 mL de alícuota de stock de morina en tampón pH 7,4 y sacar 500 μ L de esta misma solución para diluir con 1000 μ L de tampón, excluyendo el uso de solución de extracción. De esta manera se obtiene una señal perfilada de morina indicando que **la solución de extracción influye en la deformación de la señal.**

Con respecto a las áreas de las señales, se observa que todas mantienen unidades cercanas, siendo la de menor valor la correspondiente a la muestra sin solución de extracción.

Se decide realizar una solución que contenga sólo proteína BSA en tampón pH 7,4. Para esto se adiciona la alícuota de BSA en un matraz de 2 mL y se afora con solución tampón. Luego se sacan 500 μ L de esta solución y se diluyen con 1000 μ L de solución de extracción, pasando por el proceso de centrifugación y posterior filtración. Los cromatogramas se muestran en la siguiente imagen:

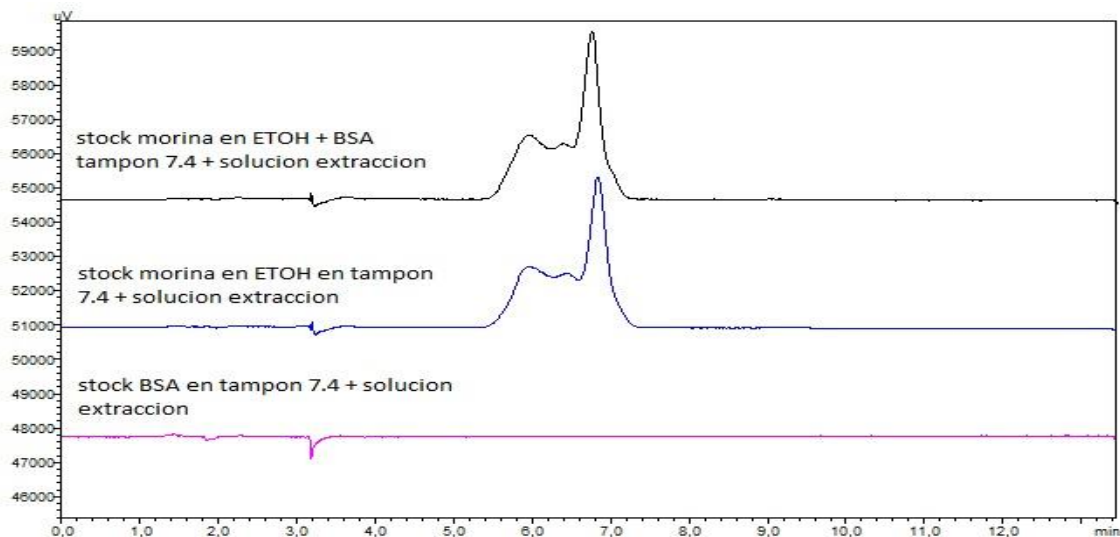


Figura 35. Cromatogramas HPLC para la verificación de posibles señales correspondiente a albúmina BSA

Los dos primeros cromatogramas corresponden a la señal de morina con la deformación producida por el solvente de extracción. El primer cromatograma corresponde a morina interactuando con BSA, en cambio el segundo corresponde a la señal de una muestra sin proteína BSA. El tercer cromatograma pertenece a la muestra de BSA descrita anteriormente y en él se observa que **no aparece la señal correspondiente**, indicando que la BSA no presenta una señal de interferencia en la determinación de morina.

5. Determinación del porcentaje de recuperación de morina interactuando con BSA aplicando la metodología desarrollada

Antes de proceder a los estudios de eficiencia antioxidante, se calcula el porcentaje de recuperación de morina obtenido del proceso de extracción. Para esto se prepararon 3 soluciones de referencia donde cada una contiene una alícuota de morina stock en etanol y de proteína BSA, ambas a una concentración de 4×10^{-5} M, aforadas a 2 mL con solución tampón pH 7,4. Las muestras preparadas estuvieron en reposo por un tiempo mayor a 30 minutos antes de someterlas a extracción.

Para cada una de las soluciones preparadas se sacaron 500 μL en triplicado a un tubo eppendorf y se mezclaron con 1000 μL de solución de extracción. Se llevaron a vórtex por 1 minuto y luego a centrifugación por 5 minutos a 20000 rcf. Cada muestra fue filtrada a un vial HPLC llevando a análisis con la metodología de consumo desarrollada.

De forma paralela se prepararon 3 soluciones estándar en matraces de 2 mL con la misma alícuota de morina stock en etanol sin presencia de albumina, aforando con tampón pH 7.4. Estas soluciones fueron diluidas al mismo factor que las muestras de referencia con solución de extracción, utilizando para ello tubos Eppendorf.

Los valores de áreas promedio tanto para las muestras de referencia como para los estándares se muestran en la siguiente tabla junto con el valor de recuperación calculado.

solución	Área (UA)	Promedio Áreas (UA)	promedio total (UA)	% recuperación
1	156965			
1	162469			
1	158886	159440		
2	165136			
2	165743			
2	161329	164069		
3	164311			
3	158787			
3	150786	157961	160490	
Estándar 1	170331			
Estándar 2	171085			
Estándar 3	169793	170403	170403	94,2

Tabla 10. Valores promedios de áreas para las diluciones en triplicado de las 3 soluciones de referencia y soluciones estándares para cálculo de porcentaje de recuperación

En cuanto a los resultados mostrados anteriormente se observa que se recupera un **94,2%** del compuesto extraído de la interacción con albúmina, utilizando la solución de extracción en las proporciones establecidas.

6. Evaluación preliminar de la eficiencia antioxidante

Para evaluar la eficiencia antioxidante de morina frente al ataque del radical hidroxilo generado por fotólisis del peróxido de hidrógeno, se determina el consumo del compuesto en función del tiempo de acuerdo a la metodología descrita anteriormente. Este consumo se determina tanto en medio acuoso (agua Milli Q) y en tampón pH 7,4. Se trabajó con una concentración fija de morina y los análisis se hicieron en triplicado.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que en medio acuoso (agua Milli Q) la morina se degrada más de la mitad (46,5 %) a los 25 minutos de exposición, como se presenta en la tabla y gráfico siguiente:

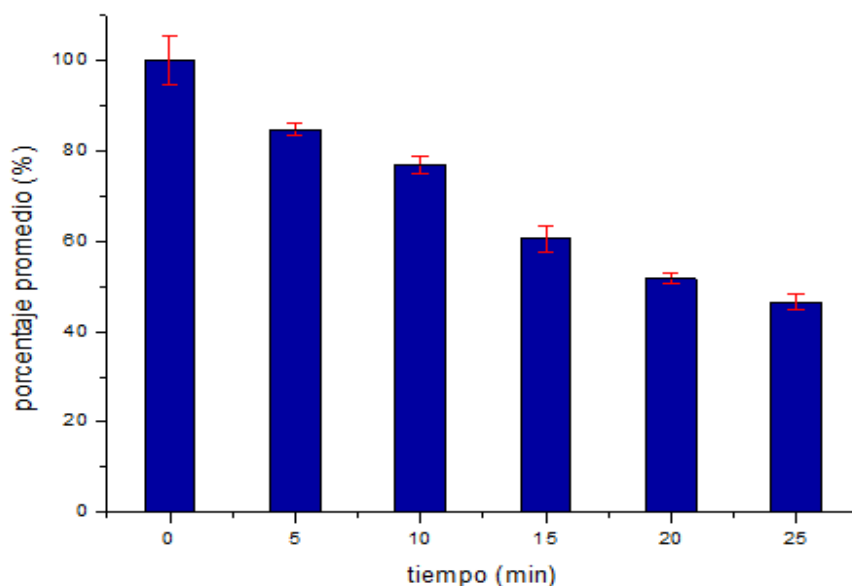


Figura 36. Variaciones en porcentajes de consumo de morina en agua Milli Q a los respectivos tiempos de fotodegradación.

Concentración morina (M)	Tiempo exposición (min)	Área (UA)	Promedio (UA)	Porcentaje Promedio (%)
$3,87 \times 10^{-5}$	0	311913		
	0	338427		
	0	344931	331757	100
	5	276643		
	5	280694		
	5	285467	280935	84,7
	10	254561		
	10	249312		
	10	261894	255256	76,9
	15	211630		
	15	192511		
	15	197706	200616	60,5
	20	167032		
	20	172862		
	20	174684	171526	51,7
	25	151200		
	25	161337		
	25	150169	154235	46,5

Tabla 11. Valores promedios de áreas y porcentajes de consumo para los distintos tiempos de exposición de morina a una misma concentración en agua Milli Q

El porcentaje de morina en tampón pH 7,4 obtiene un valor mayor en comparación al medio de agua Milli Q en los mismos tiempos de exposición. A los 25 minutos se obtiene un porcentaje promedio de 61% en tampón pH 7,4, en comparación a los 46,5% obtenidos en agua Milli Q.

Los resultados obtenidos en tampón pH 7.4 se muestran en la siguiente tabla y gráfico.

Concentración morina (M)	Tiempo exposición (min)	Área (UA)	Promedio (UA)	Porcentaje promedio (%)
4,46x10 ⁻⁵	0	517772		
	0	541553		
	0	534016	534016	99,5
	5	484547		
	5	481297		
	5	477958	481267	90,1
	10	434689		
	10	452260		
	10	442299	443083	83,0
	15	384493		
	15	390057		
	15	398276	390942	73,2
	20	352494		
	20	362870		
	20	354362	356575	66,8
	25	327319		
	25	328019		
	25	320456	325265	60,9

Tabla 12. Valores promedios de áreas y porcentajes de consumo para los distintos tiempos de exposición de morina a una misma concentración en tampón pH 7,4

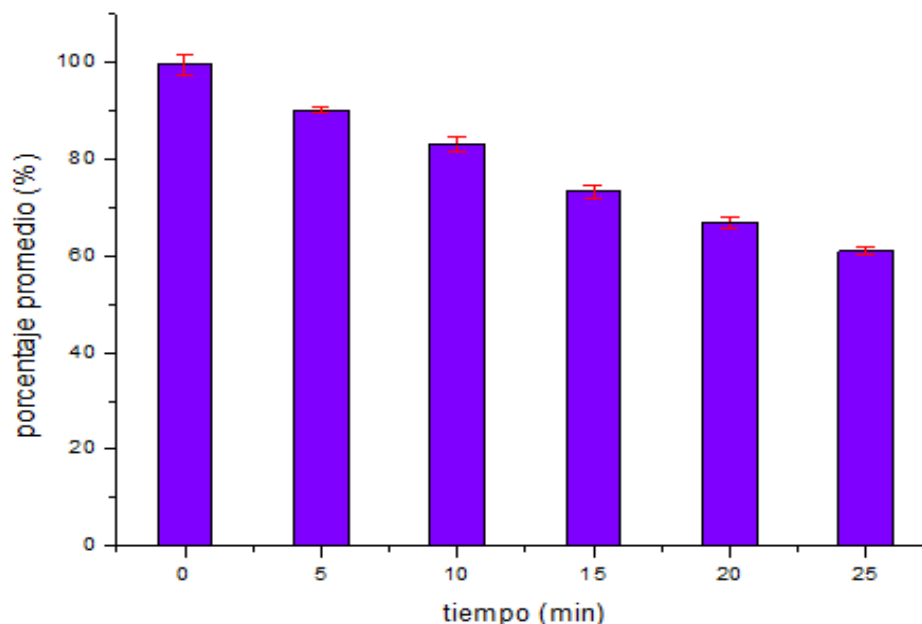


Figura 37. Variaciones en porcentajes de consumo de morina en tampón pH 7,4 a los respectivos tiempos de fotodegradación.

Se evalúa cómo influye la interacción de morina con proteína BSA en el valor del porcentaje de consumo. La interacción se lleva a cabo en tampón pH 7,4

El porcentaje de consumo de morina en interacción con BSA en tampón pH 7,4 mostró un valor menor a los dos valores vistos anteriormente, obteniendo un resultado del 33,2% de morina remanente. Cabe destacar que la concentración fija de polifenol es tres veces menor que la concentración correspondiente a los análisis anteriores debido a los factores de dilución implicados en el tratamiento de desproteinización.

concentración stock morina (M)	factor dilución aplicado	concentración en vial de medición
$3,93 \times 10^{-5}$	3	$1,31 \times 10^{-5}$

Los resultados se muestran en la siguiente tabla y gráfico.

concentración (M)	Tiempo exposición (min)	Área (UA)	Promedio (UA)	Porcentaje promedio (%)
1,31x10 ⁻⁵	0	153158		
	0	153484		
	0	156964	154535	100
	5	132894		
	5	131200		
	5	135079	133058	86,1
	10	117704		
	10	117899		
	10	116789	117464	76
	15	99503		
	15	94757		
	15	98338	97533	63,1
	20	76027		
	20	72335		
	20	79647	76003	49,2
	25	53500		
	25	47608		
	25	52812	51307	33,2

Tabla 13. Valores promedios de áreas y porcentajes de consumo para los distintos tiempos de exposición de morina interactuando con BSA a una misma concentración en tampón pH 7,4

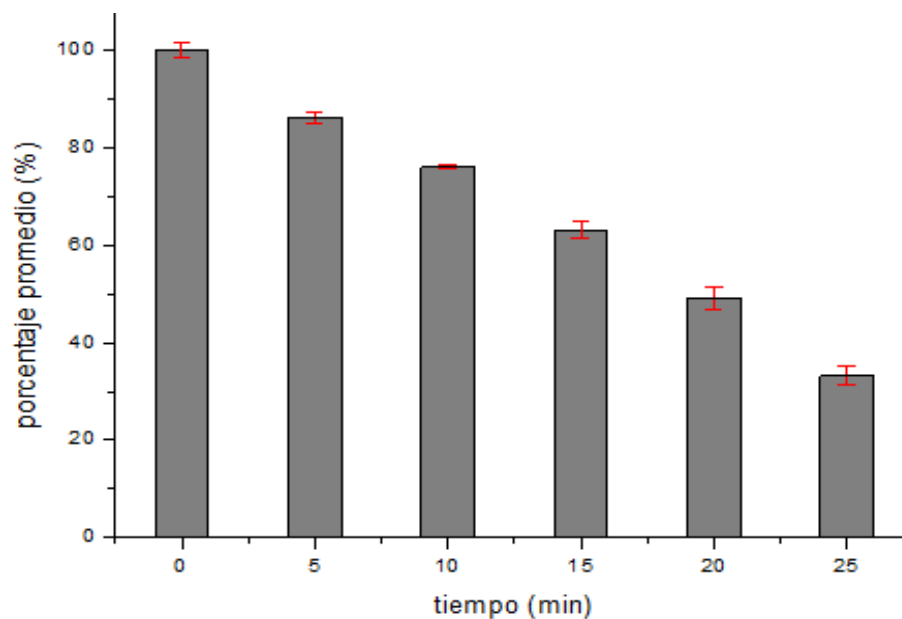


Figura 38. Variaciones en porcentajes de consumo de morina interactuando con BSA en tampón pH 7,4 a los respectivos tiempos de fotodegradación

En la siguiente figura se observa la comparación entre la fotólisis para los tres estudios mostrados anteriormente, dando cuenta que en tampón pH 7,4 la morina obtiene el menor fotoconsumo para todos los tiempos empleados. También se puede observar el marcado consumo que obtiene morina cuando está en este mismo medio interactuando con BSA a los 25 minutos de exposición, dando el valor más bajo de porcentaje de compuesto.

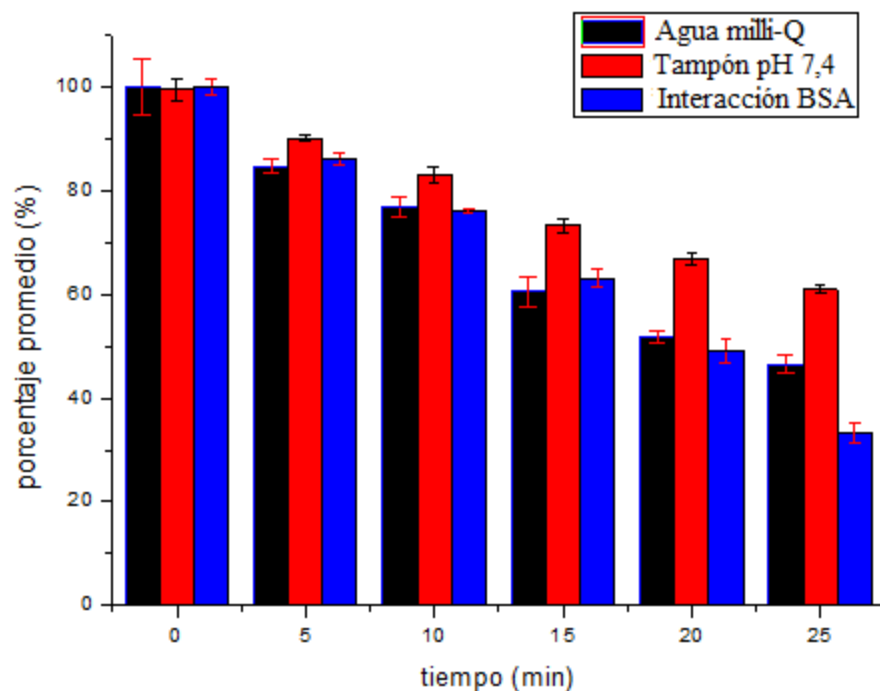


Figura 39. Comparaciones en los porcentajes de fotoconsumo de morina en los tres medios estudiados

El marcado consumo que presenta morina a los 25 minutos de exposición cuando está interactuando con albúmina refleja la intensa degradación que sufre al estar reaccionando con el radical hidroxilo generado. De esta manera el compuesto estaría protegiendo la oxidación de la proteína en el medio homogéneo empleado.

9. CONCLUSIONES

Se implementó eficientemente un sistema HPLC recientemente adquirido con el cual se pudo desarrollar las metodologías analíticas propuestas en este trabajo.

Se desarrollaron dos metodologías analíticas por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). Una fue desarrollada con la finalidad de lograr una óptima separación del flavonoide y sus respectivos productos de oxidación. Para esta metodología se utilizó una columna de fase reversa C8 y una gradiente de elución isocrática. Por otra parte, el seguimiento del consumo de cada flavonoide en función del tiempo se realizó en una columna C18, donde estos compuestos eluyen a tiempos menores en comparación con la metodología utilizada para la separación de los posibles productos de oxidación. Ambas metodologías fueron validadas en forma preliminar utilizando concentraciones del rango micromolar, presentando una adecuada relación lineal entre la señal cromatográfica y la concentración.

Las metodologías desarrolladas se utilizaron para el estudio de los flavonoides quercetina y morina. Los efectos antioxidantes de ambos compuestos fueron estudiados en metanol, soluciones tampón pH 7,4 de distinta composición (Tris, PBS y solución de fosfatos) y dispersión de albúmina de bovino. Sin embargo, dadas las dificultades en la determinación de quercetina en las soluciones tampones pH 7,4 debido a problemas de solubilidad, el estudio se enfocó fundamentalmente en morina.

La metodología se aplicó eficientemente para la determinación del efecto antioxidante de morina cuando está interactuando con albúmina en medio acuoso tampón pH 7,4 y se comparó con el medio homogéneo. Los resultados muestran que morina presenta una mayor reactividad con el radical hidroxilo cuando está interactuando con la proteína, lo que indica que aumenta su eficiencia antioxidante.

10. BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Scalbert, G. Williamson, Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *The Journal of nutrition*, 130 (2000) 2073S-2085S.
- [2] S. Martínez-Flórez, J. González-Gallego, J.M. Culebras, Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes, *Nutrición Hospitalaria*, 17 (2002).
- [3] W. Vermeris, R. Nicholson, *Phenolic compound Biochemistry Book*, DO Box, 17 (2006).
- [4] K. Gould, C. Lister, Ø. Andersen, K.R. Markham, *Flavonoid functions in plants, Flavonoids: Chemistry, biochemistry and*
- [5] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free radical biology and medicine*, 20 (1996) 933-956.
- [6] J.K. Seydel, M. Wiese, *Drug-membrane interactions: analysis, drug distribution, modeling*, John Wiley & Sons, 2009.
- [7] N. Cook, S. Samman, Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *The Journal of nutritional biochemistry*, 7 (1996) 66-76.
- [8] Y. Wang, X. Wang, Binding, stability, and antioxidant activity of quercetin with soy protein isolate particles, *Food chemistry*, 188 (2015) 24-29.
- [9] H. Cao, D. Wu, H. Wang, M. Xu, Effect of the glycosylation of flavonoids on interaction with protein, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73 (2009) 972-975.
- [10] W.M. Loke, J.M. Proudfoot, A.J. Mckinley, P.W. Needs, P.A. Kroon, J.M. Hodgson, K.D. Croft, Quercetin and its in vivo metabolites inhibit neutrophil-mediated low-density lipoprotein oxidation, *Journal of agricultural and food chemistry*, 56 (2008) 3609-3615.
- [11] J. Morales, G. Günther, A.L. Zanocco, E. Lemp, Singlet oxygen reactions with flavonoids. A theoretical–experimental study, *PloS one*, 7 (2012) e40548.
- [12] G. Günther, E. Berríos, N. Pizarro, K. Valdés, G. Montero, F. Arriagada, J. Morales, Flavonoids in Microheterogeneous Media, Relationship between Their Relative Location and Their Reactivity towards Singlet Oxygen, *PloS one*, 10 (2015) e0129749.

- [13] M.P. Montaña, W.A. Massad, S. Criado, A. Biasutti, N.A. García, Stability of Flavonoids in the Presence of Riboflavin-photogenerated Reactive Oxygen Species: A Kinetic and Mechanistic Study on Quercetin, Morin and Rutin, *Photochemistry and photobiology*, 86 (2010) 827-834.
- [14] C. Tournaire, S. Croux, M.-T. Maurette, I. Beck, M. Hocquaux, A.M. Braun, E. Oliveros, Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 19 (1993) 205-215.
- [15] S. Nagai, K. Ohara, K. Mukai, Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by flavonoids in ethanol solution, *The Journal of Physical Chemistry B*, 109 (2005) 4234-4240.
- [16] N.P. Ulrih, A. Ota, M. Šentjurc, S. Kure, V. Abram, Flavonoids and cell membrane fluidity, *Food Chemistry*, 121 (2010) 78-84.
- [17] D. Barreca, G. Laganà, E. Tellone, S. Ficarra, U. Leuzzi, A. Galtieri, E. Bellocco, Influences of flavonoids on erythrocyte membrane and metabolic implication through anionic exchange modulation, *Journal of Membrane Biology*, 230 (2009) 163-171.
- [18] S. Chaudhuri, A. Banerjee, K. Basu, B. Sengupta, P.K. Sengupta, Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects, *International Journal of Biological Macromolecules*, 41 (2007) 42-48.
- [19] A. Saija, M. Scalese, M. Lanza, D. Marzullo, F. Bonina, F. Castelli, Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes, *Free Radical Biology and Medicine*, 19 (1995) 481-486.
- [20] J. Londoño-Londoño, V.R. De Lima, C. Jaramillo, T. Creczynski-pasa, Hesperidin and hesperetin membrane interaction: understanding the role of 7-O-glycoside moiety in flavonoids, *Archives of biochemistry and biophysics*, 499 (2010) 6-16.
- [21] S.V. Verstraeten, C.L. Keen, H.H. Schmitz, C.G. Fraga, P.I. Oteiza, Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure, *Free Radical Biology and Medicine*, 34 (2003) 84-92. 15
- [22] M. Furusawa, H. Tsuchiya, M. Nagayama, T. Tanaka, K.-i. Nakaya, M. Iinuma, Anti-platelet and membrane-rigidifying flavonoids in brownish scale of onion, *Journal of Health Science*, 49 (2003) 475-480.
- [23] J.K. Seydel, M. Wiese, *Drug-membrane interactions: analysis, drug distribution, modeling*, John Wiley & Sons, 2009.
- [24] N.P. Ulrih, A. Ota, M. Šentjurc, S. Kure, V. Abram, Flavonoids and cell membrane fluidity, *Food Chemistry*, 121 (2010) 78-84.

- [25] A. Erlejman, S. Verstraeten, C. Fraga, P. Oteiza, The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects, *Free radical research*, 38 (2004) 1311-1320.
- [26] A.B. Hendrich, Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds¹, *Acta Pharmacologica Sinica*, 27 (2006) 27-40.
- [27] A. Poła, K. Michalak, A. Burliga, N. Motohashi, M. Kawase, Determination of lipid bilayer/water partition coefficient of new phenothiazines using the second derivative of absorption spectra method, *European journal of pharmaceutical sciences*, 21 (2004) 421-427.
- [28] R.P. Mason, D.G. Rhodes, L.G. Herbette, Reevaluating equilibrium and kinetic binding parameters for lipophilic drugs based on a structural model for drug interactions with biological membranes, *Journal of medicinal chemistry*, 34 (1991) 869-877.
- [29] A. Arora, T.M. Byrem, M.G. Nair, G.M. Strasburg, Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373 (2000) 102-109.
- [30] S. Curry, Lessons from the crystallographic analysis of small molecule binding to human serum albumin, *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 24 (2009) 342-357.
- [31] D. Barreca, G. Laganà, S. Ficarra, E. Tellone, U. Leuzzi, S. Magazù, A. Galtieri, E. Bellocco, Anti-aggregation properties of trehalose on heat-induced secondary structure and conformation changes of bovine serum albumin, *Biophysical chemistry*, 147 (2010) 146-152.
- [32] C. Di Salvo, D. Barreca, G. Laganà, M. Di Bella, E. Tellone, S. Ficarra, E. Bellocco, Myelin basic protein: Structural characterization of spherulites formation and preventive action of trehalose, *International journal of biological macromolecules*, 57 (2013) 63-68.
- [33] J. Mandeville, H. Tajmir-Riahi, Complexes of dendrimers with bovine serum albumin, *Biomacromolecules*, 11 (2010) 465-472.
- [34] A. Papadopoulou, R.J. Green, R.A. Frazier, Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 158-163.

- [35] R.G. Machicote, M.E. Pacheco, L. Bruzzone, Binding of several benzodiazepines to bovine serum albumin: Fluorescence study, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 77 (2010) 466-472.
- [36] T.S. Singh, S. Mitra, Interaction of cinnamic acid derivatives with serum albumins: a fluorescence spectroscopic study, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78 (2011) 942-948.
- [37] A. Bolli, M. Marino, G. Rimbach, G. Fanali, M. Fasano, P. Ascenzi, Flavonoid binding to human serum albumin, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398 (2010) 444-449.
- [38] P. Ascenzi, M. Fasano, Allostery in a monomeric protein: the case of human serum albumin, *Biophysical chemistry*, 148 (2010) 16-22.
- [39] T. Peters Jr, *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications*, Academic press, 1995.
- [40] M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari, P. Ascenzi, The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin, *IUBMB life*, 57 (2005) 787-796.
- [41] D. Barreca, G. Laganà, G. Toscano, P. Calandra, M.A. Kiselev, D. Lombardo, E. Bellocco, The interaction and binding of flavonoids to human serum albumin modify its conformation, stability and resistance against aggregation and oxidative injuries, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, (2016).
- [42] S. Curry, Lessons from the crystallographic analysis of small molecule binding to human serum albumin, *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 24 (2009) 342-357.
- [43] D. Barreca, G. Laganà, S. Ficarra, E. Tellone, U. Leuzzi, S. Magazù, A. Galtieri, E. Bellocco, Anti-aggregation properties of trehalose on heat-induced secondary structure and conformation changes of bovine serum albumin, *Biophysical chemistry*, 147 (2010) 146-152.
- [44] C. Di Salvo, D. Barreca, G. Laganà, M. Di Bella, E. Tellone, S. Ficarra, E. Bellocco, Myelin basic protein: Structural characterization of spherulites formation and preventive action of trehalose, *International journal of biological macromolecules*, 57 (2013) 63-68.
- [45] J. Mandeville, H. Tajmir-Riahi, Complexes of dendrimers with bovine serum albumin, *Biomacromolecules*, 11 (2010) 465-472.

- [46] J. Fickel, C. Pitra, B. Joest, R. Hofmann, A novel method to evaluate the relative tannin-binding capacities of salivary proteins, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 122 (1999) 225-229.
- [47] T. Hofmann, A. Glabasnia, B. Schwarz, K.N. Wisman, K.A. Gangwer, A.E. Hagerman, Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose, castalagin, and grandinin, *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (2006) 9503-9509.
- [48] R. Ferrer-Gallego, R. Gonçalves, J.C. Rivas-Gonzalo, M.T. Escribano-Bailón, V. de Freitas, Interaction of phenolic compounds with bovine serum albumin (BSA) and α -amylase and their relationship to astringency perception, *Food chemistry*, 135 (2012) 651-658.
- [49] X. Li, S. Wang, Study on the interaction of (+)-catechin with human serum albumin using isothermal titration calorimetry and spectroscopic techniques, *New Journal of Chemistry*, 39 (2015) 386-395.
- [50] C. Dufour, M. Loonis, Flavonoids and their oxidation products protect efficiently albumin-bound linoleic acid in a model of plasma oxidation, *Biochimica et Biophysica Acta* 1770 (2007) 958–965
- [51] T. Julianto, K. Hay Yuen, A. Mohammad Noor, Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of α -tocopherol in human plasma, *Journal of Chromatography B*, 732 (1999) 227–231
- [52] O. Quattrocchi , S. Abelaira de Andrizzi , R. Laba , 1992, introducción a la HPLC, aplicación y práctica, capítulo 10, Buenos aires, Argentina. 407 pág.
- [53] M. Musialik , R. Kuzmich , T. Pawłowski , G. Litwinienko (2009) Acidity of Hydroxyl Groups: An Overlooked Influence on Antiradical Properties of Flavonoids. *J. Org. Chem.* 74: 2699–2709. pmid:19275193

11. ANEXO

Procedimiento operativo estándar equipo HPLC marca
SHIMADZU®



Universidad de Chile
Facultad de ciencias químicas y
farmacéuticas
Departamento de ciencias y tecnología
farmacéutica

Funcionamiento equipo HPLC marca “SHIMADZU”

N°PO 01/Version: 01

Total página: 9

Fecha: 08/06/2017

Objetivos: describir el funcionamiento básico del equipo de análisis HPLC marca SHIMADZU de manera sistemática, estandarizada y concisa, para todo tipo de procedimiento que requiera ser detallado.

Alcance: el instructivo aplica a todo el personal (estudiantes, investigadores y/o profesores) que tengan como objetivo realizar análisis en el equipo detallado.

Definiciones:

- **DGU-20ASR:** unidad desgasificadora
- **Pump LC-20ATX2units (bomba):** sistema de bombeo de solvente
- **Autosampler SIL-20A:** sistema de inyección automático de muestra
- **Column oven CTO-20A:** columna de separación
- **Detector SPD-M20A:** detector de señal.
- **Labsolutions:** es el software controlador del equipo, el cual incorpora funciones de alto grado. En él se pueden realizar funciones específicas como por ejemplo; control de datos instrumentales y analíticos, análisis y revisión de datos, creación de métodos y ajustes.

Desarrollo:

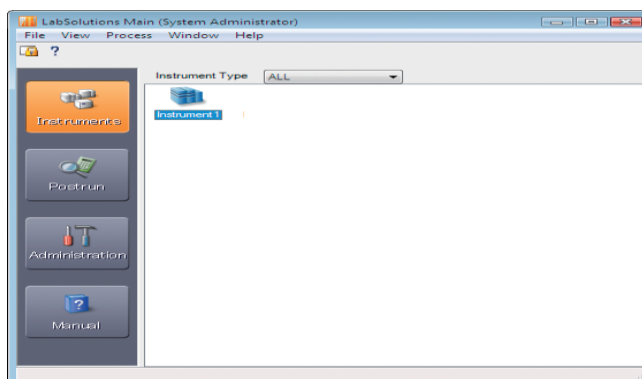
Se enciende cada módulo del equipo de manera sincronizada, procurando encender primero la bomba, luego el autosampler, después la columna y por último el detector.

Se enciende el computador y se verifica que el icono del servicio del software “labsolutions” se encuentre de color verde. En caso de estar amarillo significa que el controlador está en proceso de iniciarse, y en caso de estar rojo, significa que ha ocurrido un error y por lo tanto se debe reiniciar.

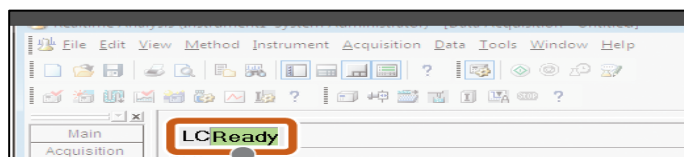


Se procede a iniciar el software labsolutions con un doble “click” y se ingresa el perfil deseado con la contraseña correspondiente. En caso de no poseer perfil, se entra en modo administrador sin colocar contraseña.

Aparecen 4 ventanas principales al lado izquierdo con los siguientes nombres: instruments, postrun, administration y manual. Se ingresa a la ventana “instruments” y se selecciona el equipo (farmacocinética). El software comienza a reconocer el equipo mediante un sonido (“beep”).



Una vez reconocido el equipo, automáticamente se carga la ventana “data acquisition”, la cual mostrara el estado de la columna (LC) y del detector (PDA). Si el estado se encuentra de color verde (READY) indica que la columna y el detector estarán listos para utilizarse.



A continuación se procede a realizar la purga manual para cada canal del equipo (canal A, B, C y D).

Procedimiento para purga manual

- Se abre la válvula manual de drenaje que se encuentra en la bomba
- En la ventana de la derecha del monitor se presenta una tabla con las siguientes columnas: ítem, value, setting y units. En el parámetro setting se modifica el valor “total flow” a 1
- ml/min, se presiona “enter” y se espera a que el valor se cargue en la columna “value”.

Item	Val	Set	Uni
Wave	254	254	nm
Wave			nm
Mode	Iso	Iso	
Total	0.0	0.0	mL/
B Con	0.0	0.0	%
Pump	0.0	0.0	mL/
Pump	0.0	0.0	mL/
Pump	0.0		MP
Pump	0.0		MP
Pump	0		kPa
Pump	0		kPa
Oven	0.0	40	C
Temp	90	90	C
Vial N			
Injecti			uL

- A continuación se modifican los valores de % para cada canal, colocando a todos el valor cero 0 y presionando “enter” esperando a que se carguen los valores modificados en la

columna “value”. Al colocar 0% en los canales mostrados, automáticamente se reconocerá por defecto como 100% para el canal A.

- Se procede a presionar el botón “purge” que se encuentra en el módulo **Pump LC-20AT** del equipo para iniciar la purga del canal A. una vez presionado aparecerá un mensaje de advertencia para abrir bien la llave de purga. En la pantalla de la bomba aparecerá el mensaje “purging line” el cual durara un periodo de 5 min. Terminado ese tiempo la pantalla de la bomba vuelve a la normalidad.
- Terminada la purga del canal A, se modifica en la columna “setting” el valor del canal B a 100%. De la misma manera se presiona “enter” y se espera a que cargue el valor en la columna “value”. Una vez cargado se presiona “purge” en la bomba para proceder a la purga del canal B.
- Terminado el proceso para B, se modifica el porcentaje de B a 0% presionando “enter” y esperando a que se cargue en “value”. De la misma manera se coloca 100% para el canal C. una vez cargado el valor se procede a la purga del canal C.
- Para purgar el canal D se realizan las mismas modificaciones del paso anterior.
- Terminado el proceso de purga en canal D, se cierra la válvula de drenaje de la bomba y el proceso ha finalizado.

Nota: cuando se cambia la fase móvil para implementar un nuevo método, es necesario efectuar la purga del canal que se cambia en duplicado.

Acondicionamiento de la columna con la metodología creada (de manera manual)

En la barra menú (parte superior), seleccionar “file”, luego en “select project folder” y seleccionar carpeta donde se encuentra el método a trabajar, colocar “close” para cerrar.

En la misma barra de menú “file”, se selecciona “open method file” y se busca en la carpeta la metodología para acondicionar la columna. Se selecciona y se da click en abrir. El software comienza a cargar la metodología.

Una vez cargada la metodología, se da click en “download” (ventana inferior del monitor) para que los datos se carguen en el equipo.

Estabilización del sistema

- En la ventana de monitoreo del sistema, en columna “setting” se parte de un flujo bajo de 0,2 ml/min apretando “enter”. Se modifican los valores de % correspondientes a los canales dependiendo de los valores colocados en la metodología. Para modificar estos valores de % se realiza de la misma manera que en la purga. Se presiona botón “pump” del módulo LC-20AC (se enciende la bomba) y se presiona botón “oven” del módulo CTO-20A (se enciende el horno de la columna). se espera hasta que la presión se estabilice en +/- 1 Barr (se indica en módulo LC-20AC).
- Una vez estabilizada la presión, se modifica el flujo en la columna “setting” a 0,4 ml/min esperando a que la presión se estabilice a +/- 1 barr.
- Una vez estabilizada la presión, se modifica el flujo en la columna “setting” a 0,6 ml/min, esperando a que la presión se estabilice a +/- 1 barr.

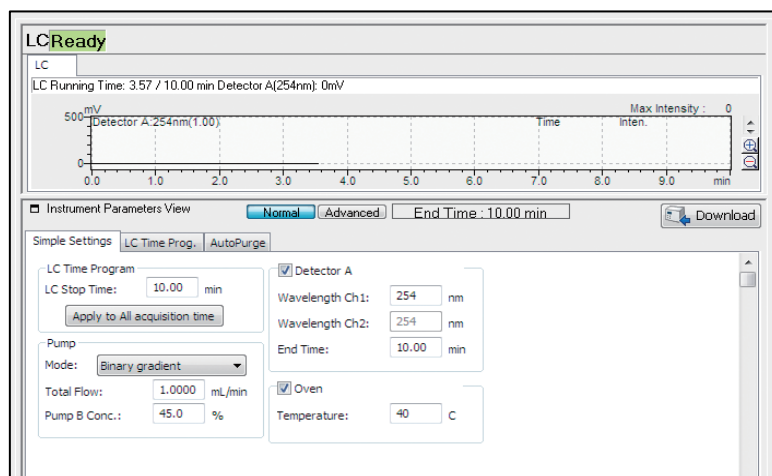
- Una vez estabilizada la presión, se modifica el flujo en la columna “setting” a 0,8 ml/min, esperando a que la presión se estabilice a +/- 1 barr.

De esta manera se va aumentando el flujo en 0,2 unidades hasta llegar al flujo objetivo del método. Es importante tener en cuenta que estos cambios en forma gradual generan cambios graduales en la presión y se debe procurar que la presión siempre se estabilice en +/- 1 unidad de barr para realizar el siguiente cambio.

También es importante destacar que una vez que se alcance la temperatura objetivo del método, se debe apagar el horno de la columna presionando nuevamente “oven” en el módulo CTO-20A. si no se apaga el horno, la temperatura de la columna seguirá aumentando y el estado de LC en la ventana “data acquisition” dirá “oven wait” marcado con color amarillo.

Creación de metodología

En la ventana de monitoreo del instrumento “instrument parameters view” se selecciona la versión “advanced” (al lado de la versión “normal”).



- Seleccionar subventana “**data acquisition**”. En LC time program se introduce el tiempo total de duración del análisis que se quiere estimar para la metodología. Una vez definido, apretar “apply to all acquisition time”.
- Seleccionar subventana “**pump**” y colocar el modo de la metodología: flujo Isocratico o bajo gradiente de presión. Se introduce el flujo de la metodología, y en el caso de elegir el modo bajo gradiente de presión se colocan los % correspondientes a cada canal. En pressure limits (pump A) se establecen los valores mínimos y máximos de presión. Se recomienda colocar una P límite de 300 bar, para que no se produzca el mensaje de alerta cuando se cambia el flujo.
- Seleccionar subventana “**LC time prog.**” En columna “time” se especifican los tiempos de acción, en columna “module” se especifican los módulos del equipo que funcionaran durante el tiempo establecido anteriormente. En la columna “Command” se establecen los


comandos específicos para cada módulo seleccionado, y en la columna “value” se colocan los valores de funcionamiento para cada comando.

- Seleccionar subventana “**PDA**”. En “lamp” se selecciona el tipo de lámpara a usar (off, D2, W, D2&W). En “Wavelength” se selecciona el rango de longitud de onda que abarcara el método. Siempre se debe establecer como parámetro mínimo 200 nm.

- Seleccionar subventana “**column oven**”. En “oven temperature” se selecciona la temperatura de funcionamiento en la cual va a estar la columna y el rango máximo de temperatura.

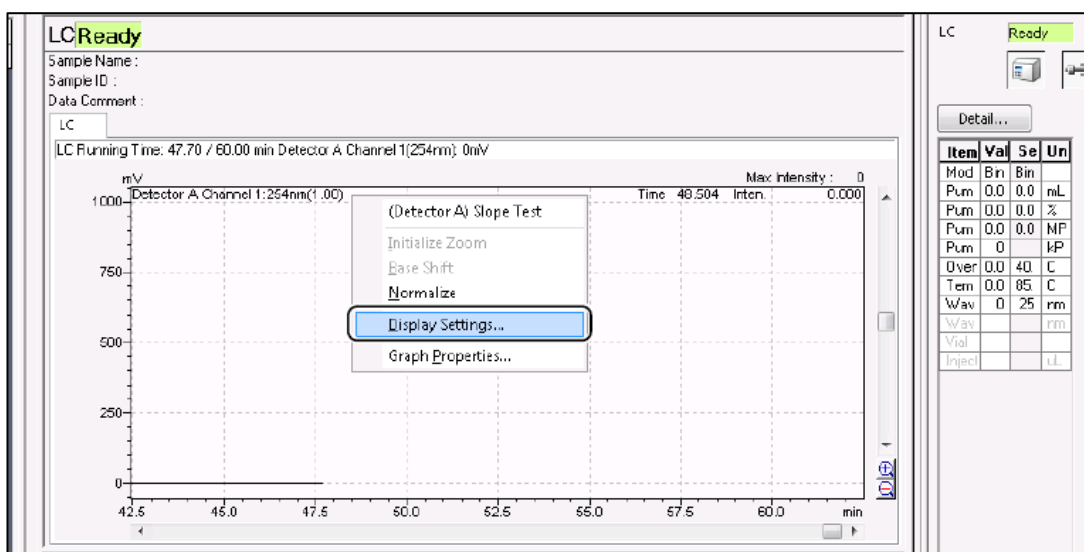
- En la ventana “**autosampler**”, se marca el cuadro que dice autosampler, y se establece el tiempo para realizar la purga del autosampler (por defecto está asignado 25 min, pero se puede modificar). Se puede modificar el modo de lavado del autosampler marcando las opciones que se presentan en “rinse mode”, por ejemplo en “before and after aspiration” se selecciona el tiempo “rinse Dip time” que es el tiempo de inmersión en el cual se realiza el lavado.

- En la ventana “**autopurge**” se puede diseñar una metodología para que se realicen funciones de purga y acondicionamiento antes de que se cargue el método creado.
 - ✓ Purga automática de bomba: se van modificando los tiempos y el orden de purga de cada canal (por defecto está asignado 5 min para cada canal, pero estos valores se pueden modificar)
 - ✓ Marcar cuadro “autosampler”: acá se puede establecer el tiempo que durara la purga del autosampler inmediatamente después de terminada la purga de los canales de la bomba. La purga del autosampler y el lavado se realiza con solución 50/50 de MeOH/H₂O sometidos en el quinto canal.
 - ✓ marcar la opción int.conc-replacement: para que al finalizar la autopurga del autosampler se inicie el acondicionamiento de la columna con las concentraciones iniciales de la metodología, de esta manera se establece un tiempo de acondicionamiento.
 - ✓ La opción “warm Up” es para realizar un acondicionamiento de la columna con el solvente a utilizar en la metodología una vez terminada la purga del autosampler. Este acondicionamiento se debe realizar a un flujo bajo (por ejemplo a 0,2 ml/min) y se debe especificar el tiempo. Este acondicionamiento dura hasta que la columna alcance su temperatura establecida.
 - ✓ Se marca el cuadro que dice “activar sistema después de la autopurga” para que la columna quede ambientada con el solvente a utilizar.

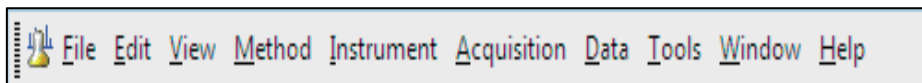
Obs: una vez que se prende el equipo, este se cargara con el método que se utilizó el día anterior, por lo tanto para iniciar la autopurga se presiona el botón  que se encuentra en la barra de menú

superior. Al iniciar la autopurga, **no es necesario abrir la llave manual** para purgar la bomba ya que este procedimiento se realiza de manera automática. La autopurga se realizara en el siguiente orden:

- ✓ purga de bomba (canal A, B, C y D)
 - ✓ purga de autosampler y lavado
 - ✓ “warm Up” de la columna a flujo bajo (0,2 ml/min) con las proporciones (%) de los solventes a utilizar
- Para establecer una longitud de onda característica dentro del rango establecido anteriormente, se da clic derecho a la ventana del cromatograma y se dirige a la opción “display setting”.

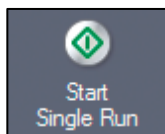


- Se selecciona la subventana **PDA** y se establece el rango de longitud de onda establecido (200nm el mínimo hasta el valor máximo) y se establecen las longitudes de ondas específicas para iniciar el análisis. se selecciona las longitudes en la tabla y se modifica el valor. Una vez introducidos los valores, se presiona “aply to data processing parameters” para que los cromatogramas generados se realicen a esas longitudes de ondas especificadas. Luego se presiona botón “aplicar”, seguido de “aceptar”.
- Se procede a guardar el método creado en la barra superior de menú, seleccionando “file” y luego “save method file”.



Inyección de muestra

En el panel principal de la izquierda se presiona la opción “start single run” (icono de color verde).




Una vez presionado aparecerá la ventana de adquisición de información. En esta ventana se colocan los siguientes datos.

- Simple name: nombre de la muestra a analizar
- Simple ID: se puede colocar la fecha de análisis en forma de número, por ejemplo 18052017 para 18 de mayo del 2017.
- En “create into” se selecciona la carpeta de destino donde se guardara el resultado de la muestra analizada. El formato de archivo en el cual se guarda es .lcd.
- En la región llamada “sampler”, se modifica el número de vial de inyección (vial#) donde se localizara la muestra y el volumen de inyección a tomar por el autosampler.
- Una vez modificado los parámetros se presiona OK y empezará a correr la muestra.

En caso de que la temperatura de la columna establecida aún no se alcanza, se encenderá el horno de la columna (botón “oven” encendido) y el equipo esperara a que se alcance la temperatura (wait oven) para seguir con el proceso de inyección. Una vez alcanzada la temperatura, se presiona el botón “oven” en el equipo para apagar el horno y seguir con el proceso de inyección.


Shutdown (apagado del equipo)

- Para apagar el equipo, se debe crear una metodología de lavado y apagado de columna. Para esto se procede a crear la metodología como se explico anteriormente.
- Una vez creada y guardada, se presiona el botón  en la barra superior y se selecciona la ubicación del método guardado.
- En “cool down time”: se selecciona el tiempo necesario para que el método actue y se enfrie la columna.
- Al seleccionar “degassing unit”, se realiza una desgasificación de la bomba al mismo tiempo que la metodología se estara efectuando.
- Una vez terminado el proceso (100%), cada modulo quedara en modo de suspensión (luz naranja) y se procede a cerrar el programa “labsolutions”.
- Cuando se cierra el programa, sonara un sonido (“BEEP”) que indicara la seguridad de apagar los modulos del equipo.
- Para apagar los módulos se procede a la siguiente secuencia: primero se apaga la bomba, luego el autosampler, luego la columna y por último el detector.
- Una vez apagado el equipo, se procede a apagar el computador.

Análisis de Postrun

El programa Postrun analiza los datos adquiridos para detectar los peak de los cromatogramas y realizar cálculos cuantitativos sobre estos peak.

Para entrar a este programa se acude a la barra asistente “realtime batch” (lado izquierdo) y se da

click al icono “Data analysis” 

Una vez que se cargue la ventana “postrun”, aparecerán las subventanas correspondientes a los datos de la muestra analizada (folder, contour view, chromatogram view, spectrum view, results view y method view)

En la ventana “folder” se procede a seleccionar la carpeta donde se encuentra el archivo de los resultados guardados del análisis.


Una vez buscado el archivo, se selecciona y se mueve hasta soltarlo en la ventana “chromatogram view”. Cuando se suelta, se cargaran todos los datos en las ventanas correspondientes.

Para ampliar una subventana específica se procede a dar click al último icono superior izquierdo (icono de ventana) en la subventana que se quiera ampliar. Para volver a reducirla, se vuelve a dar click al mismo icono.

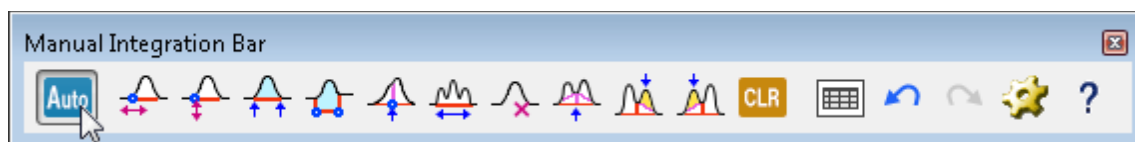
Para modificar datos y que estos queden guardados, se selecciona el modo “edit” que se encuentra en el lado superior izquierdo de la subventana “method view”. Cuando se selecciona el modo “view” es para observar los nuevos cambios que se modificaron anteriormente en el modo “edit”.


Integrar señales


Una vez cargados los datos que se quieran analizar, se amplía la ventana “chromatogram view” la cual mostrara el espectro de la muestra analizada.

Se procede a seleccionar la sub barra de integración manual la cual se encuentra en la barra superior de menú. 

Una vez seleccionada, aparecerán las distintas funciones que se pueden realizar para integrar.



Se presiona el botón “reject peak”  para eliminar peak de integración. Una vez seleccionado, se van marcando los peak que se desean eliminar en el cromatograma.

Cuando se terminan de eliminar los peak, se desmarcan el botón anterior y ahora se presiona el botón “insert peak” . Una vez presionado, se selecciona el punto de origen del peak que deseo integrar, y sin soltar el mouse se dirige hacia el final del peak.

De esta manera se indica el valor de la nueva área (arriba del peak) y su respectivo tiempo de retención.

Para ver los valores tabulados, basta con volver a presionar el botón de ventana ampliada para reducirla y observar los valores en la subventana “results view”.