

Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas
Campus Guanajuato



Posgrado en Química

Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas
**“Desarrollo de procedimientos analíticos para la determinación de
compuestos de importancia nutracéutica”**

Presenta:

Q. Rodolfo Eduardo González López

Director:

Dra. Eunice Yáñez Barrientos

Codirector:

Dr. Kazimierz Wróbel.

Guanajuato, GTO.

2022

Miembros del jurado asignado para el examen recepcional que, para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas, presenta el Q. Rodolfo Eduardo González López, con el trabajo titulado:

“Desarrollo de procedimientos analíticos para la determinación de compuestos de importancia nutracéutica”

Dra. Katarzyna Wróbel
Presidente

Dr. Armando Gómez Ojeda
Secretario

M.C. Israel Enciso Donis
Vocal

Dr. Francisco Javier Acevedo Aguilar
Suplente

Índice.

Índice.....	4
Índice de Figuras.....	5
Índice de Tablas.....	6
Índice de Ilustraciones.....	7
Abreviaturas.....	8
Resumen.....	10
Capítulo 1.- INTRODUCCION.....	11
1.1 Foodomica.....	11
1.2 Nutracéuticos.....	12
1.2.1. Clasificaciones de los nutracéuticos.....	14
1.2.2. El impacto de la nutracéutica en el mundo actual.....	15
1.3. Trigonelina.....	16
1.3.1 Función fisiológica de TRG en plantas.....	17
1.3.2 Rutas de síntesis y biosíntesis de la TRG.....	18
1.3.3 Actividad farmacológica.....	20
1.3.4. Trigonelina como compuesto nutracéutico y su relevancia en organismos vivos.	22
1.4. Ácido Nicotínico y su relación con la trigonelina.....	23
2.1. Procedimientos de preparación de muestra para la extracción de trigonelina en diferentes matrices alimenticias.....	25
2.2. Técnicas analíticas empleadas para la determinación de Trigonelina.....	27
2.2.2. Técnica cromatográfica como medio de análisis.....	31
2.2.3. Cromatografía de pares iónicos.....	32
Capítulo 2.- OBJETIVOS.....	36
2.1. Objetivo general.....	36
Capítulo 3.- PARTE EXPERIMENTAL.....	37

Instrumentación Analítica, Reactivos y Softwares.....	37
3.1.1. Instrumentación Analítica.....	37
3.1.2. Reactivos y Disolventes.....	37
3.1.3. Software.....	38
3.1.4. Estándares.....	38
3.1.5. Muestras.....	38
Capítulo 4- Resultados y Discusión.....	40
4.1. Selección y preparación de fase móvil para la determinación de trigonelina y ácido nicotínico.....	40
4.2 Calibración.....	46
4.3. Selección de estándar interno.....	51
4.4. Preparación de muestras.....	54
4.4.1. Evaluación del medio de extracción.....	57
4.4.2 Evaluación de Temperatura.....	59
4.4.3. Evaluación de Cartucho de extracción en fase sólida (SPE).....	60
4.5. Análisis de muestras reales.....	64
4.5.1. Muestras de Alfalfa.....	64
4.5.2. Muestras de café.....	67
Capítulo 5- Conclusiones.....	70
Bibliografía.....	73

Índice de Figuras

Figura 1: Estructura química de la Trigonelina.....	17
Figura 2: Estructura química de la Betaína.....	18
Figura 3: Estructura química de la cotinina.....	20
Figura 4: Estructura molecular gliburida.....	21
Figura 5. Rutas de degradación térmica de la trigonelina a N-metilpiridinio y Ácido Nicotínico ^{25,55}	
Figura 6. Estructura Química Ácido Nicotínico.....	24
Figura 7. Estructura química de NFPA.....	31
Figura 8. Diagrama de interacción del compuesto de formación de pares iónicos. En la figura se muestra como es el aumento en el tiempo de retención debido a la interacción ion-ion que tiene el analito cargado con el reactivo de pares iónicos, disminuyendo su	

polaridad por lo tanto le permite interactuar más con las paredes de la columna aumentando su tiempo de retención.	33
Figura 9. Espectros de absorción adquiridos para cada condición de pH. (A) Buffer Ácido Fórmico/ Amoniaco-Trigonelina, (B) Buffer Ácido Acético/Amoniaco-Trigonelina, (C) Buffer Acido Fórmico/Amoniaco- Ácido Nicotínico, (D) Buffer Ácido Acético/Amoniaco-Ácido Nicotínico.	41
Figura 10. Tiempo de retención en función de concentración del formador de pares iónicos en mezcla de trigonelina y ácido nicotínico 10 mg/L.	43
Figura 11. Cromatograma correspondiente al mix de 5mg/L en una concentración de NFPA 10mM en la columna.	44
Figura 12. Radio de pureza para los picos cromatográficos correspondientes a la mezcla de estándares TRG y AN con 10mM de formador de pares iónicos. (A) Radio de Pureza para AN, (B) Espectros de absorción para los máximos del pico cromatográfico para AN, (C) Radio de Pureza para TRG, (D) Espectros de absorción para los máximos del pico cromatográfico para TRG.	45
Figura 13. Cromatogramas de soluciones de calibración de 0.5 a 50 mg L ⁻¹	46
Figura 14. Curvas de calibración de calibración de TRG y AN utilizando la altura de las señales cromatográficas, utilizando el Software ChemStation: A) Ácido nicotínico, B) Trigonelina.	47
Figura 15. Figura de estándares internos reportados y propuestos ^{41,44}	51
Figura 16. Compuestos alcalinos posibles estándares internos.	52
Figura 17. Espectro de absorción adquiridos de los compuestos A y C.	53
Figura 18. Cromatogramas sobrepuestos de las muestras extraídas con diferentes porcentajes de metanol.	57
Figura 19. Espectros obtenidos de diferentes puntos de las señales cromatográficas atribuidos a TRG y AN. A) H ₂ O, B) MeOH 5%, C) MeOH 10% y D) MeOH 15%.	58
Figura 20. Cromatogramas de muestra Café "La Finca" tratada con C-18 y HLB.	62
Figura 21. Espectros de absorción normalizados de Trigonelina y Ácido Nicotínico en los dos tratamientos C-18 y HLB. (A) Espectro normalizado pico de TRG tratamiento HLB, (B) Espectro normalizado pico de AN tratamiento C-18, (C) Espectro normalizado pico de TRG tratamiento C-18, (D) Espectro normalizado pico de AN tratamiento HLB.	63
Figura 22. Cromatogramas obtenidos del análisis de biomasa de alfalfa liofilizada. Cr (VI), Se (IV) y NaCl.	65

Índice de Tablas.

Tabla 1. Términos propuestos definiciones y criterios para su uso en referencia a compuestos derivados de plantas ¹	12
Tabla 2. Técnicas de Extracción para Trigonelina encontradas en la literatura.	26
Tabla 3: Principales técnicas analíticas utilizadas para la determinación de trigonelina en plantas.	28
Tabla 4. Estado del arte del uso de Formadores de Pares Iónicos (IPR).	34

Tabla 5. Condiciones de crecimiento para las plantas de Alfalfa y Trigo.	39
Tabla 6. Parámetros de Trabajo HPLC-DAD a cada concentración de NFPA.	42
Tabla 7. Concentraciones de formador de pares iónicos, así como cambio en tiempo de retención.	42
Tabla 8. Parámetros finales de Trabajo.	45
Tabla 9. Parámetros típicos evaluados para la determinación de TRG y AN mediante HPLC-DAD.	49
Tabla 10. Resultado de repetibilidad del tiempo de retención y del área y altura de las señales analíticas para 5 inyecciones de TRG y AN 5 mg L ⁻¹	50
Tabla 11. Compuestos de estándar interno con los máximos de absorbancia.	53
Tabla 12. Diseño de experimentos para muestras de café.	55
Tabla 13. Evaluación del contenido de TRG y AN en muestra de café a diferentes temperaturas.	59
Tabla 14. Usos de SPE reportados en la bibliografía para TRG y AN.	60
Tabla 15. Condiciones de exposición de las plántulas de alfalfa.	64
Tabla 16. Concentraciones de los analitos determinada en cada condición de crecimiento de estrés abiótico para las alfalfas en mg/g.	66
Tabla 17. Concentraciones de los analitos determinado en muestras de café.	67
Tabla 18. Porcentajes de Recobro para los germinados de alfalfas y muestra de café en la adición de estándar.	69

Índice de Ilustraciones.

Ilustración 1. Vía propuesta de síntesis de trigonelina (5) a partir de NaMN (nicotinato mononucleótido) (2). Los pasos (1) a (3) son respectivamente catalizados por la nucleotidasa NaMN, la nucleosidasa NaR y la trigonelina sintasa. Las enzimas alternativas, nicotinato fosforribosiltransferasa o NaMN glicohidrolasa (no se muestra la reacción), podría participar en el paso (1a), y el nucleósido fosforilasa en el paso (2a), aunque aquí no se obtuvo evidencia. También se muestra la síntesis de trigonelina (5) a través del ciclo del nucleótido de piridina ¹⁸ . NaAD = nucleótido de adenina de nicotinato; NAD = dinucleótido de nicotina y adenina; NaMN = mononucleótido de nicotinato; NaR = ribósido de nicotinato; NMN = mononucleótido de nicotinamida; NR = ribósido de nicotinamida; SAH = S-adenosil-L-homocisteína; SAM = S-adenosil-L-etionina; PPi = pirofosfato; PRPP = 5-fosforribosil-1-pirofosfato; NaMN nucleotidasa (1), NaR nucleosidasa (2) y TRG sintasa (3).	19
Ilustración 2. Diagrama de procedimiento de tratamiento de muestra.	56
Ilustración 3. Diagrama de tratamiento de muestra con cartucho HLB.	61
Ilustración 4. Diagrama de tratamiento de muestra final con HLB.	63

Abreviaturas.

AN	Ácido Nicotínico
CAT	Catalasa
EI	Estándar Interno
FT-MIR-ATR	Espectroscopía de reflectancia total atenuada de infrarrojo medio con transformada de Fourier
GSH	Glutación
HILIC	Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica
HPLC-DAD	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con detección de Arreglo de Diodos
HPLC-MS	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplado a Espectrómetro de Masas
IPC	Cromatografía de Pares Iónicos
IPR	Formadores de Pares Iónicos
LC	Cromatografía de Líquidos
LPLC-AD	Cromatografía Líquida de Baja Presión con Detector Amperométrico
NAD	Dinucleótido de Adenina y Nicotinamida
NADP	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
NaMN	Mononucleótido de ácido nicotínico
NaR	Nicotinamida Ribosa
NFPA	Ácido nonafluoropentanóico
NMN	Nicotinamida mononucleótido
NMP	N-Metilpirrolidona
NPC	Cromatografía en Fase Normal
PPi	Pirofosfato
PRPP	5-fosforribosil-1-pirofosfato
QuEChERS	Q uick (rápido), E asy (fácil), C heap (barato), E ffective (efectivo), R ugged (robusto) y S afe (seguro)
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
RP-ESI-ITMS	Fase Reversa por Espectrometría de masas con trampa de iones de ionización por electrospray
RP-HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia de Fase Reversa
RP-HPLC-DAD	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia de Fase Reversa con Detector de Arreglo de Diodos
RP-HPLC-UV	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia de Fase Reversa con Detector Ultravioleta
RP-ICPMS	Fase Reversa por Inducción de plasma Acoplada a Masas

RP-LC-QTOF MS	Cromatografía líquida en tándem cualitativa por Espectrometría de masas de tiempo de vuelo cuadrupolar
SAH	S-adenosil-L-homosisteína
SAM	S-adenosil-L-metionina
SFC	Cromatografía de Fluidos Supercríticos
SOD	Superóxido Dismutasa
SPE	Extracción en Fase Sólida
TLC	Cromatografía en Capa Fina
TR	Tiempo de Retención
TRG	Trigonelina

Resumen.

La tendencia mundial se ha dirigido hacia la introducción de los llamados productos nutracéuticos. El aumento del consumo de nutracéuticos alrededor del mundo ha impactado en el crecimiento de la industria alimenticia, farmacéutica y agrícola, por lo que es necesario contar con procedimientos analíticos eficientes que permitan la determinación de este tipo de compuestos en diferentes matrices. En la actualidad el análisis de alimentos exige continuamente la modernización de los procesos existentes y desarrollo de nuevos procedimientos para obtener métodos analíticos más eficientes, sensibles y, a la vez simples, robustos y rentables, para garantizar la seguridad, calidad y trazabilidad de los alimentos de acuerdo con la legislación y las demandas de los consumidores.

La trigonelina es un alcaloide metilado del ácido nicotínico, se encuentra principalmente en especies vegetales como los granos de café (*C. Arabica*) y en el fenogreco (*Trigonella foenum-graceum*), sin embargo, también se ha determinado en plantas como cebada, guisantes, soja, arroz, alfalfa, centeno entre otros. La TRG, debido a los efectos biológicos se considera como un nutraceútico, este compuesto pertenece al grupo de metabolitos secundarios en plantas y forma parte de mecanismo de adaptación bajo estrés ambiental.

Capítulo 1.- INTRODUCCION.

1.1 Foodomica.

El termino Foodomica o alimentomica se refiere a una disciplina que estudia los dominios de la alimentación y la nutrición mediante la aplicación de las herramientas omics, con el fin de mejorar el bienestar, la salud y la confianza de los consumidores.

La alimentación y nutrición siempre han sido factores determinantes en el desarrollo de los seres vivos. En particular, el término nutriente implica que la sustancia, químico o constituyente en cuestión es requerido para un buen crecimiento del organismo y el mantenimiento de la vida, ya que, por definición, cuando se elimina, su ausencia da como consecuencia síndromes de deficiencia diagnosticable¹. Debido a esto se ha tornado de gran importancia conocer el contenido de nutrientes en cada alimento que se ingiere.

En la actualidad el análisis de alimentos exige continuamente la modernización de los procesos existentes y desarrollo de nuevos procedimientos para obtener métodos analíticos más eficientes, sensibles y, a la vez simples, robustos y rentables, para garantizar la seguridad, calidad y trazabilidad de los alimentos de acuerdo con la legislación y las demandas de los consumidores. Las mejoras de dichos procesos han dado lugar a adelantos significativos en la confiabilidad de los resultados de los análisis realizados en largas series de muestras en un amplio intervalo de concentraciones de los analitos y diferente composición química.

En el contexto de este proceso de innovación y desarrollo metodológico en el análisis de alimentos, existe también un gran interés en evaluación de sus propiedades relacionadas con la salud. Proveer alimentos de buena calidad con alto valor nutricional se ha vuelto un objetivo para las empresas alimentarias, siendo esto una creciente preocupación publica; entre las estrategias existentes, hay que mencionar, la producción y el consumo de los llamados alimentos funcionales y nutraceuticos². Por este motivo no hay duda de la importancia y necesidad actual de desarrollar procedimientos analíticos capaces de afrontar los retos ante la conformación de las matrices de la gran variedad de alimentos existentes.

1.2 Nutraceuticos.

Tradicionalmente, las vitaminas se consideraban como principales compuestos provenientes de plantas, con actividad biológica de importancia en nutrición; sin embargo, hoy en día se conoce una gran cantidad de compuestos derivados de plantas con efectos benéficos para la salud, aunque no se clasifican como vitaminas¹.

De acuerdo con la terminología de los últimos años es adecuado referirse a estos compuestos con el término de fitoquímicos; el uso del prefijo phyto (de la palabra griega phytón [planta]) se refiere a sustancias derivadas o idénticas a las que se encuentran en las plantas. Los fitoquímicos, por lo tanto, son compuestos presentes o derivados de las plantas, aunque se han empleado también otros términos para describirlos, tales como compuestos bioactivos de plantas, nutraceuticos, fitonutrientes y polifenoles respectivamente¹. Para referirnos a cualquiera de estos compuestos, estos deben cumplir ciertos criterios descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Términos propuestos definiciones y criterios para su uso en referencia a compuestos derivados de plantas ¹.

Termino.	Definición propuesta.	Origen.	Implicación intrínseca de actividad biológica.	Base del término.
Fitoquímico	Un compuesto presente en plantas (metabolito de planta).	Planta.	Indicación específica	no Producido en planta
Fenólicos	Un compuesto que contiene un grupo fenólico en su estructura química.	Planta, animal o sintético.	Indicación específica.	no Estructura química.
Polifenoles	Un compuesto que contiene dos o más grupos fenólicos en su estructura química.	Planta o sintético.	Indicación específica.	no Estructura química.
Fitonutriente	Un compuesto y/o derivado de plantas que provee un beneficio a la	Planta.	Efecto beneficioso implícito en salud.	Procedencia y Función.

	salud (incluyendo metabolitos post-consumo).			
Bioactivo	Un compuesto presente en la planta y/o alimento que ejerce un efecto biológico reproducible a niveles dietéticos (incluyendo metabolitos post-consumo).	Planta o animal.	Efecto biológico implícito.	Función.
Nutracéutico	Un compuesto o mezcla de compuestos presentes en comida o suplementos alimenticios destinado a ejercer un efecto terapéutico.	Planta o animal	Efecto beneficioso para la salud o la enfermedad.	Uso propuesto.

Como podemos observar, la clasificación de compuestos contenidos en alimentos y potencialmente benéficos para el consumidor depende de su origen (planta, animal o compuesto sintético), actividad biológica y la base del término.

Para fines del presente trabajo, el término más apropiado es la nutraceutica, debido a que los metabolitos en los cuales me enfocaré, trigonelina y ácido nicotínico cumplen con los criterios resumidos en la Tabla 1. Ambos compuestos, se obtienen de las plantas como sus metabolitos naturales, ambos ejercen efectos benéficos sobre la salud del hombre y se han propuesto para ambos metabolitos aplicaciones específicas.

La nutraceutica, cuyo término fue introducido por Stephen DeFelice en 1989, es una simple fusión de los términos nutricional y farmacéutico. DeFelice definió el concepto de nutraceutico como: *“compuesto químico que pueden encontrarse como componente natural de los alimentos o adicionarse a los mismos y que presenta efectos benéficos, tanto en la prevención de enfermedades como en la mejora de las funciones fisiológicas del organismo”*³. Al igual que en otros textos se puede encontrar como: *“Un producto alimenticio (como alimento enriquecido o suplemento dietético) que aporta beneficios para la salud o médicos además de su valor nutricional básico”*¹. Es importante que, en las diferentes descripciones los compuestos nutraceuticos destacan dos elementos, los cuales son: (I) componente natural o añadido y (II) beneficios para la salud; ambos de importancia para determinar cuándo un compuesto entra en la categoría de nutraceutico.

1.2.1. Clasificaciones de los nutraceuticos.

Se han propuesto diferentes clasificaciones de los compuestos nutraceuticos que permiten su mejor organizaci3n dependiendo de la estructura quimica y/o funci3n biol3gica ⁴:

a) Naturaleza quimica.

En esta clasificaci3n, se agrupan los nutraceuticos en funci3n de estructuras moleculares o aquellos cuyo componente principal es un elemento mineral. Este modelo preliminar incluye varios grupos grandes que proveen una base para subclasificaci3n o subgrupos, y as3 sucesivamente. En esta clasificaci3n ⁴, la agrupaci3n de los nutraceuticos es la siguiente:

1. Derivados de isoprenoides
2. Sustancias fen3licas
3. 1cidos grasos y l3pidos estructurales
4. Carbohidratos y derivados
5. Sustancias basadas en amino1cidos
6. Microorganismos
7. Minerales

b) Mecanismo de acci3n.

Este sistema agrupa los nutraceuticos sin importar su fuente alimentaria, bas1ndose en sus propiedades a nivel fisiol3gico probadas o atribuidas⁴. Entre estas estar3an: antioxidantes, antibacterianas, hipotensivas,

hipocolesterolémicas, antiinflamatorias, anticarcinogénicas, osteoprotectoras, entre otras.

c) Origen.

En esta clasificación se considera la fuente alimentaria de los nutraceuticos, dividiéndolos en los siguientes grupos: plantas, animales o microbianas (bacterias y levaduras). Esta clasificación es útil desde el punto de vista educativo y de la sociedad en general ⁴.

Algunos ejemplos de este tipo de compuestos son carotenoides, ácido linoleico conjugado, flavonoides, derivados de aminoácidos que contiene nitrógeno y azufre, inhibidores de proteinasas y alfa amilasa, ácidos grasos poliinsaturados, omega 3, terpenoides, compuestos fenólicos, carbohidratos derivados, ácidos grasos y lípidos estructurales, basados en aminoácidos, microorganismos (probióticos), y minerales, por mencionar un pequeño grupo de compuestos nutraceuticos.

1.2.2. El impacto de la nutraceutica en el mundo actual.

El aumento del consumo global de nutraceuticos ha impactado en el crecimiento de la industria alimenticia, farmacéutica y agrícola. Como ya se ha mencionado con anterioridad, los nutraceuticos ayudan en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, al igual que pueden mejorar el estado de nutrición de los seres humanos y de los animales. Debido a la gran cantidad y múltiples aplicaciones que estos pueden tener, es necesario contar con procedimientos analíticos eficientes que permitan la determinación de este tipo de compuestos en diferentes matrices, así como la aplicación de protocolos de análisis en los sistemas de control de calidad durante la fabricación de los denominados alimentos funcionales.

1.3. Trigonelina.

El conocimiento que ciertas plantas tienen propiedades benéficas para la salud de humanos y animales es antiguo, durante siglos estas plantas fueron utilizadas en medicina tradicional para tratar ciertos padecimientos. Hoy en día se siguen utilizando las mismas plantas, con la diferencia de que se busca realizar estudios más específicos hacia ciertas propiedades y efectos tomando técnicas modernas para determinar cuáles compuestos de las mezclas complejas que se tiene en las plantas son responsables de los efectos deseables. Cabe mencionar que, incluso la misma planta puede contener una gran variedad de compuestos bioactivos, aunque su abundancia varía entre diferentes especies vegetales. En cuanto a la definición de componentes bioactivos en los alimentos, algunos autores proponen que aquellos son "componentes de los alimentos o suplementos dietéticos, distintos de los necesarios para satisfacer las necesidades nutricionales humanas básicas, pero que son responsables de los cambios favorables en el estado de salud" ¹. Un ejemplo de compuesto bioactivo contenido en plantas es trigonelina (TRG), las plantas con mayor contenido de TRG incluyen el café (granos de *C. Arabica*) y, el fenogreco (*Trigonella foenum-graceum*); sin embargo, TRG también se ha determinado en plantas como *Allium sepapea*, guisantes (*Pissum sativum*), soja (*Glicyne max*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), cebada (*Hordeum vulgare*), arroz (*Oryza sativa*), alfalfa (*Medicago sativa*), centeno (*Secale cereale*) entre otras especies de plantas ⁵⁻⁷. Así mismo, TRG se ha encontrado en algas rojas (*Tichocarpus crinitus*, *Botryocladia botryoides*, y *Pterocladia capillacea*), en esponjas marinas tales como *Calyx nicaensis* (*nicacensis*) y *Stryphnusponderosus* (Demospongiae), dentro de las Cnidarias y en mamíferos después de usar ácido nicotínico ⁸.

La trigonelina (TRG) con fórmula química $C_7H_7NO_2$ y peso molecular de 137.136 g/mol (Figura 1), es una piridina alcaloide o ácido N-metil nicotínico ⁵, la TRG es un compuesto moderadamente ácido (basándonos en su pKa de aproximadamente 2.8). Este metabolito se encuentra presente en todos los organismos vivos, su nombre establecido por la IUPAC es 1-metilpiridin-1-ilo-3-carboxilato ^{9,10}, aunque también se le conoce por otros nombres como cafearina, betaina nicotinato, entre otros; número CAS 535-83-1. La

TRG es un derivado de la vitamina B3, soluble en agua y etanol tibio e insoluble en cloroformo y éter, con punto de fusión de 218°C. La trigonelina puede emitir vapores tóxicos al combinarse con NOx durante su degradación por calor ⁸.

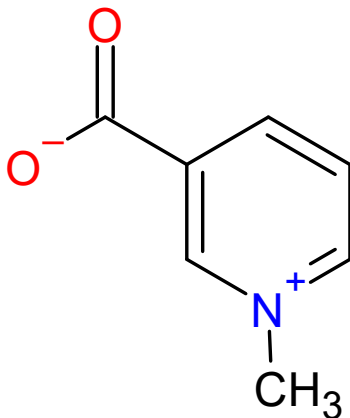


Figura 1: Estructura química de la Trigonelina.

1.3.1 Función fisiológica de TRG en plantas.

La TRG pertenece al grupo de metabolitos secundarios en plantas y forma parte de mecanismo de adaptación bajo estrés ambiental; este compuesto actúa como osmolito ¹¹, es decir ayuda a regular el tráfico/estatus del agua, su acumulación en planta depende de factores como el genotipo de la planta, así como de factores externos abióticos como el tipo de suelo ^{5,12-17}, la radiación ultravioleta, irrigación, la época de cosecha y la presencia de metales en el suelo. Regula el proceso del ciclo celular en células de animales y plantas, desencadena la detención del ciclo celular en la fase G2 y estimula el movimiento de las hojas. Es relevante que la más alta concentración de este metabolito corresponde a las semillas germinando, mientras que después de la germinación, se transfiere a las raíces y brotes ⁸.

Aunado a su papel en estrés abiótico, de manera similar como otros compuestos de carácter de amina cuaternaria (betaína o colina) (Figura 2), la TRG induce resistencia a infecciones fúngicas en las plantas. Así mismo, sirve como nutriente para los

microrganismos en la rizosfera de las plantas prácticamente en todas etapas de su desarrollo y acción simbiótica ⁸.

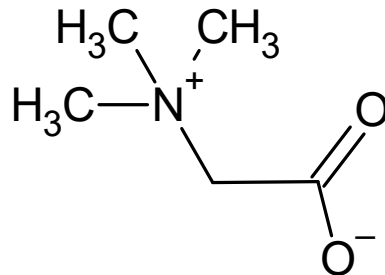


Figura 2: Estructura química de la Betaína.

1.3.2 Rutas de síntesis y biosíntesis de la TRG.

La biosíntesis de la TRG ha sido estudiada con relación a la biosíntesis del ácido nicotínico (niacina), dinucleótido de nicotinamida (NAD) y adenina reciclada en plantas. Por primera vez, estas rutas de biosíntesis fueron investigadas en extractos de semillas de *P. sativum*. En la ruta clásica, la TRG es formada por la degradación del NAD a través del ciclo piridin nucleótido. En otra ruta, TRG es sintetizada directamente por NaMN (nicotinato mononucleótido) con ayuda de tres sistemas enzimáticos: NaMN nucleotidasa, NaR (Ribósido de nicotinato) nucleosidasa y nicotinato metiltransferasa (trigonelinsintasa) (Ilustración 1). Esta ruta ha sido reportada en frijol mungo (*Vigna radiate*)^{8,18}.

De forma sintética la producción de trigonelina se han reportado dos rutas distintas: El método Hantzsh y el método de Winterstein y Weunhagen ¹⁹.

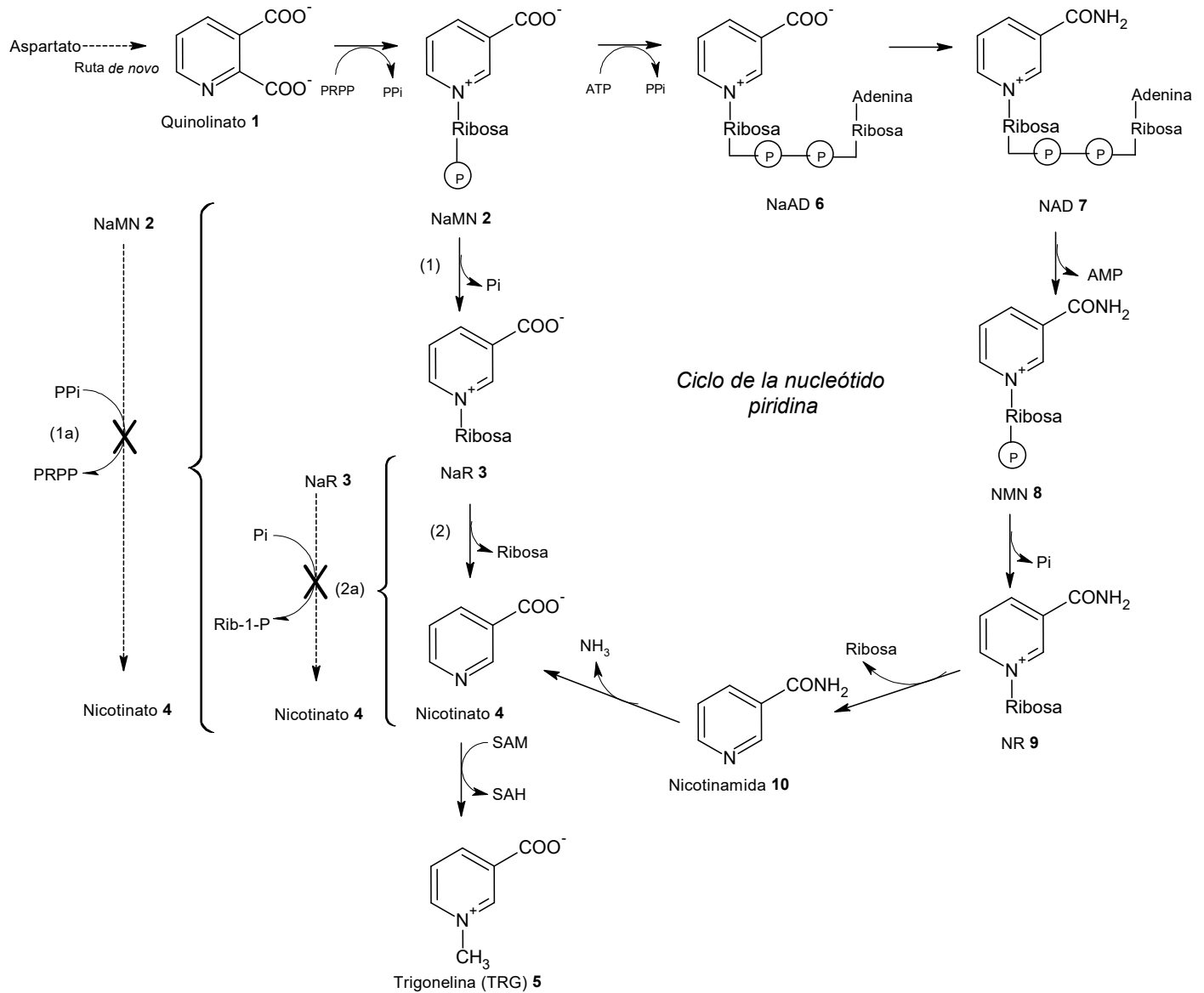


Ilustración 1. Vía propuesta de síntesis de trigonelina (5) a partir de NaMN (nicotinato mononucleotido) (2). Los pasos (1) a (3) son respectivamente catalizados por la nucleotidasa NaMN, la nucleosidasa NaR y la trigonelina sintasa. Las enzimas alternativas, nicotinato fosforribosiltransferasa o NaMN glicohidrolasa (no se muestra la reacción), podría participar en el paso (1a), y el nucleósido fosforilasa en el paso (2a), aunque aquí no se obtuvo evidencia. También se muestra la síntesis de trigonelina (5) a través del ciclo del nucleótido de piridina¹⁸. NaAD = nucleótido de adenina de nicotinato; NAD = dinucleótido de nicotina y adenina; NaMN = mononucleótido de nicotinato; NaR = ribósido de nicotinato; NMN = mononucleótido de nicotinamida; NR = ribósido de nicotinamida; SAH = S-adenosil-L-homocisteína; SAM = S-adenosil-L-etionina; PPI = pirofosfato; PRPP = 5-fosforribosil-1-pirofosfato; NaMN nucleotidasa (1), NaR nucleosidasa (2) y TRG sintasa (3).

1.3.3 Actividad farmacológica.

La trigonelina, como compuesto nutracéutico, presenta múltiples efectos biológicos. Varios estudios han demostrado sus efectos en el sistema nervioso de ratas y ratones, los cuales incluyen la antinocicepción y antimigrañas, aumentando el umbral de convulsivo en ratas normales, regeneración de dendritas y axones aumenta el porcentaje de axón o una dendrita, así como la reacción positiva de neuritas a neurofilamento-H fosforilado en neuronas corticales. Su estructura molecular es similar a la de la cotinina (Figura 3) (fármaco anti-Alzheimer). Los ensayos de modelado molecular mostraron que la afinidad de este metabolito para interactuar con el péptido beta-amiloide es muy alta, así mismo fue eficaz en el tratamiento de la neuropatía auditiva diabética causada por la interrupción de los impulsos nerviosos del oído interno al cerebro. Al igual que estimula la liberación de dopamina mediante el ensamblaje de calcio intracelular, lo que conduce a la liberación de dopamina de las células de feocromocitoma. Los resultados mostraron una función eficaz sobre la neuropatía periférica dolorosa en ratas mediante la inhibición de la liberación de citocinas ⁸.

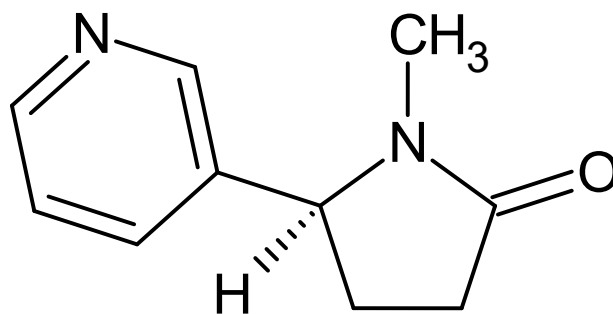


Figura 3: Estructura química de la cotinina.

Por otra parte, hay estudios que muestran que reduce los niveles de glucosa en sangre en conejos diabéticos y normales. La TRG y gliburida (Figura 4) mostraron resultados similares en la disminución de glucosa sérica, aunque sus mecanismos de acción eran diferentes. En otro estudio se mostró que la TRG y la diosgenina, mejoraron de forma independiente los parámetros bioquímicos del suero, disminuyeron la respuesta de la

proteína desplegada y el estrés del retículo endoplásmico, de igual manera reforzaron el estado antioxidante del páncreas. El efecto hipoglucémico de las semillas de legumbres es atribuido a este, la cual también es efectiva en la regeneración de las células β , secreción de insulina, actividad enzimática relacionada al metabolismo de la glucosa y la reducción del estrés oxidativo en la diabetes tipo II ^{8,20,21}.

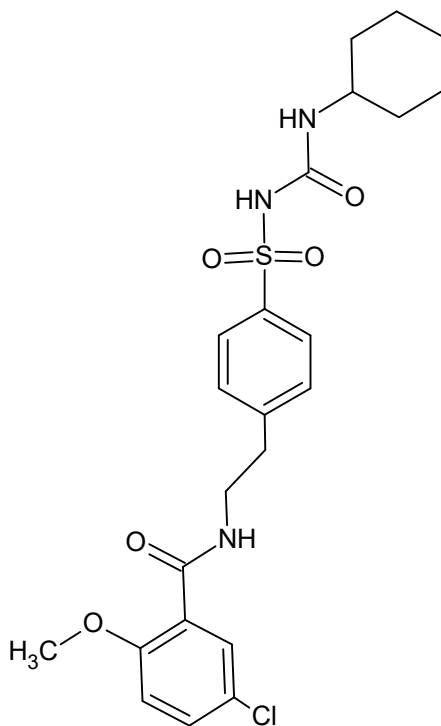


Figura 4: Estructura molecular gliburida.

Estudios bioquímicos confirman la actividad hipoglucémica de la TRG que imita la función de la insulina e inhibe la actividad de la α -amilasa intestinal. Estudios demuestran que ratas con diabetes presentaron disminución en los niveles de glucosa en sangre, colesterol y triglicéridos, mientras que el nivel de insulina, óxido nítrico y malondialdehído, y enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y también de glutatión (GSH) exhibieron niveles normales en ratas tratadas ⁸.

Sus efectos anticancerígenos se han demostrado en numerosos estudios ⁸. Las actividades de niacina, ácido nicotínico, nicotinamida y trigonelina inhibiendo la proliferación y la invasión de células cancerosas, para lo cual se realizó un estudio en cultivos de una línea celular de hepatoma de AH109A de rata. Estos compuestos

presentaron capacidad de suprimir la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) ²². Por otro lado, se ha reportado que el factor de transcripción del factor II relacionado con E2 tiene un papel clave en el desarrollo del cáncer y la resistencia al tratamiento médico. Por tanto, la inhibición del factor II relacionado con E2 es una estrategia eficaz para el tratamiento del cáncer. Así mismo, reduce la actividad del factor de transcripción del factor II relacionado con E2 y la acumulación de proteínas del factor II relacionadas con E2. Del mismo modo, se ha investigado el efecto terapéutico de los alcaloides del café, especialmente TRG, en el cáncer de páncreas ⁸.

Se ha reportado una alta actividad antioxidante en extracto crudo rico en TRG de plantas como el café y el fenogreco, proporcionando una evidencia que este disminuye el estrés oxidativo en diabetes por actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación de lípidos ⁸.

De igual manera puede proteger al hígado mediante un incremento de la expresión de la proteína Bcl-2 (células linfoma B-2); además, los animales tratados con TRG presentaron cambios favorecedores en tejido dañado en riñones y fibrosis ⁸; como compuesto de piridinio ejerce un efecto preventivo contra trombosis, dichos compuestos estimulan la liberación de prostaglandina I₂ e inhiben la agregación plaquetaria ⁸.

1.3.4. Trigonelina como compuesto nutraceutico y su relevancia en organismos vivos.

Como se ha mencionado con anterioridad el uso de TRG como nutraceutico tiene beneficios neurológicos, ayuda en la regeneración de dendritas y axones, dando como efecto una mejora en la memoria de quien lo consume. También actúa como agente anti-invasivo contra células cancerosas ^{5,8,12,15}. De igual manera se ha comprobado que tiene propiedades hipoglicémicas, antisépticas, antitumorales, osmoregulatorias, antibacterianas y antivirales ^{11,15,16,23}. Además de los efectos biológicos descritos, esta juega un papel importante en la formación de productos que influyen en el sabor y aroma en plantas y frutos como el café. Entre los compuestos en este grupo hay que mencionar,

los furanos, alquilpiridinas y pirroles; su desmetilación durante el proceso de tostado produce ácido nicotínico que es absorbido por el consumidor y forma parte de la coenzima NAD (nicotin adenin dinucleótido) y NADP (Nicotin adenin dinucleótido fosfato) ambos esenciales para el metabolismo energético en las células ^{12-14,24}, por lo que se deduce que la TRG y el AN están muy ligados y debido la analogía se propondría un método de determinación simultanea de dichos analitos.

1.4. Ácido Nicotínico y su relación con la trigonelina.

Par la TRG se han descrito varias rutas de degradación siendo la más común la debida al aumento de temperatura ²⁵. Su descomposición se lleva a cabo por tratamiento térmico a temperaturas mayores a los 140°C²⁵, en N-metilpiridinio (NMP), metilnicotinato y ácido nicotínico (AN) ²⁶. En la figura 5 se presenta la ruta de degradación térmica de la TRG. Este proceso de degradación térmica suele presentarse durante el tostado de los granos café.

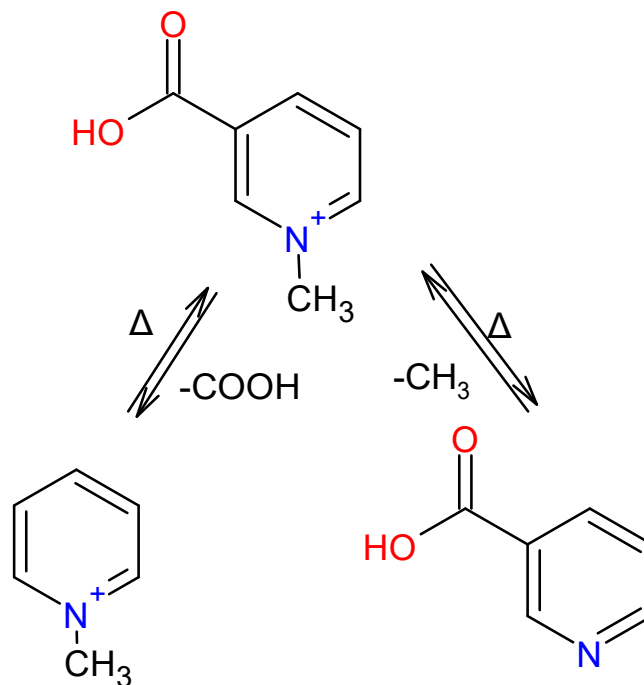


Figura 5. Rutas de degradación térmica de la trigonelina a N-metilpiridinio y Ácido Nicotínico^{25,56}.

A partir de esta ruta, el interés en el estudio del Ácido Nicotínico (AN) radica en las funciones biológicas con fórmula química $C_6H_5NO_2$ y peso molecular de 123.11 g/mol (Figura 6), también conocido como niacina o vitamina B3, es una vitamina soluble en agua cuyos derivados como Nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), (NAD), (NAD+) y Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) desempeñan funciones esenciales en el metabolismo energético de las células vivas y en la reparación del Ácido Desoxirribonucleico (ADN). El ácido nicotínico es un polvo cristalino blanco inodoro con un sabor ligeramente ácido pH 2.7 (solución acuosa saturada), punto de fusión de $236^{\circ}C^{27}$. Este metabolito se encuentra presente en todos los organismos vivos, su nombre establecido por la IUPAC es Ácido piridin-3-carboxílico, aunque también se le conoce por otros nombres como 3- carboxipiridina, niaspan, entre otros; número CAS 59-67-6²⁸.

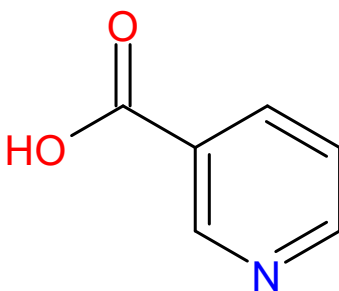


Figura 6. Estructura Química Ácido Nicotínico.

Al ser el ácido nicotínico un derivado de la trigonelina hace posible la determinación simultánea de estos analitos, la TRG y AN, gracias a su buena solubilidad en agua y baja toxicidad, es segura para administración en organismos vivos, lo que facilita el desarrollo de nuevos suplementos o productos farmacéuticos que aprovechan sus propiedades nutraceúticas en tratamiento alternativo de padecimientos antes mencionados. Con ello se justifica la importancia en el desarrollo de un procedimiento analítico para la determinación de TRG, que es uno de los objetivos principales de este trabajo de tesis.

En las siguientes secciones, se describen brevemente algunos procedimientos descritos en la bibliografía para el tratamiento de muestra y posteriormente un breve análisis de técnicas utilizadas para la determinación de TRG y AN.

2.1. Procedimientos de preparación de muestra para la extracción de trigonelina en diferentes matrices alimenticias.

El tratamiento de muestras es sin duda una parte desafiante de cualquier procedimiento analítico aplicado al análisis de muestras reales de una composición química compleja. En particular, la extracción de trigonelina de material de plantas a menudo requiere múltiples pasos y prolongados tiempos de tratamiento para asegurar la representatividad de la muestra y efectiva extracción del analito, eliminando al mismo tiempo los potenciales interferentes. A continuación, se describen brevemente los pretratamientos utilizados en algunos trabajos que reportan la determinación de trigonelina en plantas, así como la Tabla 2 donde se pueden desglosar un mayor número de ejemplos de tratamiento.

Para la determinación de trigonelina en semillas de fenogreco por HPLC-DAD en fase inversa, el procedimiento consistió de 8 pasos previos a la inyección de la muestra al sistema cromatográfico; 1) pulverización de la semilla, 2) extracción con metanol durante 22h a temperatura ambiente con agitación, 3) agitación intensa por 20 min, 4) centrifugación a 3000 g durante 10 minutos, 5) obtención del sobrenadante, 6) evaporación de sobrenadante utilizando rotavapor, 7) resuspensión, 8) filtración e 9) inyección ²⁹.

En otro estudio, para análisis de semillas de fenogreco, el procedimiento para el tratamiento de muestra fue el siguiente:

- 1) Trituración de las semillas en mortero.
- 2) Eliminación de lípidos mediante extracción con éter de petróleo en un aparato soxhlet por 48 horas.
- 3) Filtración.
- 4) Extracción con metanol durante 4 horas con agitación suave ocasional.
- 5) Evaporación del extracto a temperatura ambiente durante 12 horas.
- 6) Se añadió metanol, para dejar durante toda la noche.
- 7) La mayor parte del disolvente se evaporó al vacío.
- 8) La muestra se sometió a la prueba de alcaloides empleando los reactivos de Mayer y Dragendorff, se observó que el extracto contenía algunos tintes y trazas de sustancias gomosas.
- 9) Se adicionó un exceso acetona-metanol (3:1) para precipitar dichas sustancias y eliminarlas por filtración.
- 10) Se evaporó la acetona y se añadió carbón activado.
- 11) La muestra se

calentó por 5 minutos para obtener una solución transparente. 12) Se adicionó HCl al 5% (pH 4) y se calentó a reflujo por 2 horas, luego se repartió con cloroformo. 13) Se empleó TLC para evaluar la presencia de TRG HCl y trazas de colina con una fase móvil de metanol-agua (50:50 v/v). 14) Se aisló la TRG HCl mediante TLC preparativa y fue recristalizada con etanol al 90%.

Tabla 2. Técnicas de Extracción para Trigonelina encontradas en la literatura.

Muestra (parte de la planta y nombre de la planta)	Técnica de extracción	Analitos determinados	Referencias
Frutos de <i>Lycium</i>	Extracción por SPE	Trigonelina y Betaina.	30
Cerezas de café	Extracción con oxido de magnesio y agua destilada.	Trigonelina	31
Semillas de Fenogreco	Éter de petróleo con aparato soxhlet	Prueba de alcaloides Mayer Dragendorff (colina, Trigonelina.)	
Semillas de Fenogreco	Extracción con metanol	Trigonelina	32
Café Instantáneo	Extracción con agua destilada caliente.	Trigonelina y Cafeína	33
Café instantáneo	Extracción con agua destilada caliente.	Trigonelina, Cafeína y Ácido Clorogénico	34
Haba de soja	Extracción con metanol y compuestos de amonio cuaternario.	Trigonelina	17
Hojas de <i>Bauhinia forficata</i>	Extracción con agua destilada caliente.	Trigonelina	35
<i>C. Arabica</i> y <i>C. canephora</i> Café verde	Extracción con agua desionizada caliente durante 10 min.	Trigonelina	36
Café verde	Extracción con 60% de metanol con uso de sales QuEChERS y acetonitrilo	Trigonelina, Cafeína y Ácido Clorogénico	37

Con base a los ejemplos mencionados en la Tabla 2, el pretratamiento antes de análisis por cromatografía de líquidos debe incluir una etapa de homogenización y de secado de muestra (o evaluación del contenido de agua), eliminación de lípidos, extracción de trigonelina (típicamente con metanol), en casos más recientes el uso de QuEChERS, el método QuEChERS acrónimo en inglés de **Q**uick (rápido), **E**asy (fácil), **C**heap (barato), **E**ffective (efectivo), **R**ugged (robusto) y **S**afe (seguro), es un sistema de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) que implica dos etapas fundamentales, una primera etapa de extracción simple que consta con la utilización de un solvente orgánico, comúnmente acetonitrilo seguida de una fase de limpieza del extracto mediante extracción en fase sólida por dispersión³⁷, preconcentración mediante la evaporación, reconstitución en fase móvil y filtración.

2.2. Técnicas analíticas empleadas para la determinación de Trigonelina.

En la Tabla 3 se presenta una breve reseña del estado de arte en la determinación de trigonelina, enfocándose en el uso de las técnicas analíticas. Este compuesto ha sido determinado en diferentes tipos de matrices (granos/semillas y tejidos de planta, principalmente), siendo la técnica más utilizada la cromatografía de líquidos de alta resolución con detección espectrofotométrica utilizando detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) debido a las características especiales de la estructura de la trigonelina que consisten en un ion dipolar que posee un grupo amonio cuaternario y un grupo ácido carboxílico conducen a mostrar un cromóforo ultravioleta. En cuanto a las condiciones de detección, típicamente se aplica la longitud de onda de 267 ± 1 nm, o en algunos casos longitudes de onda mucho más baja como es el caso de 195 nm³⁰, correspondiente al máximo de absorción de este compuesto aromático^{32,38}. Puesto que la TRG en condiciones fisiológicas se presenta como un zwitterion, para su separación cromatográfica el ajuste de pH de la fase móvil es muy importante. Se han reportado procedimientos basados en el uso de columnas de fase inversa C18^{31,32,38} o con grupos ciano-propil enlazados a silica, mismos que ofrecen un secundario mecanismo de retención en base a interacciones π - π ³⁹. Se ha explorado también el uso de columnas de

intercambio aniónico (pH alcalino) o catiónico (pH ácido) ^{17,40}. En otros trabajos se llegó a determinar la cantidad de TRG utilizando como método de separación TLC y posteriormente cristalización en TRG HCL (clorhidrato de trigonelina). Al igual que se ha utilizado diferentes tipos de columnas HILIC, que incluyen dihidroxipropilo, zwinterion y grupos amina unidos a partículas porosas de sílice, estas son algunas de las que se han utilizado para la separación de trigonelina en extracciones de plantas ^{30,41}, Tal vez la más interesante opción es la aplicación de columnas de fase inversa en el modo de formación de pares iónicos. En este caso, el pH de la fase móvil debe ser relativamente bajo para asegurar la forma de trigonelina como amina cuaternaria (pH ≤ 4) ^{34,36}. Se han utilizado derivados del ácido sulfúrico sustituido con diferentes cadenas alifáticas, entre ellos 1-tetradecanosulfonato de sodio³⁶ y ácido 1-octanosulfónico ³⁴ como formadores de pares iónicos.

Tabla 3: Principales técnicas analíticas utilizadas para la determinación de trigonelina en plantas.

Planta	Muestra	Técnica analítica (Condiciones)	Comentarios	Referencia
<i>Trigonella foenum-graceum</i> / Fenogreco	Semillas	HPLC-DAD Fase inversa (C18) Agua:Metanol (50:50 v/v) pH 5.0	La obtención de TG y NA varió de 0.248% (p/p) a 0.653% (p/p) para diferentes ecotipos. En uno de los grupos analizados se obtuvo un valor de 12.72g de TG y AN a partir de 1000 semillas.	29,38
<i>Medicago Sativa</i> / Alfalfa	Raíces (rizosfera)	HPLC-DAD Fase inversa (C18) MeOH-Agua (1:1)	En las semanas 16 y 17 se obtuvieron 73.8 y 24.1 µg/g de trigonelina. La TG se acumula bajo estrés salino, los niveles de TG en tejidos de plantas, puede ser un indicador de estrés.	11
<i>Coffea arabica</i> / Café	Granos	HPLC-MS Fase inversa (C18)	El contenido de trigonelina en dos	12,42

		Ácido fórmico al 0.3%	especies de café (Arábica y Robusta) fue de 1029.8 y 900.6 mg/100g de café respectivamente.	
	Granos	Espectrofluorimetría Fuente lámpara de xenón $\lambda_{TG} = 267\text{nm}$	Se determinaron la cafeína y la trigonelina, se revelaron recuperación y reproducibilidad en comparación con otros métodos cromatográficas, siendo un método rápido, simple y rentable.	15
	Granos	FT-MIR-ATR Portamuestras de seleniuro de zinc $1430-1170\text{cm}^{-1}$	Técnica no destructiva, simple, económica y confiable de cafeína y trigonelina, no requiere solventes orgánicos.	5
<i>Glycine max</i> / Soja	Semillas, hojas, vainas, tallos	HPLC-DAD Intercambio iónico Dowex-1-OH ⁻ Dowex-50-H ⁺ $\lambda_{TG} = 264\text{nm}$	La acumulación TG decrece cuando no se riega, controla el ciclo celular, actúa como osmoprotector y se almacena como ácido nicotínico.	17,40
<i>Helianthus annuus</i> / Girasol	Semillas	HPLC-DAD Fase inversa (C18) Metanol:Agua (1:1) $\lambda_{TG} = 254\text{nm}$	La mayor concentración de TG se detectó en leguminosas.	43
<i>Pisum sativum</i> / Chícharos	Raíces, brotes (hojas), vainas, semillas	HPLC-DAD Intercambio aniónico pH=5.18 $\lambda_{TG} = 250\text{nm}$ Solvente 7mM tampón de fosfatos	El contenido de trigonelina es el mismo tanto en plántulas como en semillas secas.	40

<i>Feonum- grecum/ Fenogreco</i>	Semillas	HPLC-DAD Fase inversa (columna CN-MS con grupos ciano-propil) Metano-Agua (95:5) pH=3.5 $\lambda_{TG} = 267\text{nm}$	Detección de 100-8000 ng/mL Método simple, sensible, preciso, reproducible y robusto. Puede emplearse en aseguramiento de calidad y estandarización.	39
<i>C. arabica, C. canephora/ Café</i>	Semillas	LPLC-AD Columna C18 monolítica 1-tetradecanosulfonato de sodio para formar pares iónicos	Se empleó una estrategia de cromatografía de pares iónicos en sistemas de flujo cromatográfico de baja presión, el uso de columnas monolíticas de corta longitud, con reactivos de par iónico. Es un método poco empleado pero prometedor.	36
<i>C. arabica, C. canephora</i>	Café instantáneo	HPLC-UV Columna C18 Pares iónicos Octano sulfonato 220nm	Es útil para hacer análisis simultáneos, se empleó octano sulfonato bajo condiciones ácidas.	34
<i>Lycium LBL/LRM/LBA/LCM</i>	Fruto	HPLC-DAD Acetonitrilo-agua (81:19, v/v) Analizado usando los grupos dihidroxipropil en columna HILIC $\lambda = 195\text{nm}$	Método eficiente con SPE para la separación y determinación simultánea de betaina y trigonelina obteniendo una gran eficiencia en la extracción.	30
<i>Bauhinia forficata</i>	Hojas	HPLC-UV Fase inversa Columna C-18 Fase móvil de Acetato de sodio 50mM y metanol.	Evaluación del uso de extractos de <i>Bauhinia forficata</i> en el tratamiento de <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2.	7

Ratones macho C57BL/6	Suero de Ratón	HILIC-ESI-MS/MS Columna HILIC a 35°C Solución tampón acetonitrilo-formiato de amonio 10mM (55:45, v/v) a pH=3 Tiempo de retención analizado= 2.5 min	Método rápido y preciso de cuantificación de trigonelina con el uso de trigonelina deuterada como EI.	41
Ratones	Plasma de Ratón.	HPLC-ESI en método iones positivos. Columna zorbax SB- C18 Ácido fórmico- acetoniirilo 0.1%	Monitoreo de iones para la cuantificación, utilizando fragmentos de iones diana m/z 138 para trigonelina y m/z 237 para el IS (carbamezapina).	44

HPLC-DAD Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección de arreglo de diodos, HPLC-MS Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplado a Espectrómetro de Masas, LPLC-AD Cromatografía Líquida de Baja Presión con detector amperométrico, FT-MIR-ATR Espectroscopía de reflectancia total atenuada de infrarrojo medio con transformada de Fourier, El estándar interno.

En este trabajo de tesis se propone emplear una separación con un equipo de RP-HPLC-DAD con una típica columna en fase inversa, columna C-18, y con modalidad de pares iónicos, utilizando como contra-ion el NFPA (Ácido nonafluoropentanoico) (Figura 7).

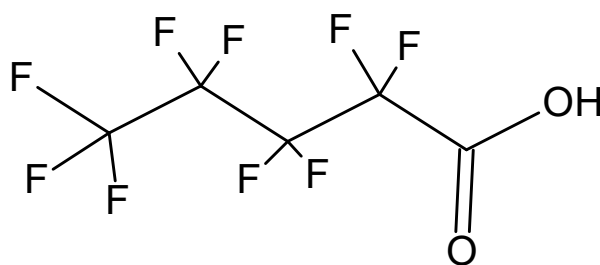


Figura 7. Estructura química de NFPA.

2.2.2. Técnica cromatográfica como medio de análisis.

La Cromatografía de Líquidos (LC)⁴⁵ es probablemente la técnica más utilizada en laboratorios modernos, debido a su capacidad de cuantificación y detección simultánea

de analitos, la capacidad de esta técnica de analizar un amplia gama de muestras en diferentes campos de estudio como farmacéutico, ambiental, forense, alimentario y de ciencias de la vida, mediante el uso de múltiples técnicas cromatográficas que comparten principios teóricos, basados en las afinidades diferenciales de las especies químicas individuales como polaridad, tamaño, peso, entre otras, para dos fases inmiscibles: la fase estacionaria y la fase móvil.

En la actualidad la mayoría de las separaciones se realizan en fases estacionarias apolares con eluyentes orgánicos polares: este modo de cromatografía se denomina cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC), ya que la polaridad de la fase estacionaria está "invertida" a diferencia de la fase estacionaria en la cromatografía en fase normal (NPC). Uno de los mayores desafíos que enfrentan los usuarios que aplican la cromatografía en fase reversa es la separación de especies químicas iónicas (con cargas), como la trigonelina, para las cuales el uso de RP-HPLC está algo restringido debido a que estos compuestos tienen poca retención en la fase estacionaria apolar. Por lo que esta desventaja provoco el desarrollo de estrategias para retener este tipo de compuestos, surgiendo como primer representante la cromatografía por intercambio iónico, es un método de separación para analitos iónicos, en el cual la fase estacionaria cuenta con grupos ionizados (con carga opuesta al analito) lo cual aportaba resistencia al paso de estos a través de la columna, teniendo como inconveniente la selectividad limitada de los grupos que contenía la columna, estos inconvenientes llevaron al desarrollo de la segunda técnica, la cromatografía de pares iónicos la cual se aplica a analitos polares misma que se usará en el desarrollo de este proyecto.

2.2.3. Cromatografía de pares iónicos.

La cromatografía de pares iónicos (IPC)⁴⁵ se aplica en particular a compuestos iónicos o fuertemente polares. Este tipo de cromatografía es muy similar a la RP-HPLC, con la diferencia de tener una fase móvil especial (par iónico). En la fase móvil de la cromatografía de pares iónicos, se agrega un reactivo que interactúa con las cargas de los analitos y forma compuestos menos polares debido a las interacciones ion-ion (Figura

8), se pueden separar en función de las interacciones hidrofóbicas con la fase estacionaria. Los factores clave en las separaciones IPC son el tipo y la concentración del reactivo formador de pares iónicos (IPR), como se mencionará posteriormente en la búsqueda de la concentración adecuada de NFPA para la puesta a punto del método.

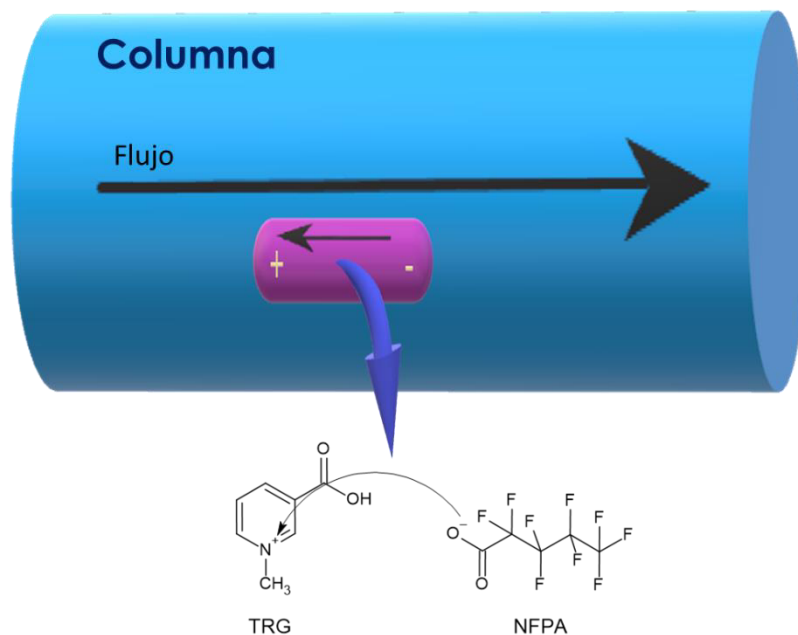


Figura 8. Diagrama de interacción del compuesto de formación de pares iónicos. En la figura se muestra como es el aumento en el tiempo de retención debido a la interacción ion-ion que tiene el analito cargado con el reactivo de pares iónicos, disminuyendo su polaridad por lo tanto le permite interactuar más con las paredes de la columna aumentando su tiempo de retención.

Al hablar del tipo de formador de pares iónicos, se refiere a los IPR con carga positiva, el representante de este grupo lo obtienen los iones de amonio orgánicos, estos aplicados a analitos con cargas negativas, mientras que para los IPR con carga negativa, los ácidos carboxílicos perfluorados y las sales lipófilicas caotrópicas, estos dos superando a los iones orgánicos de sulfonio para analitos con cargas positivas, estos últimos, IPR con carga negativa, siendo los de interés para el desarrollo del proyecto debido a las características presentadas anteriormente para la TRG.

Recordando un poco las características de la TRG, su estructura está cargada, esto lo describe como una molécula altamente polar, lo que nos señala que el uso de RP-HPLC podría no ser una buena opción, pero debido al uso de un IPR esta puede ser una opción viable para el desarrollo de una metodología eficaz, rápida y de fácil aplicación para la

determinación de la TRG, al seleccionar la técnica de RP-HPLC conlleva al siguiente paso que es seleccionar el reactivo de pares iónicos (IPR) a utilizar. En la Tabla 4 se describe el estado del arte en la cual señala el uso de IPR en la cuantificación de múltiples metabolitos relacionados con la TRG Y AN.

Tabla 4. Estado del arte del uso de Formadores de Pares Iónicos (IPR).

Muestra	Técnica	Reactivo de pares iónicos IPR	Analitos determinados	Referencia
<i>C. arabica</i> , <i>C. canephora</i> / Café	LPLC-AD	1-Tetradecanosulfonato de sodio. 1-Octanosulfonato de sodio.	Cafeína, Ácido clorogénico, trigonelina.	36
<i>C. arabica</i> , <i>C canephora</i>	RP-HPLC-UV	1-Octano Sulfonato de sodio	Trigonelina.	34
<i>Rhizoma corydalis</i>	SFC	1-Butanosulfonato de sodio. 1-Pentanosulfonato de sodio. 1-Hexanosulfonato de sodio. 1-Heptanosulfonato de sodio.	Mezcla de 7 Alcaloides.	46
Plasma sanguíneo, tejido de corazón, cerebro, tejidos de hígado, bazo y riñón de conejo adulto	RP-LC-QTOFMS	Hexilamina.	Perfil Metabólico.	47
Orina de Humano.	RP-HPLC-DAD	Ácido 1-Heptanosulfónico.	1-metilnicotinamida y 1-metil-2-piridin-5-carbamida.	48
<i>Allium fistulosum</i> /orina / agua	RP-ICPMS RP-ESI-ITMS	Hidróxido de Tetrabutilamonio.	Derivados de Arsénico y selenio	49

El NFPA ha sido utilizado como contra-ion en la separación de aminoácidos, carboximeltillisina y aminas biogénicas ⁵⁰⁻⁵², por lo que podría ser efectivo también en el análisis de trigonelina, debido a características estructurales como lo son un grupo amina cuaternaria y un grupo ácido carboxílico, que asemeja estructuralmente a los compuestos con los que el NFPA funciona como contra-ion. El uso de este formador de pares iónicos puede contribuir a varias ventajas siendo una de estas la obtención de mejores resultados en comparación con lo ya reportado con formadores de pares iónicos derivados de sulfonio, así como la volatilidad del NFPA por lo que podría ser utilizado en equipos de cromatografía de líquidos con espectrometría de masas para un análisis complementario.

Capítulo 2.- OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

Desarrollo de un procedimiento analítico para la determinación de trigonelina y ácido nicotínico, mediante el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD), utilizando formación de pares iónicos.

Capítulo 3.- PARTE EXPERIMENTAL.

Instrumentación Analítica, Reactivos y Softwares.

3.1.1. Instrumentación Analítica.

- Purificador de agua Milli Q Labconco Water PRO-PS.
- Balanza Analítica, KERN 870.
- Potenciómetro PHS-3BW Benchtop.
- Speedvac, Vacufuge plus, eppendorf.
- Centrifuga, Legend micro-17, Thermo scientific.
- Centrifuga, mini centrifuga Modelo Gusto, KEM.
- Cromatógrafo de líquidos equipado con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), Modelo Agilent Technologies 1200 Series.
- Material de Laboratorio.

3.1.2. Reactivos y Disolventes.

- Metanol, grado HPLC.
- Acetonitrilo, grado HPLC.
- Agua desionizada.
- Cloroformo, grado HPLC.
- Ácido Fórmico, Karal.
- Ácido Acético Glacial, KEM.
- Hidróxido de amonio, J.T. Baker.
- Ácido Perfluoropentanoico (NFPA), SIGMA.
- Ácido Nicotínico, SIGMA.
- Clorhidrato de Trigonelina, SIGMA.

3.1.3. Software.

- ChemSketch, ACD Labs 2021.1.2, modelado de moléculas.
- Microsoft office 365.
- Agilent ChemStation instrument 1 (offline 1) Data Analysis, Análisis de datos.
- Agilent ChemStation instrument 1 (online 1) Method & Run Control, Manejo del equipo.

3.1.4. Estándares.

- Se utilizaron como estándares de referencia el Clorhidrato de Trigonelina de Sigma-Aldrich grado estándar analítico, lote BCBS1531V, CAS 6138-41-6 y el Ácido Nicotínico de Sigma Aldrich con pureza de 98% de pureza, lote SLBT6040, CAS 59-67-6.
- La fase móvil consistió en Ácido perfluoropentanoico (NFPA) de Sigma-Aldrich con pureza de 97%, CAS 2706-90-3, este utilizado como formador de pares iónicos.

3.1.5. Muestras.

Para el desarrollo del procedimiento analítico se seleccionaron diferentes tipos de muestras: 1) biomasa liofilizada de germinados de alfalfa obtenidos bajo diferentes condiciones de estrés abiótico y 2) café de la especie arábica con diferente proceso de tostado. En la Tabla 5 se describen cada una de ellas.

Tabla 5. Condiciones de crecimiento para las plantas de Alfalfa y Trigo.

Muestra	Descripción	Características
Alfalfa	Germinados a diferentes condiciones de estrés abiótico	Cr (VI), NaCl y Se (IV)
Café	Café de la especie arábica	Diferentes tipos de tostado

Capítulo 4- Resultados y Discusión.

La composición de la fase móvil en la cromatografía de formación de pares iónicos es compleja, ya que en adición el reactivo formador de pares iónicos, también se adicionan buffers, sales neutras y solventes orgánicos. El estudio sistemático sobre la influencia de estos factores sobre el comportamiento de la retención de los analitos está relacionado con el tipo de carga deseable del formador de pares iónicos (catión o anión) el cual a su vez depende de la muestra, disponibilidad, solubilidad, pureza y estabilidad del analito. Como se describió en la introducción la TRG y el ácido nicotínico tienen la característica de ser altamente polares, por lo que para llevar a cabo el desarrollo del procedimiento analítico se evaluó la factibilidad del uso de cromatografía de líquidos de fase inversa, utilizando el reactivo NFPA como formador de pares iónicos. Para el desarrollo del procedimiento se evaluaron para la parte del método cromatográfico: 1) componentes de fase móvil, 2) pH y 3) concentración de NFPA. Para la preparación de muestra se consideraron dos aspectos importantes: 1) el método de extracción de los analitos y 2) uso de extracción en fase sólida (SPE) para limpieza de muestra.

4.1. Selección y preparación de fase móvil para la determinación de trigonelina y ácido nicotínico.

Para el desarrollo del método cromatográfico se comenzó con el estudio sistemático de la composición de la fase móvil, los factores que se evaluaron fueron composición de buffer, pH y concentración de NFPA. El primer experimento que se realizó fue la selección del buffer y el pH de trabajo. Para lo cual, se estudiaron dos soluciones, la primera formada por Ácido Fórmico/ Hidróxido de Amonio y la segunda que contenía Ácido Acético/ Hidróxido de Amonio, ambas soluciones se seleccionaron en función de: compatibilidad con el sistema LC-IT/MS (para su posterior uso), el rango de pH de trabajo de la columna y señal analítica a la longitud de 263nm a la cual se monitorea la presencia de los dos analitos. Para la realización de esta prueba se utilizaron los estándares TRG

y AN a una concentración de 5.0 mg L^{-1} , el rango de pH evaluado fue de 3 a 5, la concentración final de NFPA para todas las condiciones evaluadas fue de 5 mM ; en total se probaron 20 condiciones (10 para cada compuesto). Se adquirió el espectro en el rango de 240 a 310 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura (9).

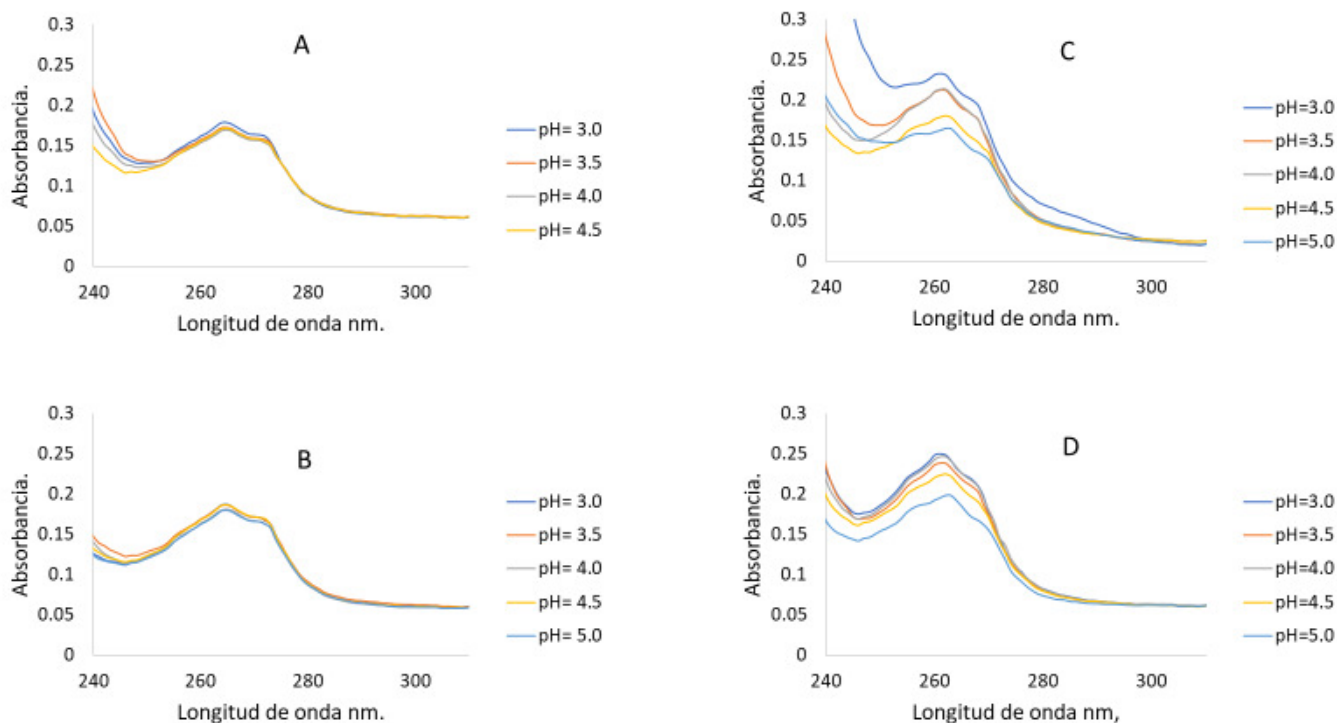


Figura 9. Espectros de absorción adquiridos para cada condición de pH. (A) Buffer Ácido Fórmico/ Amoniac-Trigonelina, (B) Buffer Ácido Acético/Amoniac-Trigonelina, (C) Buffer Acido Fórmico/Amoniac- Ácido Nicotínico, (D) Buffer Ácido Acético/Amoniac-Ácido Nicotínico.

A partir de estos resultados presentados en la figura anterior (Figura (9)), se seleccionó para la preparación de la fase móvil la mezcla formada por ácido fórmico/ hidróxido de amonio a pH de 4, considerando como criterios para esta selección el aumento en la absorbancia a la longitud de onda de 263 nm y el menor ruido de la línea base. Posteriormente se evaluó la concentración del reactivo formador de pares iónicos (NFPA), en función del aumento en los tiempos de retención y resolución de las señales de cada analito. Para esta prueba se utilizaron los parámetros instrumentales que se presentan en la (Tabla (6)), se inyectó una solución mezcla de estándares de TRG y AN a 5 mg L^{-1} . El programa de elución fue isocrático, tal como se muestra en la Tabla 6, para

esta prueba se utilizó una solución de NFPA a una concentración de 20 mM, a partir de esta solución y con ayuda del programa del cromatógrafo se ajustó la cantidad de modificador de pares iónicos para que durante toda la corrida cromatográfica la concentración en columna se mantuviera constante en las concentraciones de 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10 y 15 mM.

Tabla 6. Parámetros de Trabajo HPLC-DAD a cada concentración de NFPA.

Concentración de NFPA (mM)	Porcentajes de elución
1	A 80% (0-4.0), C 5% (0-9.5), D 15% (0-4.0), D 2% (5-9.5)
2	A 75% (0-4.0), C 10% (0-9.5), D 15% (0-4.0), D 2% (5-9.5)
3	A 70% (0-4.0), C 15% (0-9.5), D 15% (0-4.0), D 2% (5-9.5)
5	A 60% (0-4.0), C 25% (0-9.5), D 15% (0-4.0), D 2% (5-9.5)
10	A 35% (0-4.0), C 50% (0-9.5), D 15% (0-4.0), D 2% (5-9.5)
15	A 10% (0-4.0), C 75% (0-9.5), D 15% (0-4.0), D 2% (5-9.5)

En los resultados obtenidos (Tabla 7 y en la Figura 10), se observa en primer lugar que los tiempos de retención mayores se obtuvieron para las concentraciones de 10 y 15 mM de NFPA. En cuanto a la resolución, para la concentración de 5mM fue en donde mejor se resolvieron las señales cromatográficas.

Tabla 7. Concentraciones de formador de pares iónicos, así como cambio en tiempo de retención.

Concentraciones NFPA (mM)	Tiempo retención TRG	Área TRG	Altura TRG	S/N	Tiempo de retención AN	Área AN	Altura AN	S/N	Resolución.
1	2.21	16.7	4	0.4	2.05	19.9	5	0.7	2.3
2	2.27	26.5	3.6	0.8	2.66	23.8	3.7	0.5	4.6
3	2.85	24.2	3.3	0.6	3.52	34.7	4.2	0.7	6.2
5	2.88	24.4	3.5	0.5	3.57	35.1	4.4	0.8	6.8
10	3.8	56.7	4.6	0.4	4.64	93.7	10.9	1.5	5.4
15	3.84	80.1	10.1	0.4	4.39	119.8	16.2	0.9	5.3

Respecto a los valores de área y altura de las señales cromatográficas de los dos analitos a las diferentes concentraciones de formador de pares iónicos, los valores máximos se obtuvieron a la concentración de 15 mM, sin embargo, en cuanto a la relación señal/ruido

(S/N) los valores más altos se registraron en la concentración de 10 mM, para ambos compuestos.

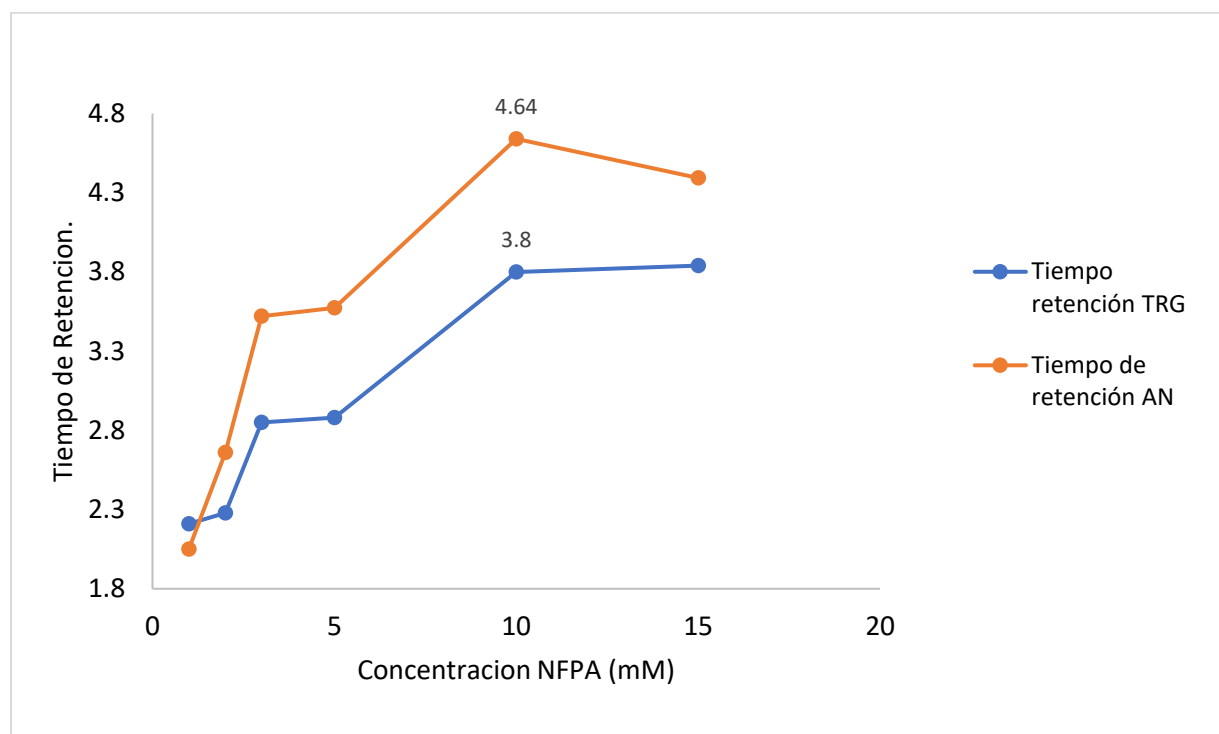


Figura 10. Tiempo de retención en función de concentración del formador de pares iónicos en mezcla de trigonelina y ácido nicotínico 10 mg/L.

Considerando, los resultados arriba descritos se decidió seleccionar la concentración de 10 mM de NFPA para realizar los análisis posteriores. En la Figuras 11 se presenta como ejemplo el cromatograma obtenido de la mezcla de estándares de AN y TRG a 5 mg L⁻¹, con la concentración en columna de NFPA de 10mM.

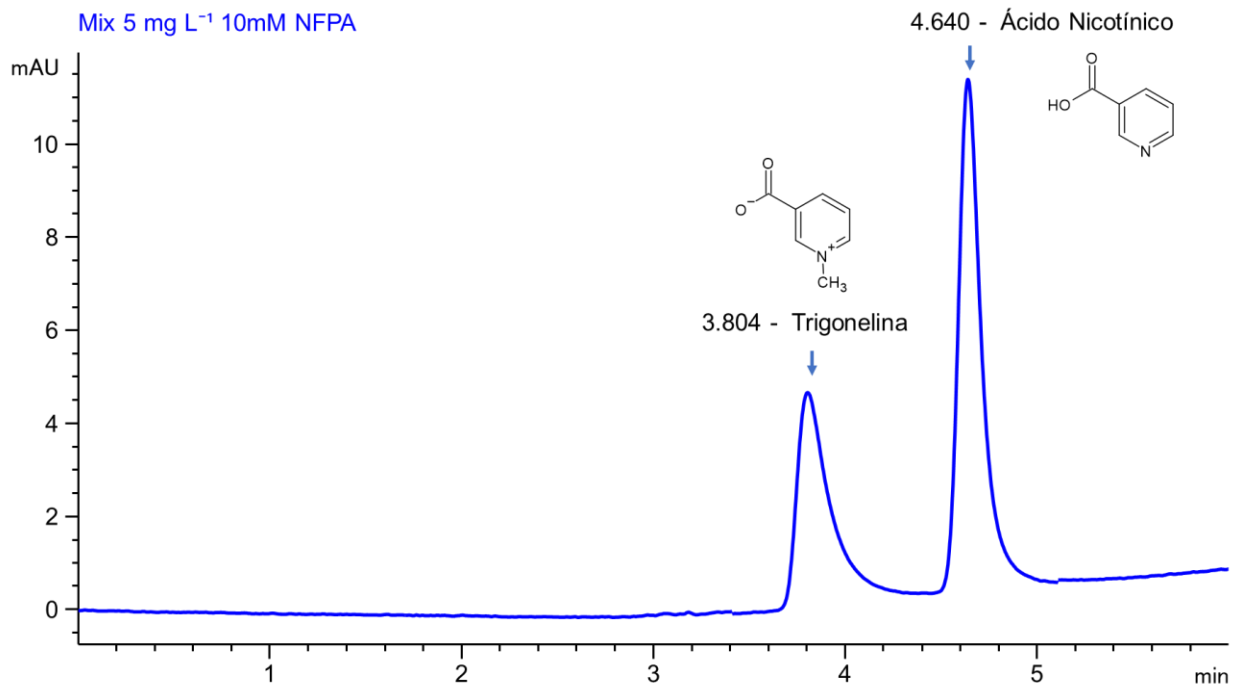


Figura 11. Cromatograma correspondiente al mix de 5mg/L en una concentración de NFPA 10mM en la columna.

A partir de este cromatograma se extrajeron los espectros de absorción de cada una de las señales cromatográficas correspondientes a AN y TRG (Figura 12 B y D). Para cada señal se obtuvo la pureza de pico (Figura 12 A y B), obteniendo una buena relación para ambos compuestos.

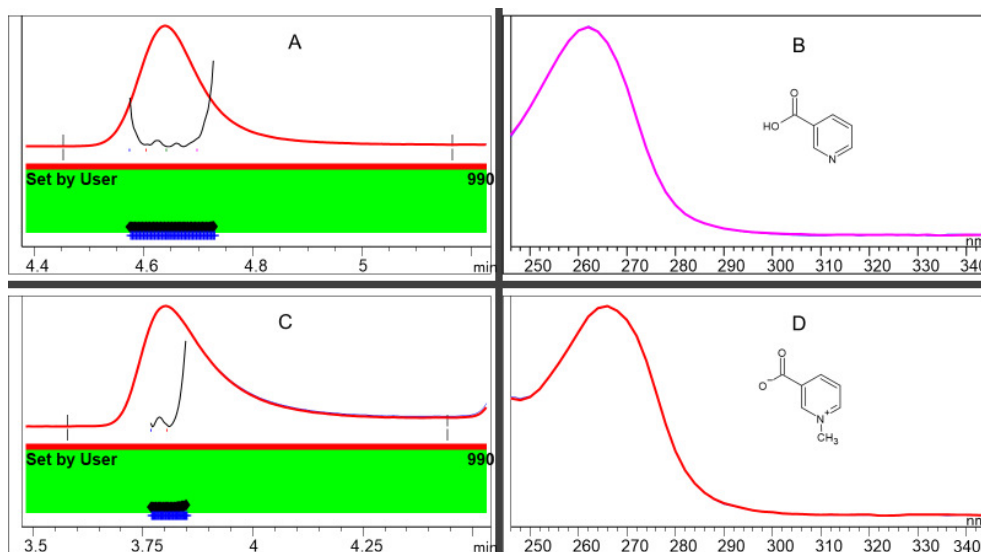


Figura 12. Radio de pureza para los picos cromatográficos correspondientes a la mezcla de estándares TRG y AN con 10mM de formador de pares iónicos. (A) Radio de Pureza para AN, (B) Espectros de absorción para los máximos del pico cromatográfico para AN, (C) Radio de Pureza para TRG, (D) Espectros de absorción para los máximos del pico cromatográfico para TRG.

Las condiciones cromatográficas finales, seleccionadas a partir de los resultados anteriormente descritos se presentan en la Tabla (8).

Tabla 8. Parámetros finales de Trabajo.

Columna	Phenomenex C18 Hypersil 250x4.6mm, 5u.
Temperatura Columna	40 °C.
Presión	140 bar.
Inyección	1 µL.
Flujo	1.0 mL/min.
Fase Móvil	A (H ₂ O), C (NFPA 20mM, pH=4, buffer ácido fórmico 0.05 M/ hidróxido de amonio 0.1 M), D (Metanol)
Longitud de Onda	Señal. 263.0 nm, 8 y Ref. 300 nm, 16.
Gradiente	Isocrático C 50% (0-9.5), D 15% (0-4.0), D 2% (5-9.5)
Tiempo.	6 min y post run 3.5 min.

Con estas condiciones se realizó el proceso de calibración para obtener función de calibración y calcular los límites de detección y cuantificación.

4.2 Calibración

Una vez seleccionadas las condiciones cromatográficas, se llevó a cabo el proceso de calibración externa, para lo cual se prepararon 6 soluciones de calibración las cuales contenían ambos compuestos TRG y AN; las concentraciones de cada nivel de calibración fueron 0.5, 1.0, 5.0, 10, 25 y 50 mg L⁻¹. Los cromatogramas obtenidos de todas las soluciones de calibración se presentan en la Figura 13. A partir, de estos cromatogramas se obtuvieron las funciones de calibración para cada compuesto además de calcular los respectivos límites de detección (LD) y cuantificación (LC) (Tabla 9).

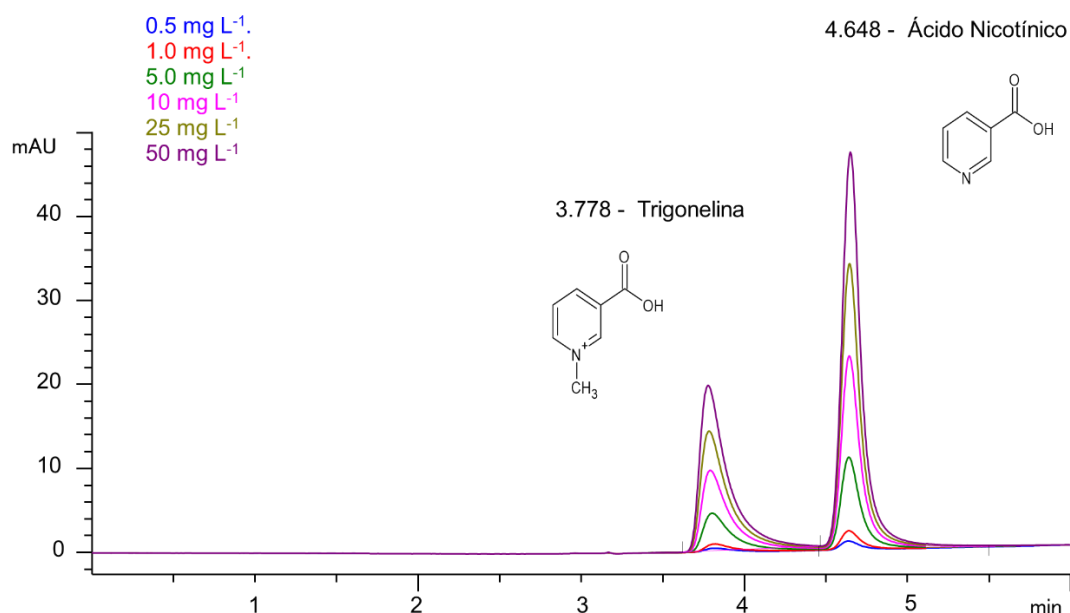


Figura 13. Cromatogramas de soluciones de calibración de 0.5 a 50 mg L⁻¹

Para el proceso de calibración se tomó la altura de los picos cromatográficos como señal analítica. La función de calibración se obtuvo mediante el método de regresión lineal, el cual genera un valor de coeficiente de regresión (R^2) que es una medida de grado de linealidad (calidad) en el ajuste de la función respecto a los datos experimentales. Un ajuste perfecto está dado por un valor de R^2 de 1; de acuerdo con lo recomendado por la EPA para los procedimientos cromatográficos cuantitativos R^2 debe ser mayor o igual a 0.99 (REF). En la Figura 14 se presentan las curvas de calibración obtenidas en el

Software Chemstation para cada compuesto. Los parámetros evaluados del proceso de calibración se presentan en la Tabla 9.

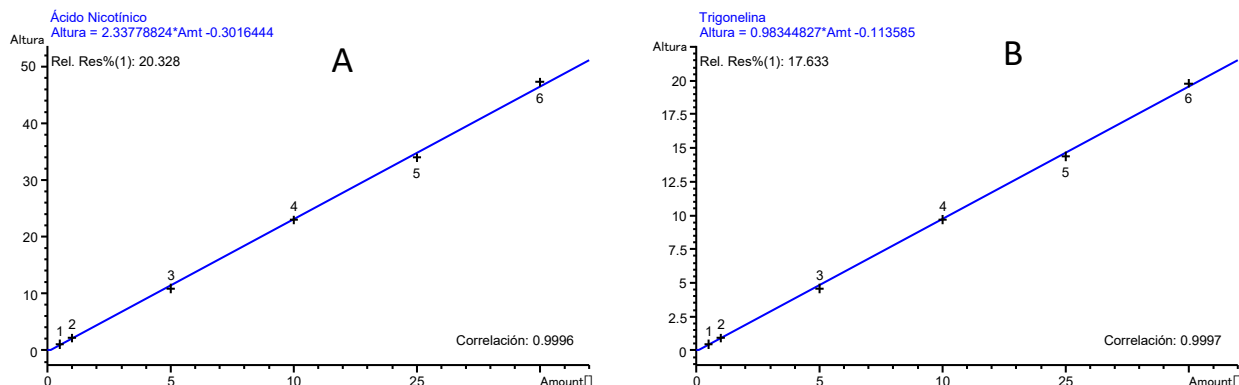


Figura 14. Curvas de calibración de calibración de TRG y AN utilizando la altura de las señales cromatográficas, utilizando el Software ChemStation: A) Ácido nicotínico, B) Trigonelina.

A partir de las curvas de calibración se evaluaron los parámetros analíticos que se presentan en la Tabla 9. En donde se incluyen los valores de error estándar de la pendiente y del intercepto que confirman un buen ajuste por el método de regresión lineal. Otro parámetro calculado fue el Límite de detección (LD) el cual se define como la mínima cantidad o concentración del analito en una muestra que puede ser detectada de manera confiable con el método. Cabe señalar que esta definición no es totalmente rigurosa por que el significado confiable no es claro. En el caso de cromatografía, el límite de detección es la cantidad inyectada que resulta en un pico con una altura al menos dos o tres veces mayor al ruido de la línea base⁵³. El límite de detección se expresa como:

$$LD = \frac{3.3\sigma}{m}$$

En esta ecuación, σ corresponde a la desviación estándar de la respuesta instrumental en ausencia del analito. Dependiendo del modo de adquisición de la señal, hay dos maneras de calcular σ :

1. Desviación estándar del blanco: se determina por la medida de la magnitud de la respuesta de un número apropiado de muestras blanco (10) y calculando la desviación estándar de las respuestas.
2. Desviación estándar de la línea base en la región de elución del pico del analito, siendo este el más utilizado en procedimientos cromatográficos.

Por su parte el valor de m en la ecuación se refiere a la pendiente de la función de calibración lineal, que relaciona la respuesta del instrumento con la concentración del analito, este valor también puede ser evaluado de maneras diferentes:

1. Utilizando todos los estándares de calibración para el cálculo de función de regresión lineal de la curva de calibración.
2. Utilizando solamente estándares a baja concentración.
3. Utilizando un solo punto de calibración. En este caso se calcula el factor de respuesta para el más bajo estándar de calibración cuya respuesta es cercana al límite de cuantificación.

Por otro lado, el límite de cuantificación (LC) de un procedimiento analítico se define como la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser determinado cuantitativamente con una adecuada precisión y exactitud, y es también límite bajo del intervalo de linealidad de procedimiento y es recomendado como el más bajo estándar de calibración. Este parámetro se calcula con la ecuación:

$$LC = \frac{10\sigma}{m}$$

Donde σ es la desviación estándar de la respuesta en ausencia del analito y m es la pendiente, ambos obtenidos como se describió para el LD⁵³.

Ambos parámetros, LD y LC deben ser calculados para el proceso de calibración y también en condiciones de análisis de muestras reales. En el primero de los casos, los valores se presentan como masa o concentración del analito introducida directamente al instrumento (si se trata de procedimiento cromatográfico "on column", es decir inyectado en columna). En el segundo caso, los límites se expresan como la masa o concentración del analito en la muestra (en el caso de biomasa derivada de plantas, microgramos de

analito por kilogramo de muestra problema). Para evaluar el LD y LC del procedimiento el proceso de calibración debe llevarse a cabo en presencia de la matriz de la muestra siguiendo el mismo tratamiento que se emplea para las muestras reales. En la práctica se realiza la curva de calibración agregando los estándares a la muestra que no contiene analito o, si esto no es posible, utilizando la muestra diluida para que su contenido del analito sea despreciable (REF).

Los valores de LD y LC evaluados en este trabajo se presentan en la Tabla 9, cabe señalar que los límites de detección reportados para TRG en otros métodos que utilizaron HPLC-DAD se encuentran en el intervalo de 0.015 – 1.51 mg L⁻¹ y los LC entre 0.05 – 4.58 mg L⁻¹ ^{30,37,39}. Los valores de LD y LC calculados en este trabajo fueron para TRG de 0.05 y 0.16 mg L⁻¹ respectivamente, mientras que para AN fueron de 0.11 y 0.36 mg L⁻¹.

Tabla 9. Parámetros típicos evaluados para la determinación de TRG y AN mediante HPLC-DAD.

Parámetros	Valor	
	Trigonelina	Ácido Nicotínico
Rango de Calibración mg L ⁻¹	0; 0.5; 1; 5; 10; 25; 50	0; 0.5; 1; 5; 10; 25; 51
Función de regresión Lineal	y=0.9834*x-0.1135	y=2.3377*x-0.3016
Error estándar de la pendiente	0.003	0.012
Error estándar del intercepto	0.1135	0.3016
R ²	0.9997	0.9996
LD calibración mg L ⁻¹	0.05	0.11
LC calibración mg L ⁻¹	0.2	0.36

Por otro lado, la precisión se relaciona con el error aleatorio cometido en el análisis repetitivo de la misma muestra y este parámetro describe la dispersión de los valores individuales respecto al valor promedio, se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa. Para caracterizar los alcances de un procedimiento analítico, la precisión es calculada en tres diferentes aspectos:

1. Repetibilidad. Llamada también precisión a corto plazo o intra-ensayo, se evalúa con base en repeticiones realizadas en un corto intervalo de tiempo, las mismas condiciones de operación y por un solo analista, con un mismo equipo y en el mismo laboratorio.
2. Precisión intermedia: se expresa como la precisión dentro del laboratorio refiriéndose a un análisis practicado en diferentes días, con diferentes analistas y distintos equipos.
3. Reproducibilidad: se expresa como la precisión entre laboratorios (colaboraciones entre laboratorios usualmente aplicados a la estandarización de una metodología⁵³.

Para nuestro interés, se realizaron pruebas de repetibilidad del método utilizando una solución estándar de TRG y AN, ambos a una concentración de 5.0 mg L⁻¹ y realizando 6 repeticiones bajo las mismas condiciones analíticas. Los resultados de precisión son expresados en desviación estándar relativa (Tabla 10)

Tabla 10. Resultado de repetibilidad del tiempo de retención y del área y altura de las señales analíticas para 5 inyecciones de TRG y AN 5 mg L⁻¹

Repetición	Tiempo de retención (min), TRG	Tiempo de retención (min), AN	Área TRG	Altura TRG	Área AN	Altura AN
1	3.82	4.63	56.7	4.6	93.7	10.9
2	3.82	4.63	53.4	4.4	95.2	11.3
3	3.8	4.64	57.1	4.2	95.1	10.7
4	3.79	4.64	55.2	4.7	98.6	11.1
5	3.78	4.64	56.1	4.7	99.1	10.6
Promedio	3.80	4.64	55.7	4.52	96.3	10.9
DE	0.02	0.01	1.47	0.22	2.37	0.29
% DER	0.47	0.12	2.64	4.80	2.46	2.62

De acuerdo con los resultados obtenidos, el valor de DER en este trabajo es menor el 5%, lo cual indica una buena repetibilidad de las áreas y alturas de las señales cromatográficas atribuidas a TRG y AN. Para el caso de los tiempos de retención los valores de DER son menores al 1 % lo que indica que casi no hay movilidad de los TR de los analitos entre corridas.

4.3. Selección de estándar interno

Para el desarrollo del procedimiento analítico se consideró el uso de un estándar interno para la corrección de errores durante el proceso de preparación de muestra. De acuerdo con la bibliografía, los principales compuestos reportados como estándares internos para la determinación de TRG y derivados, son los que se presentan en la Figura (15). Sin embargo, debido a los costos, requerimientos legales y disponibilidad para su adquisición, es que el uso de estos estándares internos reportados fue descartado.

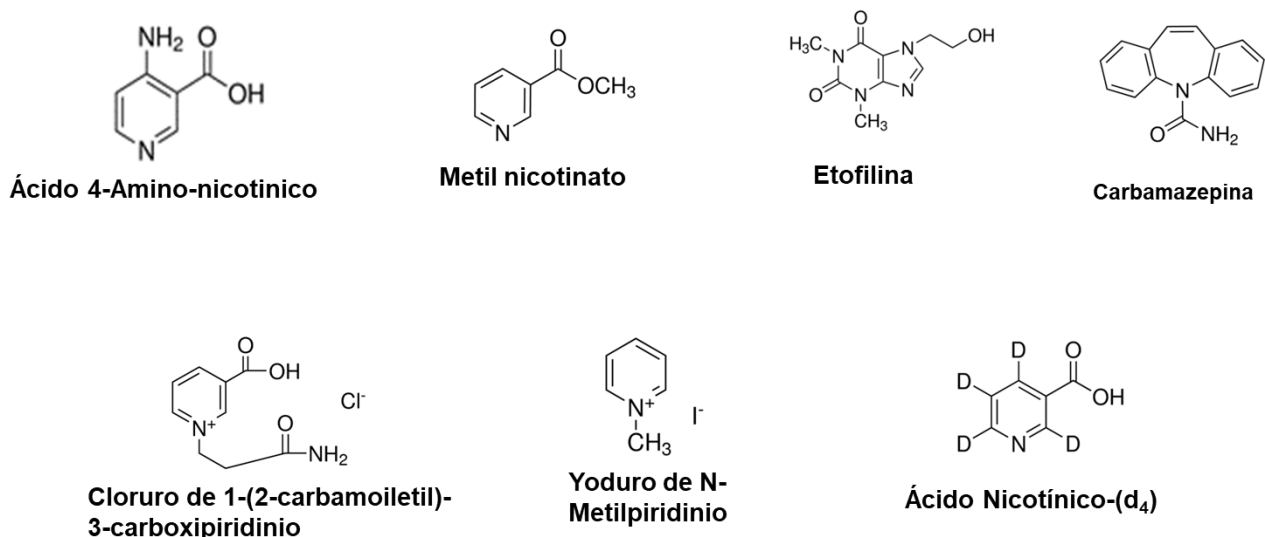


Figura 15. Figura de estándares internos reportados y propuestos^{41,44}.

Por otro lado, fueron proporcionados por un grupo de investigación de síntesis orgánica de la Universidad de Guanajuato, algunos compuestos derivados de con base de pirazol, para su evaluación como posibles estándares internos. Los compuestos proporcionados por el fueron 5 mostrados en la Figura (16), compuestos alcalinos

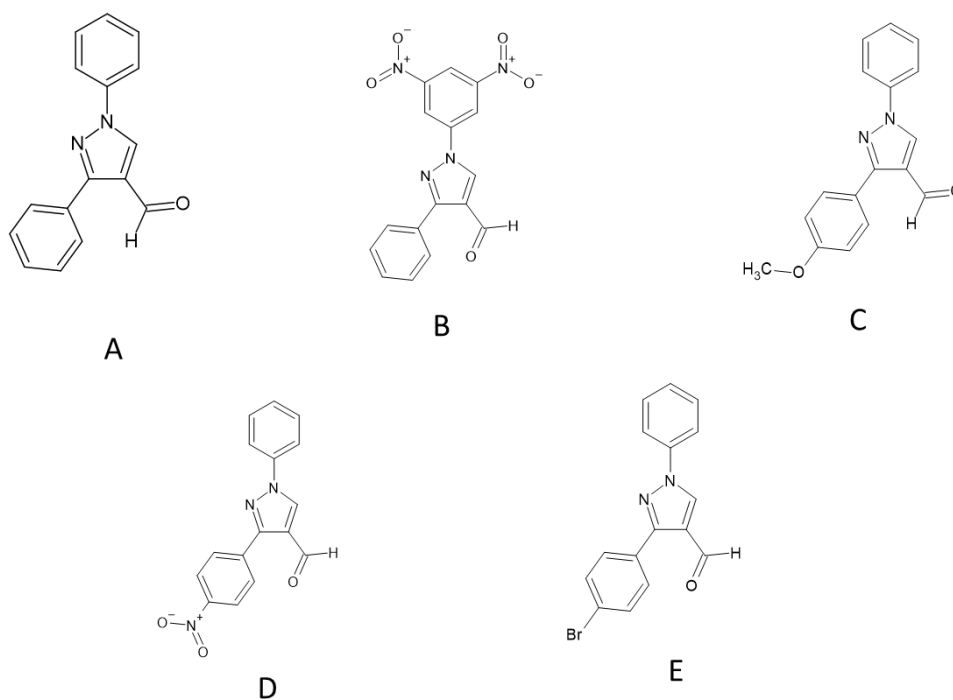
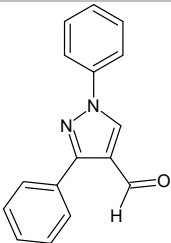
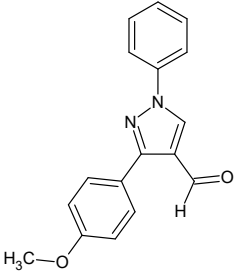


Figura 16. Compuestos alcalinos posibles estándares internos.

Se comenzó probando la solubilidad de los compuestos en la fase móvil descartándose aquellos que no fueran solubles, posteriormente se procedió a adquirir el espectro de absorción en la región UV/Vis de cada uno de los compuestos solubles buscando que presentaran máximos de absorción cercanos a la longitud de onda de 263 nm (Tabla (11), Figura (17)), con estas características solo quedaron 2 posibles candidatos el compuesto A y el C.

Tabla 11. Compuestos de estándar interno con los máximos de absorbanza.

Compuesto	Longitud de onda (nm)	Estructura
A) 1,3-diphenyl-1H-pyrazole-4-carbaldehyde	245	
C) 3-(4-methoxyphenyl)-1-phenyl-1H-pyrazole-4-carbaldehyde	257	

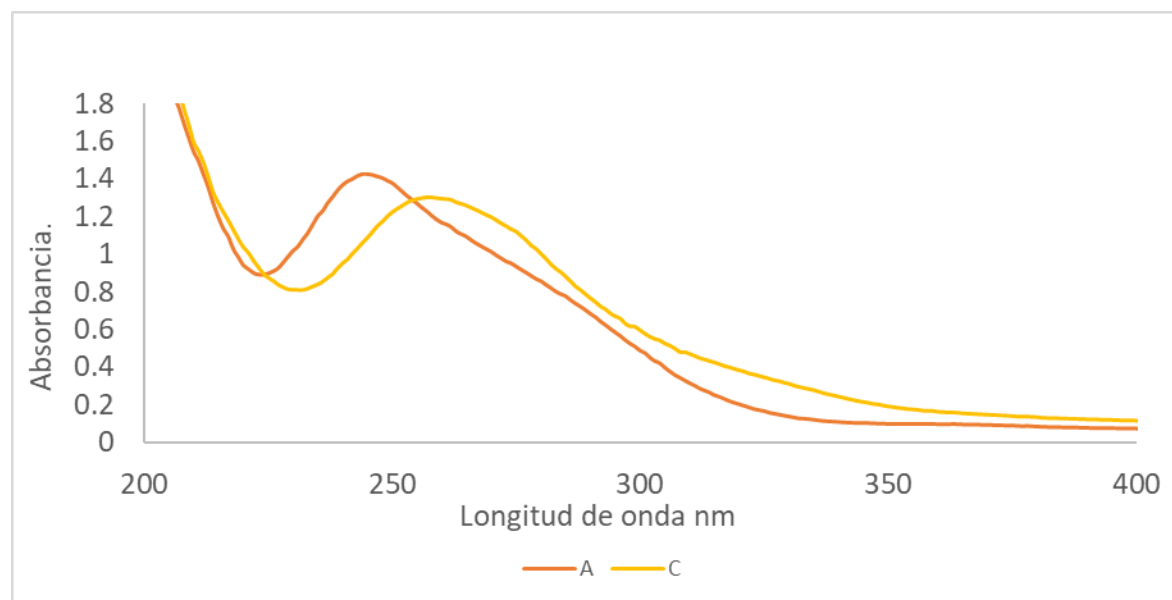


Figura 17. Espectro de absorción adquiridos de los compuestos A y C.

El compuesto C fue seleccionado para inyectarse en el sistema HPLC-DAD, sin embargo, a lo largo de la corrida cromatográfica no fue detectado, por tal motivo para este compuesto también se descartó su uso como estándar interno, dejando la búsqueda y selección de ISTD como prospectiva para trabajo futuro.

Una vez establecidas las condiciones de separación cromatográfica y obtenidos los típicos parámetros analíticos (Tabla 11), se comenzó a poner a punto el procedimiento de tratamiento de muestra.

4.4. Preparación de muestras

De acuerdo con la bibliografía (Capítulo (1) sección 2.1) en los principales protocolos de extracción de trigonelina y sus derivados se describe el uso de soluciones de óxido de magnesio, metanol a diferentes porcentajes (desde el 5 hasta el 60%) y compuestos cuaternarios de amonio, principalmente. Para la limpieza de la muestra se ha reportado el uso de cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) y en trabajos recientes se ha descrito un procedimiento utilizando sistemas QuEChERS^{7,30,31,37}.

En este trabajo para la adaptación del procedimiento de extracción y considerando la complejidad de la muestra y los reportes de la presencia de TRG y AN, se optó por utilizar muestras de café molido con diferentes procesos de tostado. El diseño de experimento se basó principalmente en el estudio de: 1) solvente de extracción (agua y metanol al 5, 10 y 15 %) y 2) la temperatura (40, 60 y 100 °C). Para la limpieza se muestra después de la extracción se propuso el uso de cartuchos SPE C-18 de marca Strata C-18-T de 200 mg, área superficial de $307 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, tamaño de poro de 143 \AA y volumen de poro de 1.1 mL g^{-1} , este cartucho ofrece una gran selectividad hidrofóbica y es compatible con moléculas apolares. El total de condiciones evaluadas fue de 24 las cuales se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Diseño de experimentos para muestras de café.

No.	Temperatura	Solvente	No.	Temperatura	Solvente
1	40	agua	13	40	agua
2	40	MeOH 5%	14	40	MeOH 5%
3	40	MeOH 10%	15	40	MeOH 10%
4	40	MeOH 15%	16	40	MeOH 15%
5	60	agua	17	60	agua
6	60	MeOH 5%	18	60	MeOH 5%
7	60	MeOH 10%	19	60	MeOH 10%
8	60	MeOH 15%	20	60	MeOH 15%
9	100	agua	21	100	agua
10	100	MeOH 5%	22	100	MeOH 5%
11	100	MeOH 10%	23	100	MeOH 10%
12	100	MeOH 15%	24	100	MeOH 15%

El proceso de extracción general (Ilustración 2), se llevó a cabo utilizando de 1g de muestra de café, el volumen del solvente de extracción fue de 10 mL, las muestras fueron sonicadas por 40 min a las diferentes temperaturas (40-100°C), posteriormente se centrifugaron a 5000 g por 1 h y se recuperó el sobrenadante. Después se llevó a cabo la limpieza de la muestra, la cual constó de dos pasos consecutivos: 1) desengrasado con cloroformo y 2) limpieza con el cartucho SPE. Una vez que las muestras fueron pasadas por SPE se centrifugaron a 10000g por 20 min, para su inyección al sistema HPLC-DAD.

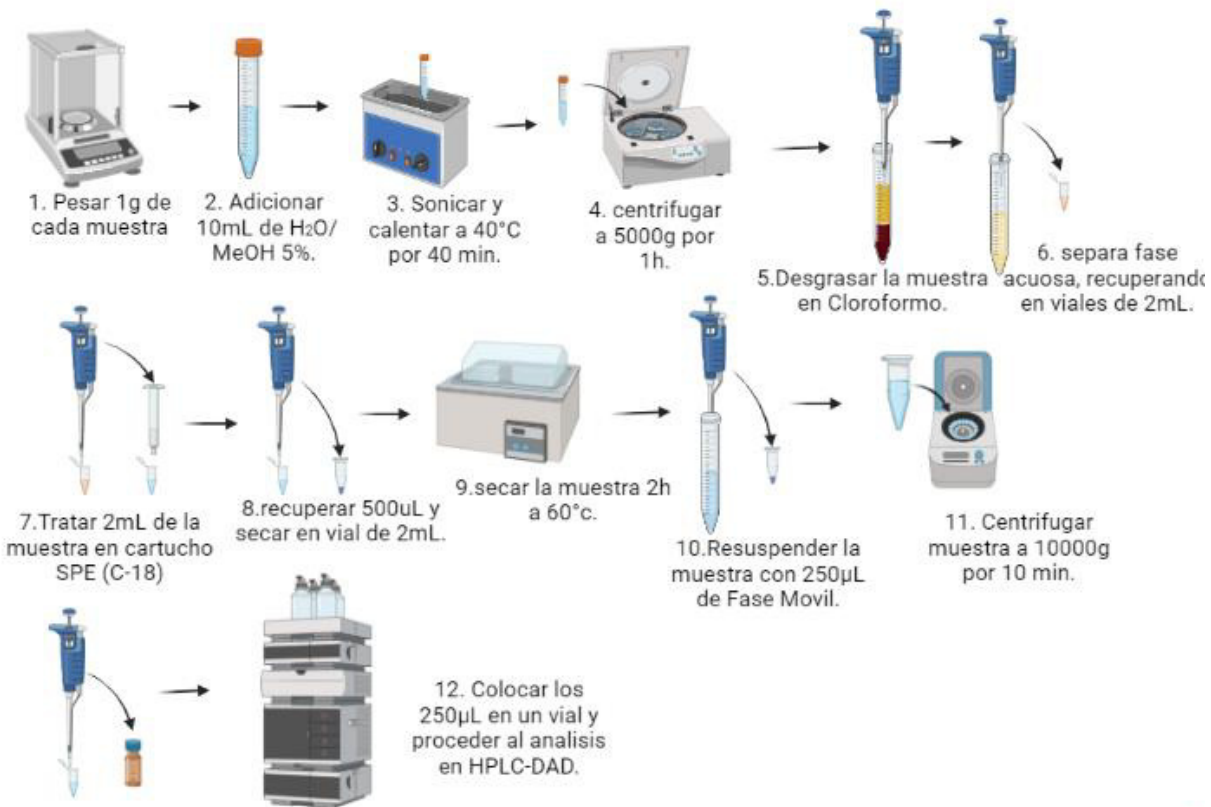


Ilustración 2. Diagrama de procedimiento de tratamiento de muestra.

Para la selección de las condiciones finales de tratamiento de muestra el orden de la evaluación de las condiciones fue el siguiente: 1) selección del medio de extracción, 2) selección de temperatura de extracción y 3) selección del tipo de cartucho SPE.

4.4.1. Evaluación del medio de extracción

Para esta primera parte se evaluaron 4 condiciones de extracción: 1) H₂O, 2) Metanol 5%, 3) Metanol 10 % y 4) Metanol 15%. El tiempo y temperatura de extracción se fijaron a 40 minutos en sonicación a 40 °C. En la figura (18) se muestran los cromatogramas obtenidos de los diferentes medios de extracción.

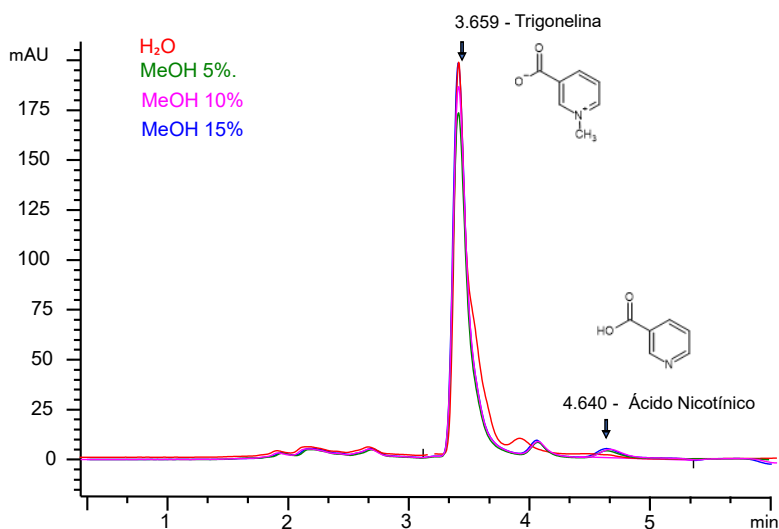


Figura 18. Cromatogramas sobrepuestos de las muestras extraídas con diferentes porcentajes de metanol.

Como se puede observar no hay una diferencia muy grande en la intensidad de las señales entre los diferentes medios de extracción. Utilizando la herramienta del Software ChemStation para evaluar la pureza de los picos cromatográficos correspondientes a los analitos de interés, se obtuvieron los espectros de absorción en diferentes puntos de la señal cromatográfica. Los espectros obtenidos para TRG y AN en las diferentes condiciones de extracción probadas se presenta a continuación (Figura (19)).

De acuerdo con la Figura (19), las condiciones de 10 y 15% de metanol presentan variación en los espectros de absorción obtenidos para las señales atribuidas a TRG y AN, lo que indica una disminución de la pureza de la señal y la posible presencia de interferentes que coeluyen con los compuestos de interés. Por otro lado, para el caso de

la condición de extracción donde solo se utilizó agua desionizada, aparentemente la extracción del AN no fue buena comparado con las condiciones con metanol.

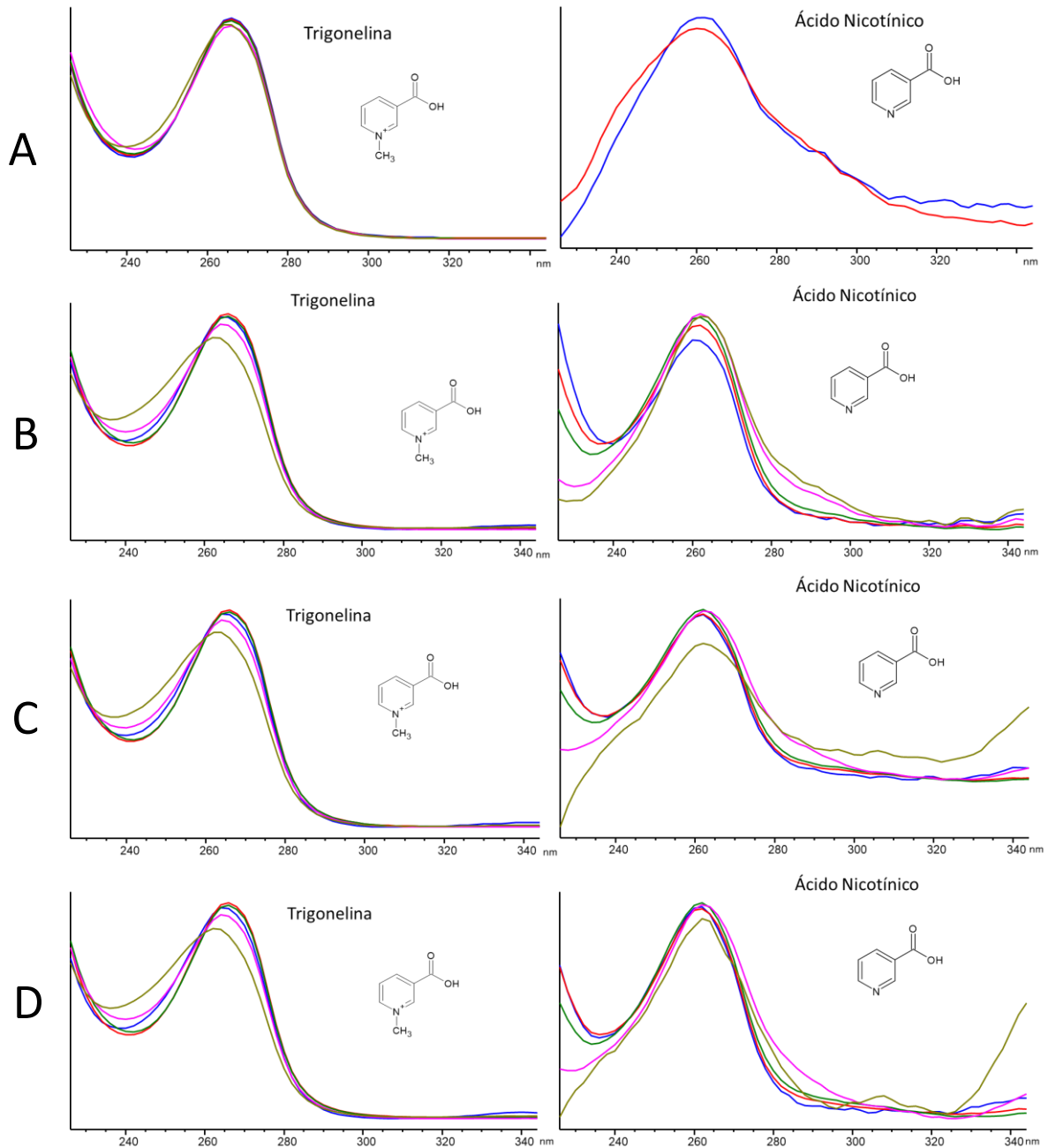


Figura 19. Espectros obtenidos de diferentes puntos de las señales cromatográficas atribuidos a TRG y AN. A) H₂O, B) MeOH 5%, C) MeOH 10% y D) MeOH 15%.

Por tal motivo es que, se seleccionó la condición de 5% de metanol ya que no se presentan cambios en los espectros adquiridos de las señales cromatográficas, además de que pareciera la extracción de los analitos es mejor que solo con H₂O.

4.4.2 Evaluación de Temperatura

Una vez seleccionado el medio de extracción se procedió a evaluar diferentes temperaturas, el rango reportado en la bibliografía para la extracción de TRG es de 40-100°C^{7,13,33,34}. Para este trabajo se seleccionaron tres temperaturas 40, 60 y 100 °C. El tiempo de extracción, cantidad de muestra y volumen de extracción no fue modificado respecto al procedimiento de la prueba anterior para estas pruebas (40 min en baño de ultrasonido, 1g de muestra y 10 ml volumen de extracción MeOH al 5%). Sin embargo, se añadió un paso de preconcentración, una vez recuperado el sobrenadante del extracto, se tomaron 500µl los cuales fueron evaporados a seco utilizando el equipo SpeedVac a 60°C durante 2 horas; posteriormente la muestra fue reconstituida con 250µL de la fase móvil (MeOH 5% con NFPA a 10mM, buffer de ácido fórmico/ hidróxido de amonio) para después ser inyectada al HPLC.

Tabla 13. Evaluación del contenido de TRG y AN en muestra de café a diferentes temperaturas

T, °C	TRG mg g⁻¹	AN mg g⁻¹
40	18.2 ± 0.35	3.91 ± 0.03
60	16.9 ± 0.47	4.05 ± 0.06
100	14.5 ± 0.41	3.95 ± 0.08

Los resultados obtenidos (Tabla (13)), muestran que para el caso de TRG la mejor condición es cuando la extracción se lleva a cabo a 40 °C, mientras que para AN no hay diferencias entre las temperaturas. Por lo anterior, aunado a la facilidad de control de la temperatura, se seleccionó 40°C como condición de trabajo.

Una vez establecidas las condiciones de extracción, se decidió evaluar el uso de cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) para la limpieza de la muestra previo a la

inyección al equipo. Esto con el fin de eliminar posibles interferentes que pudieran estar coeluyendo con nuestros compuestos.

4.4.3. Evaluación de Cartucho de extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica diseñada para la preparación y la purificación rápidas y selectivas de la muestra antes del análisis cromatográfico. La gran cantidad de productos químicos de fase que existen pueden cargarse en una variedad de formatos, como cartuchos individuales, placas de 96 pocillos y tubos QuEChERS (SPE dispersiva). El uso de técnicas SPE tiene diferentes fines en los cuales se pueden mencionar la extracción de analitos de la matriz, eliminar interferentes, concentrar los analitos, transformar los analitos a especies más compatibles con el tipo de sistema cromatográfico, así como el extender la duración del sistema cromatográfico⁵⁴. La (Tabla (14)), muestra diferentes usos de SPE en la bibliografía.

Tabla 14. Usos de SPE reportados en la bibliografía para TRG y AN.

Muestras	Analito	Cartucho	Característica	REF
Lycium frutos	Trigonelina	SPE de óxido de aluminio	Columna de óxido de aluminio (forma OH ⁻ , un tubo de vidrio de 10 a 12 mm de diámetro interno y 20 cm de longitud	30
Grano de Café verde	Trigonelina, cafeína y ácido clorogénico.	QuEChERS	Extracción con 4 ml de acetonitrilo. Luego, se le agregaron 0.5 g de NaCl y 1.0 g de MgSO ₄ anhidro.	37
Plasma sanguíneo	Ácido Nicotínico	Cartucho SPE de intercambio iónico	Cartucho Strata-X-C 33µm de polímero de modo mixto de cationes de 96 pocillos.	55

Para este trabajo, se propuso evaluar el uso de dos tipos de cartuchos SPE 1) C-18 y 2) HLB. Los cartuchos C-18 constan de una base de sílice lo que le dota de propiedades hidrofóbicas, es decir, interactúa con moléculas con cadenas de carbono y cartucho HLB

que es formada por una plataforma de partículas de polímero de estireno modificadas con carácter hidrofílico lo que le dota de una gran versatilidad ante compuestos polares y no polares.

Los cartuchos utilizados fueron: C-18 marca Strata C-18-T de 200 mg, área superficial de $307 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, tamaño de poro de 143 \AA y volumen de poro de 1.1 mL g^{-1} ; y HLB marca Supel- Select HLB Resin de 200 mg, área superficial $210 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, tamaño de poro de 183 \AA y volumen de poro de 1.0 mL g^{-1} . Las pruebas se realizaron con las condiciones de extracción anteriormente descrita. El procedimiento realizado para el cartucho de C-18 fue un preparación previa con metanol al 80% y posteriormente la elución de 2 mL de la muestra, al concluir la elución de la muestra, un lavado del cartucho 3 veces con metanol al 80%; para el caso del cartucho de HLB el proceso de tratamiento fue más complejo constando de, un pre-acondicionamiento del cartucho con 20 mL de fase móvil dejando que esta circulara por el cartucho por gravedad, posterior el paso de 2 mL de la muestra y recuperación del residuo por 3 veces posteriormente el secado del residuo y reconstitución de este con la elución de los analitos contenidos en la resina del cartucho con MeOH al 80% y finalmente el lavado del cartucho con 2 mL de MeOH 3 veces como lo muestra la ilustración (3).

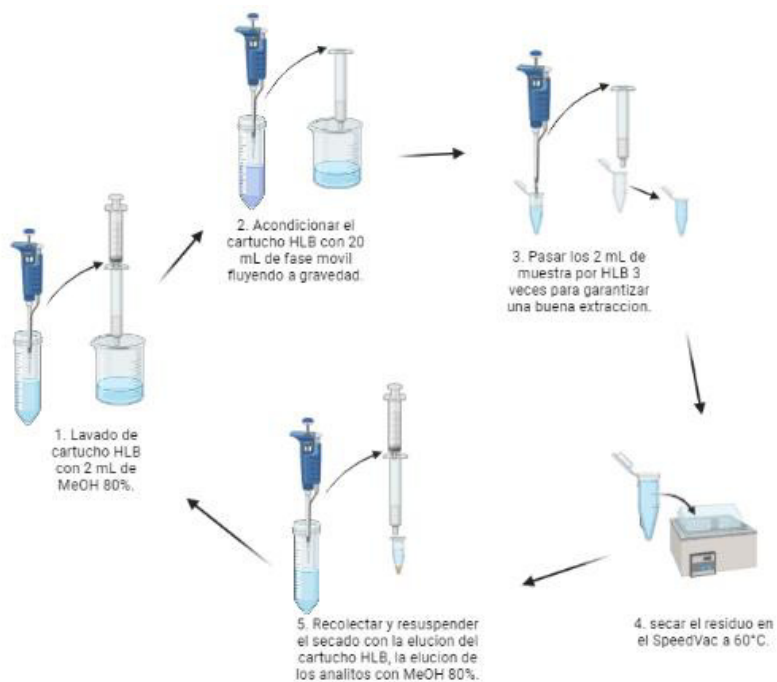


Ilustración 3. Diagrama de tratamiento de muestra con cartucho HLB.

En la Figura (20) se presentan los cromatogramas de las muestras tratadas con los cartuchos C-18 y HLB. Aquí se observa una marcada diferencia tanto en el perfil de señales como en la intensidad de los picos cromatográficos correspondientes a nuestros

compuestos. Para el caso de la muestra pasada a través del cartucho C18 se observa una mayor cantidad de señales en el cromatograma y una mayor intensidad en los picos correspondientes atribuidos a TRG y AN.

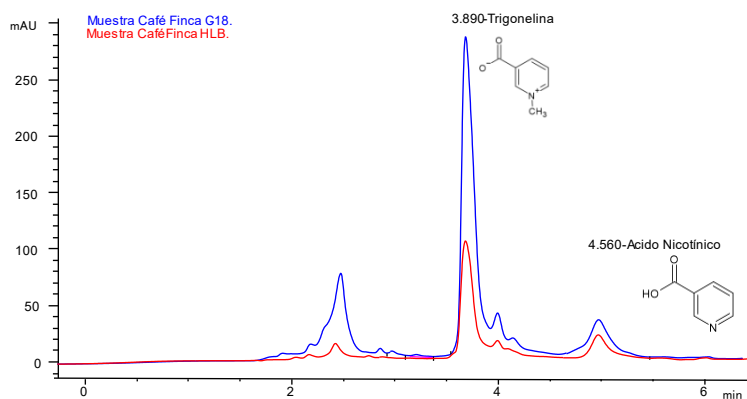


Figura 20. Cromatogramas de muestra Café "La Finca" tratada con C-18 y HLB.

Para cada muestra se realizó la evaluación de pureza de pico de las señales correspondientes a TRG y AN. En la Figura (21) se presentan los espectros normalizados de los picos cromatográficos, para el caso de ambos tratamientos. Para el caso de la muestra donde se utilizó el cartucho C-18 hubo mayor diferencia en los máximos de absorción de los espectros adquiridos de para ambos compuestos respecto a los espectros obtenidos cuando la muestra fue tratada con HLB. Lo que infiere que la pureza de los picos en la muestra tratada con HLB es mayor, debido a la posible eliminación de interferentes.

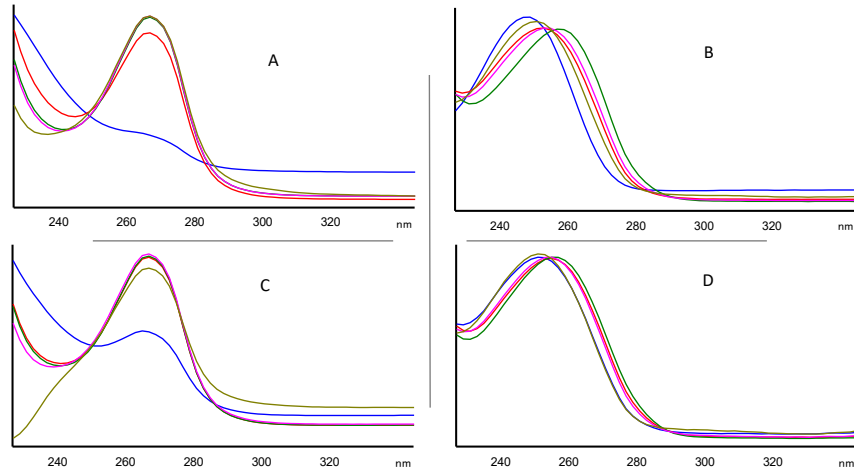


Figura 21. Espectros de absorción normalizados de Trigonelina y Ácido Nicotínico en los dos tratamientos C-18 y HLB. (A) Espectro normalizado pico de TRG tratamiento HLB, (B) Espectro normalizado pico de AN tratamiento C-18, (C) Espectro normalizado pico de TRG tratamiento C-18, (D) Espectro normalizado pico de AN tratamiento HLB.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionó para el procedimiento del tratamiento de la muestra el uso del cartucho HLB. Las condiciones finales del tratamiento de muestra se presentan en ilustración (4).

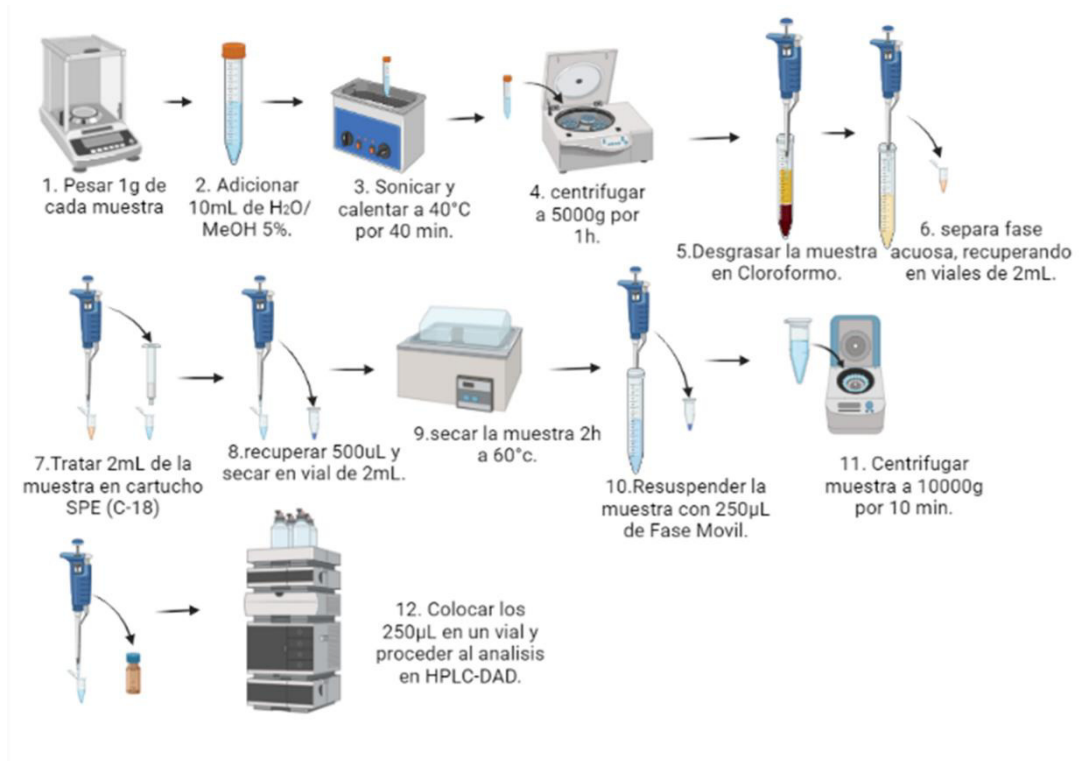


Ilustración 4. Diagrama de tratamiento de muestra final con HLB

4.5. Análisis de muestras reales.

Una vez establecidas las condiciones de separación cromatográfica y preparación de muestra se procedió a realizar el análisis de muestras reales. Se seleccionaron diferentes tipos de muestras: 1) biomasa liofilizada de germinados de alfalfa obtenidos bajo diferentes condiciones de estrés abiótico, 2) café de la especie arábica con diferente proceso de tostado y café.

4.5.1. Muestras de Alfalfa.

Para el caso de las muestras de alfalfa, se siguió el procedimiento de tratamiento de muestra anteriormente descrito, sin embargo, debido a la poca biomasa generada, la cantidad de muestra utilizada fue de 50 mg y el volumen de extracción de 1.5 mL de MeOH al 5%.

Se analizaron un total de 16 muestras con sus respectivos duplicados. En la figura (), se presentan los cromatogramas agrupados por estresante, obtenidos del análisis de todas las condiciones anteriormente descritas. En la Tabla (15), se presentan los estresantes añadidos al medio de crecimiento y sus respectivas concentraciones.

Tabla 15. Condiciones de exposición de las plántulas de alfalfa.

Cr (VI) mg L⁻¹	NaCl, mg L⁻¹	Se (IV) mg L⁻¹
0.5	0.5	0.5
3.0	3.0	2.0
5.0	5.0	3.5
10.0	10.0	5.0

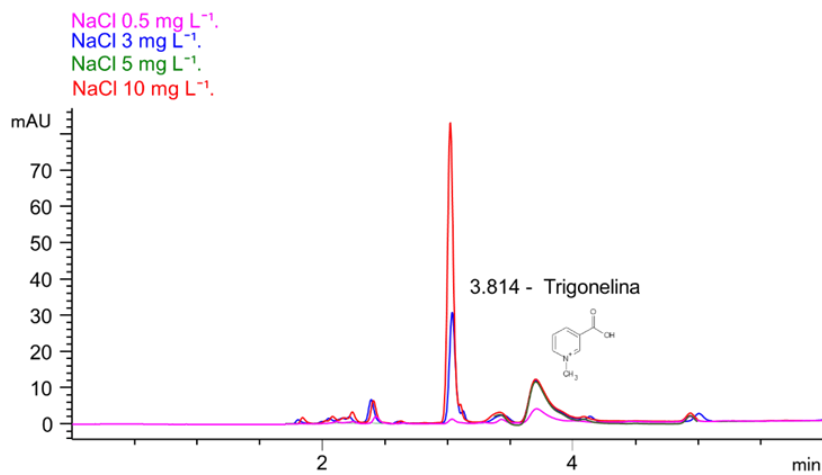
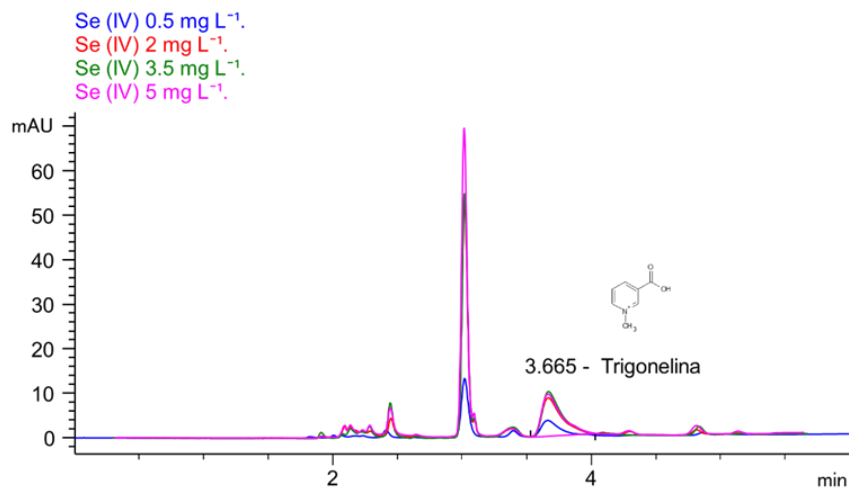
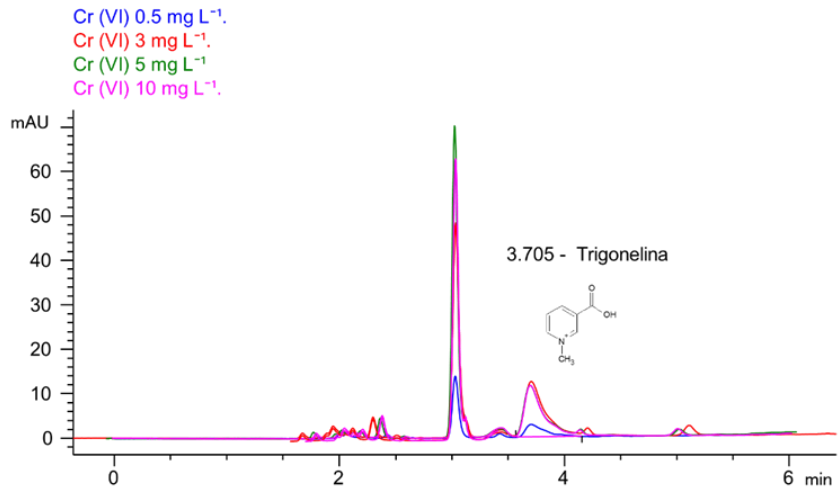


Figura 22. Cromatogramas obtenidos del análisis de biomasa de alfalfa liofilizada. Cr (VI), Se (IV) y NaCl.

Los resultados de la determinación del contenido de TRG encontrado en biomasa se presentan en la Tabla (16).

Tabla 16. Concentraciones de los analitos determinada en cada condición de crecimiento de estrés abiótico para las alfalfas en mg/g.

Muestra	TRG $\mu\text{g g}^{-1}$
control	127 \pm 10
Se (IV)	
0.5 mg L⁻¹	145 \pm 13
2.0 mg L⁻¹	201 \pm 15
3.5 mg L⁻¹	250 \pm 10
5.0 mg L⁻¹	232 \pm 14
NaCl	
0.5 mg L⁻¹	139 \pm 10
3.0 mg L⁻¹	253 \pm 14
5.0 mg L⁻¹	127 \pm 10
10 mg L⁻¹	203 \pm 33
Cr (VI)	
0.5 mg L⁻¹	145 \pm 10
3.0 mg L⁻¹	258 \pm 18
5.0 mg L⁻¹	251 \pm 9
10 mg L⁻¹	248 \pm 10

Los resultados de la determinación de TRG (Tabla (16)), van de 127 – 258 $\mu\text{g g}^{-1}$, siendo el valor más bajo encontrado el correspondiente al tratamiento control. Por otro lado, también se muestra que además de que el procedimiento desarrollado puede ser utilizado para el análisis de la matriz de la biomasa de alfalfa, se puede interpretar el efecto de los estresantes sobre el contenido de este metabolito. Por ejemplo, para el caso de las condiciones de 3.5 mg Se (IV) L⁻¹ y 3.0 mg L⁻¹ de NaCl y Cr (VI) se registraron los valores más altos en los respectivos estresantes, lo que concuerda con efectos

observados sobre la síntesis de otros metabolitos en plántulas de alfalfa crecidas bajo las mismas condiciones de estrés (Tesis de Maestría de David Morales). Para el caso del AN como se comentó con anterioridad este no fue detectado en las muestras de alfalfa, debido a que en la muestra no se encontraba presente el analito.

4.5.2. Muestras de café

Para este trabajo se analizaron 4 muestras de café de diferente marca comercial y proceso de tostado (Tabla (17)), las cuales se trataron tal como se describió anteriormente (Ilustración (4)). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla (17).

Tabla 17. Concentraciones de los analitos determinado en muestras de café.

No.	Muestra	Tostado	TRG mg g ⁻¹	AN mg g ⁻¹
1	Café Finca Santa	Fuerte	18.5 ± 2.30	4.87 ± 0.42
2	Café La Finca	Medio	20.1 ± 2.51	4.18 ± 0.35
3	Café Garat	Suave	25.0 ± 3.00	2.65 ± 0.16
4	Café Punta del Cielo	Suave	23.2 ± 2.41	2.91 ± 0.26

Los niveles encontrados en las muestras de café coinciden con los reportados en la bibliografía. Se ha descrito que cuando ocurre el proceso de tostado el contenido de TGR disminuye y aumenta la formación de AN^{25,26}. De acuerdo con la descripción realizada por los productores de las muestras de café analizadas, los tostados fueron fuerte para la muestra 1, medio para la muestra 2 y suave para las muestras 3 y 4. Los datos reportados de TRG y AN coinciden con el comportamiento descrito en la literatura, los valores mayores de TRG (muestras 3 y 4) corresponden al proceso de tostado suave, mientras que el valor más bajo determinado fue para la muestra 1 cuyo proceso de tostado según el productor es fuerte. Para el caso de AN el comportamiento esperado era el inverso al de la TRG, a mayor tostado mayor cantidad de este compuesto; así que para las muestras 3 y 4 los valores encontrados fueron los menores de las cuatro muestras analizadas considerando el tostado tipo suave.

Experimentos de recobro

El punto importante en la validación de un procedimiento es examinar su exactitud. La evaluación de la exactitud se fundamenta en la comparación de la media de los resultados obtenidos para una muestra con el contenido “verdadero” del analito en esta muestra y es una medida de posibles errores sistemáticos. Puesto que el valor verdadero no se conoce, existen varias estrategias para evaluar exactitud y en su caso minimizar los errores sistemáticos. En primer lugar, hay que mencionar el uso de materiales de referencia, experimentos de recuperación (recobro), comparación de los resultados obtenidos empleando procedimientos diferentes, preferentemente basados en diferentes principios fisicoquímicos (REF). En este trabajo, para evaluar la veracidad del procedimiento propuesto, se llevaron a cabo experimentos de recuperación, tanto para la biomasa de alfalfa, como para las muestras de café. Este proceso solo se realizó para TRG.

Para las muestras de alfalfa se adicionó 5 μg de TRG, mientras que para el café la cantidad adicionada fue de 10 mg. En la Tabla (18) se presentan los resultados de % de recuperación obtenidos, los valores van desde 61 al 115 % para las muestras de alfalfa y del 85 al 107 % para las muestras de café.

Tabla 18. Porcentajes de Recobro para los germinados de alfalfas y muestra de café en la adición de estándar

Muestra	TRG agregado	*µg de TRG en biomasa	µg de TRG en muestra con STD	%R
Alfalfas Cr (VI) 0.5 mg L ⁻¹	5 µg	7.25	12.0	98
Alfalfas Cr (VI) 3.0 mg L ⁻¹	5 µg	10.05	14.3	95
Alfalfas Cr (VI) 5.0 mg L ⁻¹	5 µg	12.5	13.6	78
Alfalfas Cr (VI) 10 mg L ⁻¹	5 µg	11.6	12.1	73
Alfalfas NaCl 0.5 mg L ⁻¹	5 µg	6.95	10.3	86
Alfalfas NaCl 3.0 mg L ⁻¹	5 µg	12.6	14.8	84
Alfalfas NaCl 5.0 mg L ⁻¹	5 µg	6.36	13.05	115
Alfalfas NaCl 10 mg L ⁻¹	5 µg	10.1	9.24	61
Alfalfas Se (IV) 0.5 mg L ⁻¹	5 µg	7.25	11.9	97
Alfalfas Se (IV) 2.0 mg L ⁻¹	5 µg	12.9	15.6	87
Alfalfas Se (IV) 3.5 mg L ⁻¹	5 µg	12.5	13.7	78
Alfalfas Se (IV) 5.0 mg L ⁻¹	5 µg	12.4	15.5	89
Café Finca Santa	10 mg	18.5	30.5	107
Café La Finca	10 mg	20.1	27.4	91
Café Garat	10 mg	25.0	30.4	87
Café punta del cielo	10 mg	23.2	28.2	85

*µg de TRG en 50 mg de biomasa para las muestras de alfalfa y 1 g para café.

Como se observa para la mayoría de los valores obtenidos hay concordancia entre la cantidad de TRG adicionada y la determinada, sin embargo, como en el caso de la muestra de alfalfa a 10 mg L⁻¹ de NaCl el valor de recobro obtenido fue el menor de todas las muestras (61%), lo que hace imprescindible el uso de un estándar interno, lo cual queda como prospectiva de trabajo a futuro.

Capítulo 5- Conclusiones.

El presente trabajo se enfocó en el desarrollo de un procedimiento analítico para la determinación de TRG y AN en biomasa de alfalfa y café molido mediante HPLC-DAD utilizando NFPA como formador de pares iónicos. Este trabajo se enfocó en aspectos: 1) la selección de condiciones cromatográficas, 2) tratamiento de muestra y 3) determinación de contenido e TRG y AN en muestras reales.

1. El primer enfoque del trabajo fue encontrar las condiciones de separación cromatográfica utilizando el formador de pares iónicos NFPA. Se evaluó la composición de la fase móvil mediante la selección de buffers volátiles compatibles con HPLC-IT-MS, pH de trabajo y concentración de NFPA en columna. La fase móvil seleccionada fue ácido fórmico 0.05M, Hidróxido de amonio 0.1 M, pH 4, 20 mM de NFPA. La concentración de NFPA en columna donde mejores resultados de repetibilidad en los tiempos de retención de las señales de TRG y AN, mayor relación S/N y mejor resolución, se obtuvieron cuando la concentración de NFPA en columna es de 10 mM durante toda la corrida cromatográfica. Los valores de LD y LC obtenidos fueron para TRG de 0.05 y 0.16 mg L⁻¹ respectivamente, mientras que para AN fueron de 0.11 y 0.36 mg L⁻¹. Cabe señalar que los límites de detección reportados para TRG en otros métodos que utilizaron HPLC-DAD se encuentran en el intervalo de 0.015 – 1.51 mg L⁻¹ y los LC entre 0.05 – 4.58 mg L⁻¹ ^{30,37,39}.

2. Para el segundo enfoque se logró la adaptación de un procedimiento analítico para la extracción de TRG y AN en dos diferentes matrices (alfalfa y granos de café molidos), los factores evaluados fueron el medio de extracción, la temperatura, los mejores resultados obtenidos en cuanto a mayor extracción de los analitos y menor presencia de interferentes fue para el medio de MeOH 5%, llevando a cabo la extracción en baño de ultrasonido a 40°C por 40 min. Con el fin de realizar la limpieza de la muestra en función de la eliminación de interferentes se evaluó el uso de dos tipos de cartucho SEP, C-18 y HLB, los mejores resultados obtenidos fueron para el cartucho HLB.

3. Una vez establecidas las condiciones cromatográficas y de tratamiento de muestras se realizó la determinación del contenido de TRG y AN en biomasa de alfalfa obtenida de diferentes condiciones de estrés abiótico y en muestras de café molido con diferente proceso de tostado.

4. Los valores encontrados en alfalfa de TRG van de 127 – 258 $\mu\text{g g}^{-1}$, siendo el valor más bajo encontrado el correspondiente al tratamiento control. Por otro lado, también se muestra que además de que el procedimiento desarrollado puede ser utilizado para el análisis de la matriz de la biomasa de alfalfa, se puede interpretar el efecto de los estresantes sobre el contenido de este metabolito. Por ejemplo, para el caso de las condiciones de 3.5 mg Se (IV) L⁻¹ y 3.0 mg L⁻¹ de NaCl y Cr (VI) se registraron los valores más altos en los respectivos estresantes, lo que concuerda con efectos observados sobre la síntesis de otros metabolitos en plántulas de alfalfa crecidas bajo las mismas condiciones de estrés. Para el caso del AN no fue detectado en las muestras de alfalfa.

5. Los niveles encontrados en las muestras de café coinciden con los reportados en la bibliografía. Se ha descrito que cuando ocurre el proceso de tostado el contenido de TGR disminuye y aumenta la formación de AN ^{25,26}. De acuerdo con la descripción realizada por los productores de las muestras de café analizadas, los tostados fueron fuerte para la muestra 1, medio para la muestra 2 y suave para las muestras 3 y 4. Los datos reportados de TRG y AN coinciden con el comportamiento descrito en la literatura, los valores mayores de TRG (muestras 3 y 4) corresponden al proceso de tostado suave, mientras que el valor más bajo determinado fue para la muestra 1 cuyo proceso de tostado según el productor es fuerte. Para el caso de AN el comportamiento esperado era el inverso al de la TRG, a mayor tostado mayor cantidad de este compuesto; así que para las muestras 3 y 4 los valores encontrados fueron los menores de las cuatro muestras analizadas considerando el tostado tipo suave.

6. En este trabajo, para evaluar la veracidad del procedimiento propuesto, se llevaron a cabo experimentos de recuperación, tanto para la biomasa de alfalfa, como para las muestras de café. Este proceso solo se realizó para TRG.

Para las muestras de alfalfa se adicionó 5 μg de TRG, mientras que para el café la cantidad adicionada fue de 10 mg. Los resultados de % de recuperación obtenidos, van desde 61 al 115 % para las muestras de alfalfa y del 85 al 107 % para las muestras de café. Como se observa para la mayoría de los valores obtenidos hay concordancia entre la cantidad de TRG adicionada y la determinada, sin embargo, como en el caso de la muestra de alfalfa a 10 mg L⁻¹ de NaCl el valor de recobro obtenido fue el menor de todas las muestras (61%), lo que hace imprescindible el uso de un estándar interno, lo cual queda como prospectiva de trabajo a futuro.

Bibliografía.

1. Frank, J. *et al.* Terms and nomenclature used for plant-derived components in nutrition and related research: Efforts toward harmonization. *Nutrition Reviews* **78**, 451–458 (2020).
2. Cifuentes, A. Food Analysis : Present , Future , and Foodomics. **2012**, (2012).
3. Kalra, E. K. Nutraceutical - Definition and introduction. *AAPS PharmSci* **5**, 1–2 (2003).
4. Dubick, M. A. & Omaye, S. T. *Grape wine and tea polyphenols in the modulation of atherosclerosis and heart disease. Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods, Second Edition* (2016). doi:10.1201/9781420006186.ch5.
5. Yisak, H., Redi-Abshiro, M. & Chandravanshi, B. S. Selective determination of caffeine and trigonelline in aqueous extract of green coffee beans by FT-MIR-ATR spectroscopy. *Vib Spectrosc* **97**, 33–38 (2018).
6. Yisak, H., Redi-Abshiro, M. & Chandravanshi, B. S. New fluorescence spectroscopic method for the simultaneous determination of alkaloids in aqueous extract of green coffee beans. *Chemistry Central Journal* **12**, 1–7 (2018).
7. Toloza-Zambrano, P., Avello, M. & Fernández, P. Determinación de rutina y trigonelina en extractos de hojas de Bauhinia forficata subsp. pruinosa y evaluación del efecto hipoglicemiante en humanos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas* **14**, 21–32 (2015).
8. Mohamadi, N., Shariffar, F., Pournamdari, M. & Ansari, M. A Review on Biosynthesis, Analytical Techniques, and Pharmacological Activities of Trigonelline as a Plant Alkaloid. *Journal of Dietary Supplements* **15**, 207–222 (2018).
9. National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 5570, Trigonelline.
10. Wishart DS, Tzur D, Know C, et al. No Title. *HMDB: the human Metabolome Database. Trigonelline.* (2020).
11. Tramontano, W. A. & Jouve, D. Trigonelline accumulation in salt-stressed legumes and the role of other osmoregulators as cell cycle control agents. *Phytochemistry* **44**, 1037–1040 (1997).
12. Perrone, D., Donangelo, C. M. & Farah, A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry* **110**, 1030–1035 (2008).

13. Sousa, M. B. T., Santos, J. R., Almeida, P. J. & Rodrigues, J. A. Low pressure ion pair chromatography with amperometric detection for the determination of trigonelline in coffee samples. *Food Research International* **114**, 223–229 (2018).
14. Martín, M. J., Pablos, F., Angel Bello, M. & Gustavo González, A. Determination of trigonelline in green and roasted coffee from single column ionic chromatography. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **357**, 357–358 (1997).
15. Yisak, H., Redi-Abshiro, M. & Chandravanshi, B. S. New fluorescence spectroscopic method for the simultaneous determination of alkaloids in aqueous extract of green coffee beans. *Chemistry Central Journal* **12**, (2018).
16. Rosalía, G. G. G., Molina, J. J. F., Aguilar, P. & Salazar, W. Determinación de compuestos químicos asociados con las características sensoriales de café procesado por vía húmeda Determination of chemical compounds associated with sensory characteristics of wet processed coffee Resumen Introducción. 712–718 (2014).
17. Cho, Y., Njiti, V. N., Chen, X., Lightfoot, D. A. & Wood, A. J. Trigonelline concentration in field-grown soybean in response to irrigation. *Biologia Plantarum* **46**, 405–410 (2003).
18. Zheng, X. Q., Matsui, A. & Ashihara, H. Biosynthesis of trigonelline from nicotinate mononucleotide in mungbean seedlings. *Phytochemistry* **69**, 390–395 (2008).
19. Sarett, H. P., Perlzweig, W. A. & Levy, E. D. Synthesis and Excretion of Trigonelline. *Journal of Biological Chemistry* **135**, 483–485 (1940).
20. Vellai, R. D., Chandiran, S. & Pillai, S. S. GTF-231, a Mixture of Gymnemic Acid, Trigonelline and Ferulic Acid Significantly Ameliorates Oxidative Stress in Experimental Type 2 Diabetes in Rats. *Canadian Journal of Diabetes* **42**, 237–244 (2018).
21. Tharaheswari, M. *et al.* Trigonelline and diosgenin attenuate ER stress, oxidative stress-mediated damage in pancreas and enhance adipose tissue PPAR γ activity in type 2 diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* **396**, 161–174 (2014).
22. Nobuhiro, H., Rieko, O., Yutaka, M. & Kazumi, Y. Anti-Invasive Activity of Niacin and Trigonelline against Cancer Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **69**, 653–658 (2005).
23. Chopra, S. *et al.* Validated high-performance thin-layer chromatography method for determination of trigonelline in herbal extract and pharmaceutical dosage form. *Analytica Chimica Acta* **577**, 46–51 (2006).
24. Caporaso, N., Whitworth, M. B., Grebby, S. & Fisk, I. D. Non-destructive analysis of sucrose, caffeine and trigonelline on single green coffee beans by hyperspectral imaging. *Food Research International* **106**, 193–203 (2018).

25. Casal, S., Beatriz Oliveira, M. & Ferreira, M. A. HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. *Food Chemistry* **68**, 481–485 (2000).
26. Riedel, A. *et al.* N-Methylpyridinium, a degradation product of trigonelline upon coffee roasting, stimulates respiratory activity and promotes glucose utilization in HepG2 cells. (2014) doi:10.1039/c3fo60320b.
27. Human Metabolome Database: Showing metabocard for Nicotinic acid (HMDB0001488). <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0001488>.
28. Nicotinic acid | C₅H₄NCOOH - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nicotinic-acid>.
29. Dadrasan, M., Chaichi, M. R., Pourbabae, A. A., Yazdani, D. & Keshavarz-Afshar, R. Deficit irrigation and biological fertilizer influence on yield and trigonelline production of fenugreek. *Industrial Crops and Products* **77**, 156–162 (2015).
30. Liu, W. *et al.* Development and optimization of a method for determining betaine and trigonelline in the fruits of Lycium species by using solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography–diode array detector. *Journal of Separation Science* **43**, 2073–2078 (2020).
31. Campa, C. *et al.* Trigonelline and sucrose diversity in wild Coffea species. *Food Chemistry* **88**, 39–43 (2004).
32. Dadrasan, M., Chaichi, M. R., Pourbabae, A. A., Yazdani, D. & Keshavarz-Afshar, R. Deficit irrigation and biological fertilizer influence on yield and trigonelline production of fenugreek. *Industrial Crops and Products* **77**, 156–162 (2015).
33. Trugo, L. C., MacRae, R. & Dick, J. Determination of purine alkaloids and trigonelline in instant coffee and other beverages using high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **34**, 300–306 (1983).
34. Arai, K. *et al.* Simultaneous determination of trigonelline, caffeine, chlorogenic acid and their related compounds in instant coffee samples by HPLC using an acidic mobile phase containing octanesulfonate. *Analytical Sciences* **31**, 831–835 (2015).
35. *Toloza-Zambrano et al.*
36. Sousa, M. B. T., Santos, J. R., Almeida, P. J. & Rodrigues, J. A. Low pressure ion pair chromatography with amperometric detection for the determination of trigonelline in coffee samples. *Food Research International* **114**, 223–229 (2018).
37. Minaleshewa Atlabachew¹ | Atakilt Abebe¹ | Tessera Alemneh Wubieneh² | Yilak Tefera Habtemariam. Rapid and simultaneous determination of trigonelline, caffeine, and chlorogenic acid in green coffee bean extract. (2021) doi:10.1002/fsn3.2456.

38. Hassanzadeh, E., Chaichi, M. R., Mazaheri, D., Rezazadeh, S. & Badi, H. A. N. Physical and chemical variabilities among domestic Iranian Fenugreek (*Trigonella foenum-graceum*) seeds. *Asian Journal of Plant Sciences* **10**, 323–330 (2011).
39. Shailajan, S., Sayed, N., Menon, S., Singh, A. & Mhatre, M. A validated RP-HPLC method for quantitation of trigonelline from herbal formulations containing *Trigonella foenum-graecum* (L.) seeds. *Pharmaceutical Methods* **2**, 157–160 (2011).
40. Evans, L. S. & Tramontano, W. A. Trigonelline and promotion of cell arrest in G2 of various legumes. *Phytochemistry* **23**, 1837–1840 (1984).
41. Szczesny, D. *et al.* Quantitative determination of trigonelline in mouse serum by means of hydrophilic interaction liquid chromatography–MS/MS analysis: Application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography* **32**, (2018).
42. Jeszka-Skowron, M., Frankowski, R. & Zgoła-Grześkowiak, A. Comparison of methylxantines, trigonelline, nicotinic acid and nicotinamide contents in brews of green and processed Arabica and Robusta coffee beans – Influence of steaming, decaffeination and roasting processes on coffee beans. *LWT* **125**, 109344 (2020).
43. Tramontano, W. A., McGinley, P. A., Ciancaglini, E. F. & Evans, L. S. A survey of trigonelline concentrations in dry seeds of the dicotyledoneae. *Environmental and Experimental Botany* **26**, 197–205 (1986).
44. Lin, C., Cai, J. & Yang, X. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Determination of Trigonelline in Rat Plasma and its Application to a Pharmacokinetic Study.
45. Moldoveanu, S. C. & David, V. *ESSENTIALS IN MODERN HPLC SEPARATIONS*.
46. Yue, Z. X. *et al.* Ion pair-based mobile phase additives to improve the separation of alkaloids in supercritical fluid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **208**, 114467 (2022).
47. Hu, Q. *et al.* Quantitative structure-retention relationship for reliable metabolite identification and quantification in metabolomics using ion-pair reversed-phase chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Talanta* **238**, 123059 (2022).
48. Creeke, P. I. & Seal, A. J. Quantitation of the niacin metabolites 1-methylnicotinamide and 1-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in random spot urine samples, by ion-pairing reverse-phase HPLC with UV detection, and the implications for the use of spot urine samples in the assessment of niacin status. *Journal of Chromatography B* **817**, 247–253 (2005).
49. Afton, S., Kubachka, K., Catron, B. & Caruso, J. A. Simultaneous characterization of selenium and arsenic analytes via ion-pairing reversed phase chromatography

with inductively coupled plasma and electrospray ionization ion trap mass spectrometry for detection. Applications to river water, plant extract and urine matrices. *Journal of Chromatography A* **1208**, 156–163 (2008).

50. Furota, S., Ogawa, N. O., Takano, Y., Yoshimura, T. & Ohkouchi, N. Quantitative analysis of underivatized amino acids in the sub- to several-nanomolar range by ion-pair HPLC using a corona-charged aerosol detector (HPLC–CAD). *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **1095**, 191–197 (2018).
51. Wrobel, K., Wrobel, K., Ortiz, S. J. & Escobosa, A. R. C. What Are AGEs, Their Chemical Structure, and How Can They Be Measured? in *Dietary Ages and their Role in Health and Disease* 3–18 (CRC Press, 2019). doi:10.1201/9781315120041-2.
52. Ochi, N. Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in salted mackerel fillet by ion-pair solid-phase extraction and volatile ion-pair reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1601**, 115–120 (2019).
53. Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry | FDA. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q2r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology-guidance-industry>.
54. *The Complete Guide to Solid Phase Extraction (SPE) A method development and application guide*. www.phenomenex.com (2017).
55. Mallett, D. N., Dayal, S., Dear, G. J. & Pateman, A. J. The determination of nicotinic acid in plasma by mixed-mode liquid chromatography-tandem mass spectrometry following ion exchange solid phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**, 510–516 (2006).
56. Boettler, U. *et al.* Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **22**, 426–440 (2011).