

Informe técnico de practicantado

Síntesis y análisis de nitrolípidos

Supervisor: PhD. Andrés Trostchansky

Laboratorio de Bioquímica Oxidativa de Lípidos, Facultad de Medicina, UDELAR.

Tutora: Dra. María Laura Franco Fraguas

Joaquín Barbeito Osinaga

CI: 4.665.940-9

Fecha: Septiembre 2020- diciembre 2020

Resumen

En este informe técnico se describen los distintos trabajos experimentales realizados entre septiembre y diciembre de 2020, como parte del practicantado de Facultad de Química. El practicantado se llevó a cabo en la Cátedra de Bioquímica, Laboratorio de Bioquímica Oxidativa de Lípidos, Facultad de Medicina, UDELAR.

El trabajo estuvo dirigido a recibir entrenamiento e investigar sobre la síntesis y análisis de nitrolípidos y estuvo dividido en dos objetivos amplios:

En la primera parte, se identificaron y analizaron nitrolípidos en leche bovina, contribuyendo nuestro trabajo a responder preguntas de carácter químico con un proyecto multi-institucional financiado por Fondo Sectorial Innovagro.

En la segunda parte, se realizaron experimentos para contribuir a optimizar la síntesis y purificación de nitro-AA (ácido nitroaraquidónico) a nivel preparativo, que es investigado en la Facultad de Medicina como un metabolito endógeno con relevante actividad fisiopatológico.

En cada parte se describen brevemente los antecedentes de la disciplina, objetivos específicos, métodos, resultados, discusión y perspectivas.

Por un lado, se aplicaron una serie de técnicas novedosas para el análisis de ácidos grasos nitrados aplicados a muestras de leche bovina. En este trabajo se obtuvieron resultados originales en la literatura, mostrando formalmente la presencia de Nitro-cLA como un constituyente endógeno de la leche. Este resultado puede contribuir a comprender el papel de nitro-cLA como nutriente beneficioso a la salud.

Por otro lado, aplicando un método de síntesis bifásica, se pudo optimizar el rendimiento de la síntesis de nitro-AA, el cual podría contribuir como sustrato para el laboratorio de química oxidativa de lípidos en futuras investigaciones sobre la bioquímica, reactividad y función de este compuesto.

En suma, se ha cumplido con el objetivo de recibir un entrenamiento intensivo sobre técnicas analíticas y separativas para la síntesis y análisis cuali/cuantitativo de nitrolípidos habiéndose obtenido resultados preliminares originales y promisorios.

Índice

Parte. Identificación y análisis de nitrolípidos en leche bovina.....Pág 4-12

- Antecedentes y objetivos.....Pág 4-5
- Métodos.....Pág 5-9
- Resultados.....Pág 9-13
- Conclusiones.....Pág 13

Parte 2. Síntesis y purificación NO₂-AA (ácido nitroaraquidónico) por HPLC preparativoPág 13-30

- Antecedentes y objetivos.....Pág 13-16
- Métodos.....Pág 16-19
- Resultados.....Pág 19-30
- Conclusiones.....Pág 30

ReferenciasPág 30-32

AnexoPág 32-69

Parte 1. Identificación y análisis de nitrolípidos en leche bovina.

Antecedentes y objetivos

El trabajo se relaciona con algunos objetivos del proyecto Fondo Sectorial Innovagro financiado por la ANII, titulado “Metabolismo energético y nitroxidativo de ácidos grasos en sistemas lecheros pastoriles: Impacto sobre la salud animal y calidad de productos lácteos” en la cual participan varias instituciones nacionales.

La leche bovina juega un papel central en la nutrición humana y es un ingrediente que se consume globalmente en diferentes formas y destinos. La industria láctea internacional intenta innovar y valorizar productos lácteos por las propiedades de algunos de sus componentes más saludables o con actividad “nutracéutica” (Bauman et al., 2006).

La grasa de la leche contiene más de 400 ácidos grasos distintos, algunos de los cuales poseen actividad biológica reconocida. Entre ellos, el ácido linoleico conjugado (cLA) se destaca por sus potenciales efectos beneficiosos para la salud humana. En la leche y sus derivados se describe una mezcla de diversos isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico con actividad antiarteriosclerótica, antidiabética y de potenciación del sistema inmune (Ferlay et al., 2017; Fuke and Nornberg, 2017; Lock and Bauman, 2014).

EL cLA fue identificado en modelos animales como uno de los principales sustratos endógenos para la nitración del ácido graso in vitro e in vivo, produciendo nuevos productos con potentes acciones beneficiosas para la salud humana, denominados **ácidos grasos nitrados (AGN)** con potentes acciones anti-inflamatorias. (Trostchansky et al 2007, Bonacci et al. 2011; Ferreira et al. 2009; Gonzalez-Perilli L. et al., 2013). Derivados de nitración del cLA y sus metabolitos se detectan en el plasma de humanos sanos y aumentan en los tejidos que sufren episodios de isquemia repercusión.

El objetivo de este trabajo ha sido aplicar técnicas de extracción de lípidos de la leche para luego utilizar técnicas analíticas para demostrar la presencia de ácidos grasos nitrados en la leche.

Durante el final de mi carrera me he especializado en la química extractiva y en el análisis cuantitativo/cualitativo de compuestos naturales por HPLC (cromatografía líquida de alta presión) y espectrometría de masas. Por este motivo el practicantado realizado en el Departamento de Bioquímica, UDELAR, estuvo dirigido al aprendizaje

en el área de la extracción de productos naturales y su análisis por HPLC, MS (espectrometría de masas) y HPLC-MS/MS, cuyos conocimientos aumentaron notoriamente de comienzo a fin de este período de trabajo.

Métodos

a) Obtención de muestras de leche.

Se usaron muestras de leche obtenidas semanalmente durante los periodos de medición, o bien cada quince días a lo largo de la lactancia. En cada plataforma se colectaron en dos momentos del ciclo de producción: lactancia temprana (+21 días del parto) y tardía (+240 días del parto). Las muestras obtenidas se fraccionaron en frascos de 10mL y se congelaron a -20 °C hasta momento de análisis en el laboratorio.

b) Métodos de extracción lipídica.

Extracción Blight & Dyer (B&D)

Este método consiste en una extracción líquido-líquido para matrices con un alto contenido de agua, de acuerdo a Jensen, S.K. (2008). En nuestro caso, la muestra de leche fue homogeneizada a alta velocidad con metanol en una proporción de 2:1 con respecto al volumen de la muestra. Seguidamente se agregó una parte de cloroformo y se dejó homogeneizar por 30 segundos haciendo uso de vortex, después se agregó una parte de agua y homogeneizó por otros 30 segundos. Posteriormente se centrifugó a 4 °C, 1800 rpm y finalmente se tomó la fase inferior para luego evaporarla a 37 °C en condiciones de vacío.

Extracción con Hexano

Este método consiste en una extracción líquido-líquido. Se realizó la homogeneización a alta velocidad de la biomasa con una mezcla de Hexano:Isopropanol:Ácido Acético 30:20:1 v/v con respecto al volumen de la muestra, seguidamente se agregan 2,5 vol de hexano y se dejó homogeneizar por 30 segundos haciendo uso de vortex. Posteriormente se centrifugó a 4 °C, 1800 rpm y finalmente se tomó la fase superior para luego evaporarla a 37 °C y en condiciones de vacío.

Extracción en fase sólida SPE

Este método se utilizó para purificar ácidos grasos nitrados. Se siguió la técnica descrita en Fazzari et al., 2014 de acuerdo a los siguientes pasos:

- 1) Se extraen los lípidos, tratados o no tratados con lipasa, mediante el método de extracción de hexano.
- 2) Se evapora la muestra y se resuspende en 500-1000 μ L de cloroformo.
- 3) Se extraen los diferentes lípidos mediante extracción en fase sólida utilizando columnas Strata NH2 (55 μ m, 70 Å), 500 mg/6 mL- Phenomenex. Las columnas se pre acondicionan con 6 mL de cloroformo y 6 mL de metanol. Luego se agrega la muestra y se seca.
- 4) Los lípidos apolares se eluyen de la columna con 4 mL de cloroformo/isopropanol (2:1, v/v); mientras que los ácidos grasos libres se eluyen luego con 6 mL de dietil éter/ácido acético 2%. Finalmente, los lípidos polares se eluyen con 4 mL de metanol.
- 5) Las muestras se evaporan a temperatura ambiente con nitrógeno, se resuspenden en metanol y se analizan por LC-MS/MS.

c) Método de digestión enzimática

Consiste en la hidrólisis enzimática de los lípidos, principalmente los triglicéridos. Luego de extraer los lípidos de la muestra y llevar a sequedad se realizó la digestión enzimática de acuerdo a Fazzari et al., 2014. La reacción se llevó a cabo utilizando las enzimas Lipasa porcina (5 mg/mL) y fosfolipasa (40 Unidades/mL), en buffer de Na_3PO_4 , pH=7.4 a 37 °C con agitación. Posteriormente, los ácidos grasos fueron extraídos por extracción B&D.

d) Método de “nitración gástrica”

Para reproducir las condiciones en donde los lípidos son nitrados a pH estomacal en presencia de nitrito, se utilizó la técnica descrita por Fazzari et al., 2014. Se tomó un volumen de muestra de lípidos y se incubó junto a NaNO_2 5 mM en buffer pH=3 a 37°C por 1 hora. Para finalizar la reacción, se realiza una extracción B&D y se lleva a sequedad.

e) Análisis de Lípidos por ESI-MS/MS inyección directa

Las muestras de leche fueron extraídas mediante B&D dos veces. Posteriormente se diluyeron en metanol:diclorometano (1:1) con NH_2Ac 1 mM y se realizó la inyección directa a ~5-10 μ L/min en un espectrómetro de masa triple cuadrupolo con trampa de iones equipado con una fuente de ionización por electrospray a presión atmosférica (QTRAP 4500. Applied Biosystems/MDS SCIEX) como muestra el esquema A). El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo se configuró con los siguientes

parámetros: potencial de desagrupamiento (DP) de -65 V, energía de colisión (CE) de -35 eV y una temperatura de desolvatación de 650u°C de acuerdo a Fazzari et al., 2014.



Esquema A). Esquema del espectrómetro de masa ESI-QTRAP. Fuente: <https://sciex.com/x51131>

f) Análisis de Nitro-lípidos por HPLC-MS/MS

El análisis de ácidos grasos nitrados (NO₂-FA) se realizó mediante HPLC-ESI-MS/MS utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QTAP4500, Applied Biosystems, Framingham, MA) acoplado a un HPLC Agilent 1260. Los NO₂-FA en los extractos de lípidos fueron separados utilizando una columna de fase reversa C18 (26150 mm, 3 mm, Phenomenex) eluida a un caudal de 0,25 mL / min utilizando un sistema disolvente que consta de A (H₂O/ ácido acético 0,1%) y B (acetonitrilo / ácido acético al 0,1%), con el siguiente gradiente de disolvente: B al 45% (0–0,1 min); 45 a 80% de B (0,1 a 45 min); 80-100% B (45-46 min); 100% B (46-47 min) y luego las columnas se reequilibraron a las condiciones iniciales durante 10 min más.

El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo se configuró con los siguientes parámetros: potencial de desagrupamiento (DP) de -65 V, energía de colisión (CE) de -35 eV y una temperatura de desolvatación de 650u°C. La detección de NO₂-FA se realizó mediante el modo de exploración MRM con transiciones específicas de MRM correspondientes a los isómeros nitrados potenciales de OA, LA y cLA.

En todos los casos, los datos se adquirieron, analizaron y procesaron utilizando el software Analyst 1.6.2 (Applied Biosystems, Framingham, MA) de acuerdo a Fazzari et al., 2014 y Mastrogiovanni et al., 2019.

g) Análisis de lípidos por TLC (Thin-Layer-Chromatography)

La TLC hace uso de gel de sílice de un tamaño de partícula muy uniforme y pequeño, lo que permite muy buenas separaciones con tiempos de elución comparativamente cortos. La mayoría de las clases de lípidos importantes se pueden lograr separar

mediante TLC. Se usaron como fases móviles: Fase móvil 1: CHCl_3 :MeOH:H₂O 60:30:5 v/v. Fase móvil 2: hexano:dietil-éter:ácido acético 80:20: 1.5 v/v.

Se corrió FM1 dos veces hasta la mitad de TLC. Posteriormente hasta el frente final se corrió FM2. La TLC fue revelada con anisaldehído y calor mediante un calefactor eléctrico manual. En la Figura 1 se muestra una representación de la TLC luego de finalizar y revelar.

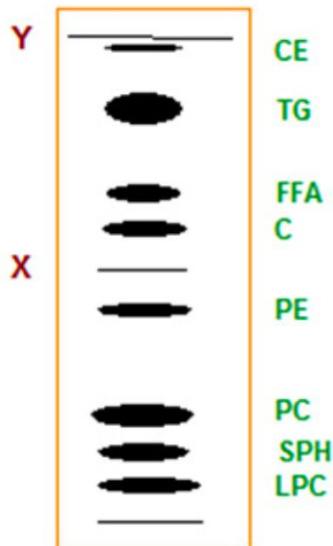


Figura 1. Abreviaturas: CE, ésteres de colesterol; TG, triacilgliceroles; FFA, ácidos grasos libres; C, colesterol; PE, fosfatidiletanolamina; PC, fosfatidilcolina; SPH, esfingomielina; LPC, lisofosfatidilcolina. Imágen tomada de:

<https://lipidlibrary.aocs.org/lipid-analysis/selected-topics-in-the-analysis-of-lipids/thin-layer-chromatography-of-lipids>.

i) Método de homogeneizado con Bullet Blender

En este método, se llevó la muestra de leche a 37 °C. Posteriormente se utilizaron tubos Eppendorf Safe-Lock precargados con pastillas metálicas (tubos GREEN) para la homogeneización con tiempo de 4 min, de acuerdo a <https://www.nextadvance.com/>.

j) Método de homogeneizado sonicando en frío

En este método, se llevó la muestra de leche a 37 °C. Posteriormente se depositó la muestra en un tubo de centrifuga destapado, se la colocó en un baño de hielo y se homogeneizó por 5 minutos en un sonicador manual.

Resultados y Discusión

- **Desarrollo de un nuevo método de extracción lipídica de leche bovina.**

Se logró poner a punto un nuevo método de extracción lipídica de leche vacuna, siendo este una modificación de B&D, con el agregado de un paso previo de precipitación con MeOH en relación 1:5, seguido de centrifugación para obtener un sobrenadante en el cual se realiza la extracción B&D. Se confirmó su efectividad de este método realizando TLC comparativa con otros métodos extractivos (Hexano, “clásico B&D”, etc) como se muestra en la Figura 2. También se confirmó su efectividad mediante análisis cualitativo para identificar los distintos grupos de lípidos presentes por ESI-MS/MS inyección directa (Ver Anexo, Figuras 33, 34, 35, 36, 37 y 38).

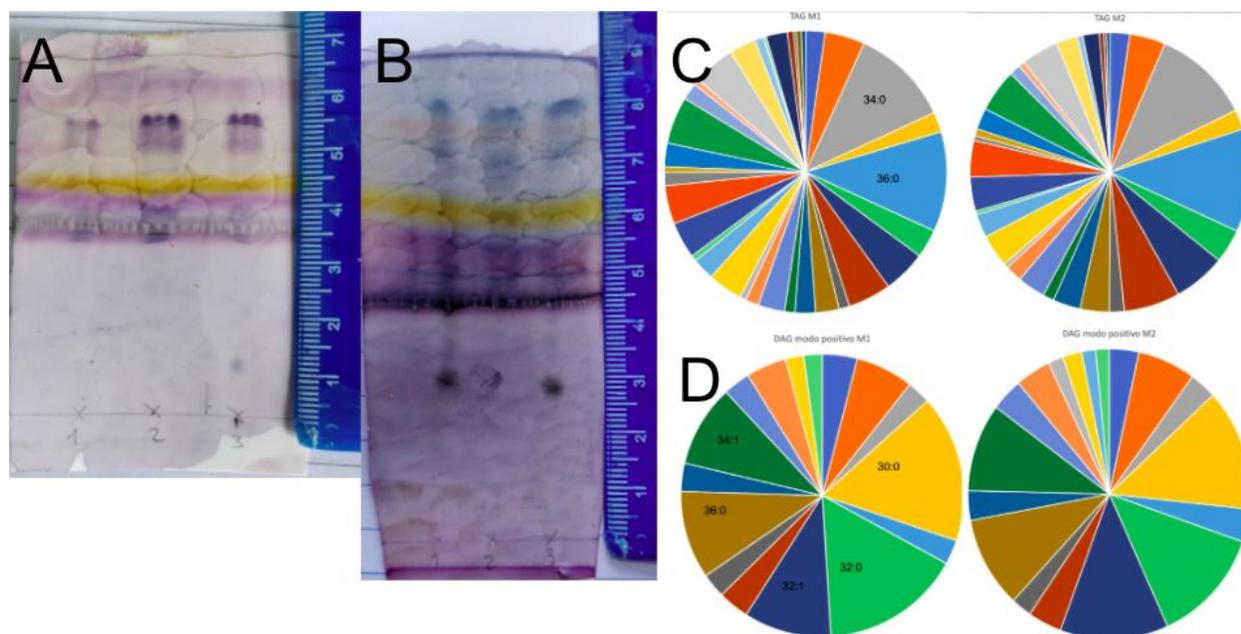


Figura 2. Resultados de métodos de extracción lipídica de leche bovina. A) se puede apreciar en la TLC el mayor rendimiento extractivo para la extracción B&D con precipitación previa en relación 1:5 MeOH:Leche (Número 2), la misma está siendo comparada con la corrida 1 (B&D con precipitación previa en relación 1:2 MeOH:Leche) y con la corrida 3 (B&D con precipitación previa en relación 1:10 MeOH:Leche). B) se puede apreciar en la TLC el mayor rendimiento

extractivo para la extracción B&D con precipitación previa en relación 1:5 MeOH:Leche (corrida 3), la misma está siendo comparada con la corrida 1 (método extractivo de But:MeOH:CHCl₃ 3:5:4 v/v) y con la corrida 2 (método de hexano). C) se puede apreciar un gráfico de un análisis cualitativo por inyección directa en ESI-MS/MS de los grupos de lípidos triglicéridos, a la izquierda se representa una extracción con B&D con precipitación previa en relación 1:5 MeOH:Leche y a la izquierda un B&D clásico. Se puede apreciar como en la comparación contienen la gran mayoría de triglicéridos, de esta forma se puede verificar que la precipitación con MeOH no genera pérdida de triglicéridos. D) se puede apreciar un gráfico de un análisis cualitativo por inyección directa en ESI-MS/MS de los grupos de lípidos diacilgliceroles, a la izquierda se representa una extracción con B&D con precipitación previa en relación 1:5 MeOH:Leche y a la izquierda un B&D clásico. Se puede apreciar como en la comparación contienen la gran mayoría de diacilgliceroles, de esta forma se puede verificar que la precipitación con MeOH no genera pérdida de diacilgliceroles.

- **Identificación de nitrolípidos en leche bovina**

Extrayendo los triglicéridos con el método de hexano, realizando luego una hidrólisis enzimática y una extracción en fase sólida (Ver experimento 13 del Anexo), se logró identificar la presencia de NO₂-cLA endógeno en leche vacuna, algo no descrito en literatura hasta el momento. En la figura 3 se puede observar como coinciden los tiempos de retención y los picos característicos de las dos transiciones del NO₂-cLA de un std interno de NO₂-cLA con el extracto obtenido de leche bovina, pudiendo confirmar así la presencia endógena de NO₂-cLA en leche bovina.

A su vez se realizó la nitración gástrica sobre otra muestra de leche y se extrajeron los lípidos con el mismo método mencionado anteriormente. Como muestra la Figura 41 del Anexo, se puede ver que la cantidad de NO₂-cLA generado por la nitración supera ampliamente la cantidad endógena presente en la leche.

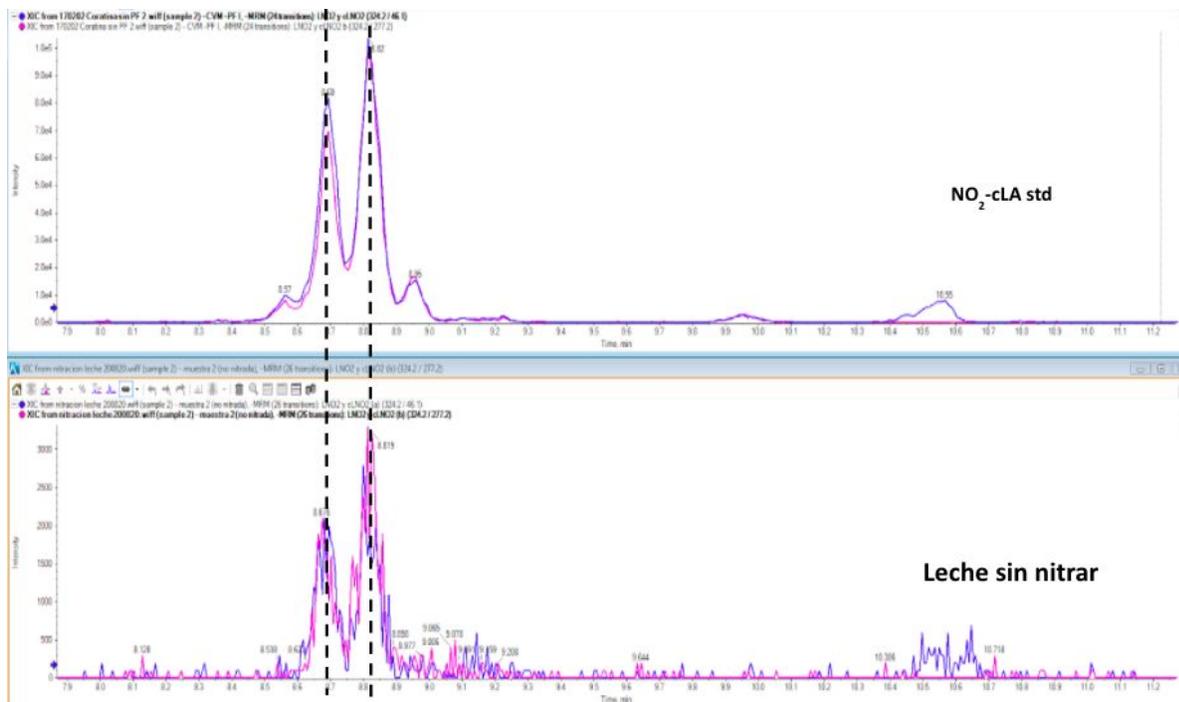


Figura 3. Cromatograma de muestra de leche sin nitrar de las dos transiciones características de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ comparado con el std de $\text{NO}_2\text{-cLA}$.

- **Análisis de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en leche en distintos periodos de lactancia.**

Se logró realizar la comparación de la cantidad de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en leche vacuna de una misma vaca en distintos periodos de lactancia (lactancia temprana y lactancia tardía) para muestras realizando una nitración gástrica ($\text{NO}_2\text{-cLA}$ exógeno) y otras sin realizarle la nitración gástrica ($\text{NO}_2\text{-cLA}$ endógeno). La Fig 4.A) muestra que hay mayor cantidad de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en la muestra de lactancia temprana comparada a la tardía (A, * $p > 0.05$) para las muestras de leche no nitradas. A su vez, la figura 4.B) muestra que los niveles de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en la nitración gástrica son similares en lactancia temprana y tardía, no observándose diferencias estadísticas entre los grupos.

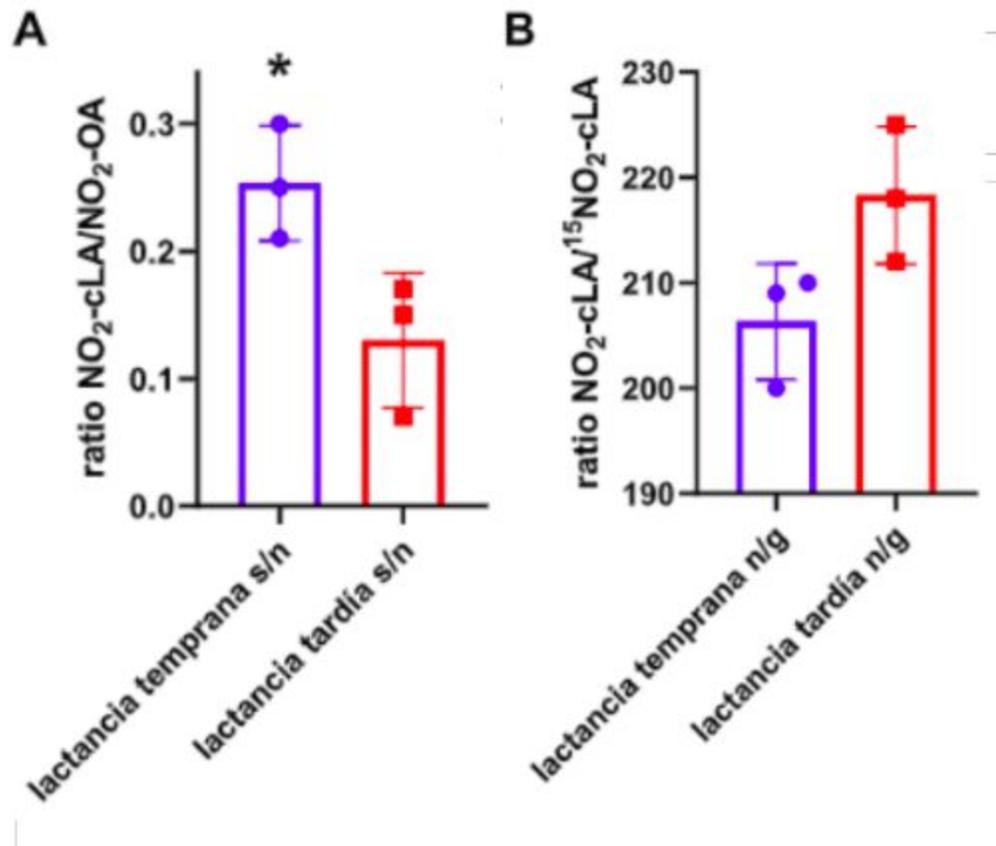


Figura 4. $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en leche en distintos periodos de lactancia. **A)** Muestra de leche sin nitrar correspondiente a lactancia temprana y lactancia tardía. El $\text{NO}_2\text{-cLA}$ presente se cuantificó con respecto a $\text{NO}_2\text{-OA}$. **B)** Corresponde a muestra de leche nitrada correspondiente a lactancia temprana y lactancia tardía. El $\text{NO}_2\text{-cLA}$ presente se cuantificó con respecto a $^{15}\text{NO}_2\text{-cLA}$.

Conclusiones

- Se logró desarrollar un nuevo método de extracción lipídica de leche bovina.
- Se logró identificar y cuantificar $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en leche bovina, algo no descrito en literatura hasta el momento.
- Se logró analizar $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en leche en distintos periodos de lactancia, mostrando mayores cantidades de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en lactancia temprana comparado con lactancia tardía.

Parte 2. Síntesis y purificación NO₂-AA (ácido nitroaraquidónico) por HPLC preparativo

Antecedentes y objetivos

Los ácidos grasos nitrados son compuestos señalizadores endógenos involucrados en procesos fisiológicos e inflamatorios. Su síntesis involucra la adición de un grupo nitro (-NO₂) a la cadena carbonada de los ácidos grasos poli-insaturados. El ácido araquidónico ((5Z, 8Z, 11Z, 14Z) -ácido icosa-5,8,11,14-tetraenoico, AA), un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos con cuatro dobles enlaces es un precursor de moléculas de señalización como prostaglandinas, tromboxanos e isoprostanos (Lima et al., 2002).

La principal vía sugerida para la síntesis de ácidos grasos nitrados, incluyendo el ácido araquidónico nitrado (NO₂AA o NO₂-AA) consiste en la adición homolítica de [•]NO₂ al AA. Como se esquematiza en la *Fig 5*, esta síntesis se produce en dos pasos. Primero el [•]NO₂ se incorpora de forma reversible al doble enlace para formar radicales β-nitroalquilados y luego reaccionan nuevamente con [•]NO₂ y por una serie de reacciones de hidrólisis y pérdida de HNO₂ generan lípidos nitrados. En ambientes poco oxidantes, predomina la reacción de nitración, mientras que en ambientes con mayor tensión de oxígeno predomina la lipo-peroxidación. En el contexto inflamatorio, la síntesis de [•]NO aumenta considerablemente por la inducción de la óxido nítrico sintasa, favoreciendo la formación de [•]NO₂ (Benavides et al., 2008).

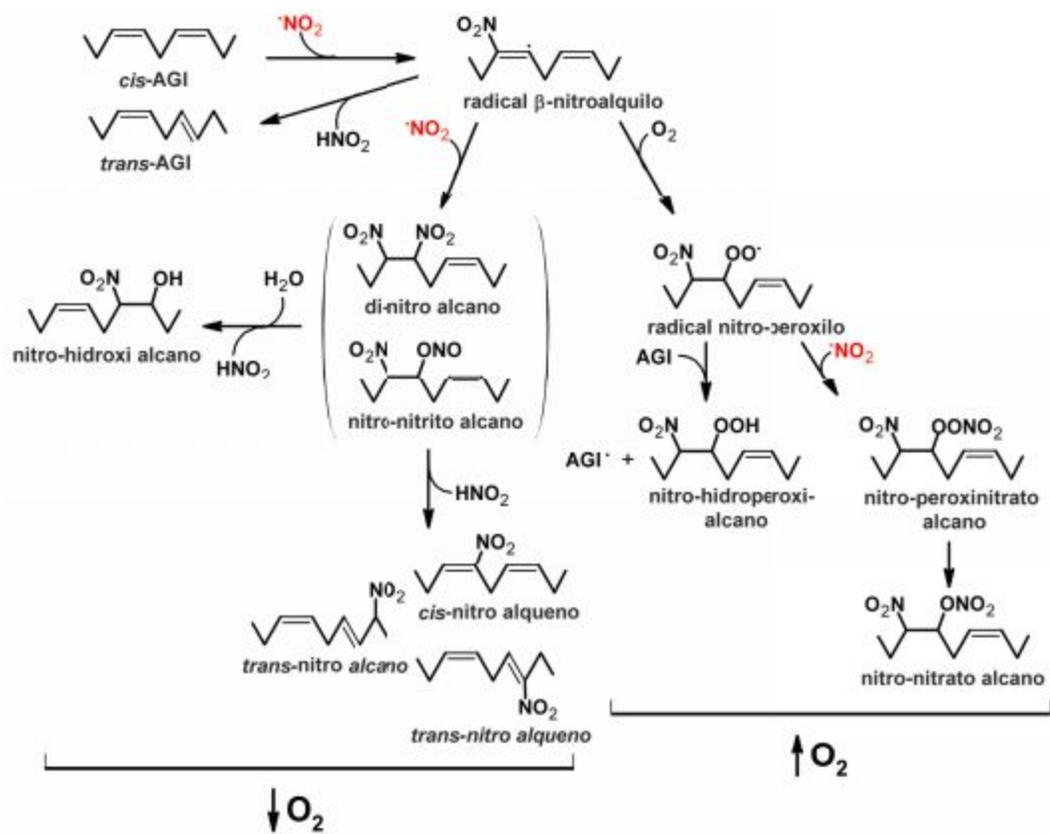


Figura 5. Mecanismo de nitración lipídica por $\cdot\text{NO}_2$ para un ácido graso insaturado.

Los nitrolípidos obtenidos en el proceso de síntesis, incluyendo al NO_2AA , son heterogéneos: pueden ser nitroalquenos o derivados nitrohidroxialquilados; y a su vez, diferentes regio-isómeros, los que podrían diferir en su rol biológico y relevancia fisiológica. En estas reacciones, se producen una variedad de isómeros esquematizados en la *Fig 6* y *7*, cuya identificación, cuantificación y eventual purificación en procesos preparativos resultan técnicamente desafiantes.

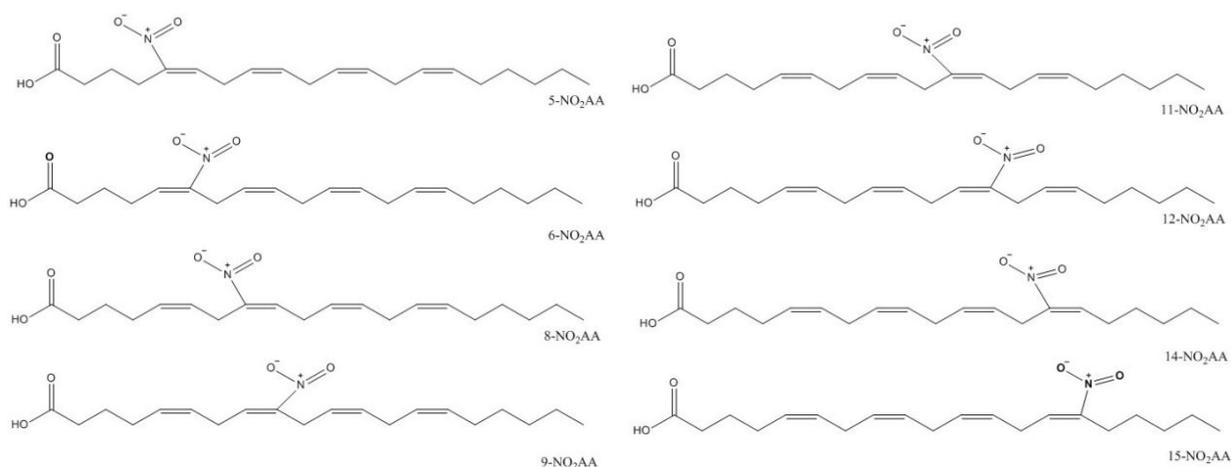


Figura 6. Isómeros posibles en la obtención de NO₂AA

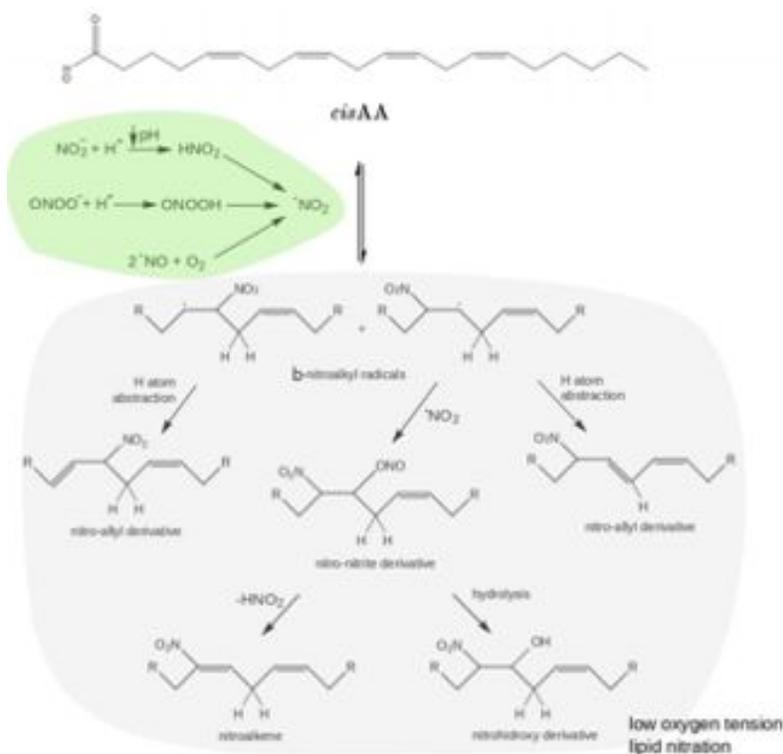


Figura 7. Posibles reacciones en la síntesis del NO₂AA

La síntesis de NO₂AA en escala de laboratorio es fundamental para realizar investigaciones sobre la reactividad del compuesto y sus funciones fisiológicas a escala molecular, celular o sistémica. En nuestro medio, la síntesis de NO₂AA fue puesta a punto en nuestro laboratorio por el Dr. Andrés Trostchansky (Trostchansky et al., 2008). Se realiza por incubación de AA con nitrito de sodio (NaNO₂) en

condiciones ácidas, que favorecen la formación de $\bullet\text{NO}_2$. Se obtiene una mezcla relativamente compleja de productos: derivados isomerizados (trans-AA es el principal producto de la reacción), oxidados, y/o nitro-alquenos, nitro-alcanos, di-nitro alquenos/alcanos, y nitro-hidroxi derivados. El NO_2AA se purifica a partir de la extracción lipídica de la mezcla por TLC preparativa, y se analiza y cuantifica por LC MS/MS. Sin embargo, una limitante para obtener NO_2AA por síntesis química es su escaso rendimiento, normalmente menor al 4%.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue realizar la síntesis de NO_2AA para optimizar las condiciones de síntesis con el fin de obtener mayor rendimiento y eventualmente simplificar la técnica. Hemos explorado nuevas condiciones de síntesis y purificación por TLC y HPLC preparativo para obtener isómeros de NO_2AA purificados.

Materiales y Métodos

- a) **Reactivos.** Para todas las síntesis se utilizó ácido araquidónico ((5Z, 8Z, 11Z, 14Z) -ácido icosa-5,8,11,14-tetraenoico, AA) de pureza >90% (Cayman chemical, CAS Number 506-32-1). El NaNO_2 fue previamente secado en estufa (105 C). Todos los solventes fueron de calidad HPLC y secados con tamices moleculares.
- b) **Síntesis.** Los procedimientos de las síntesis se describen en experimentos 16,17 18, y 19 del anexo.
- c) **Análisis por TLC.** Todas las TLC se realizaron con fase móvil: Hex:Et₂O:Ac 70:30:1 v/v
- d) **Separación por columna preparativa de sílica gel.** Para la purificación a gran escala de NO_2AA a partir de la mezcla de reacción se empaquetó una columna de vidrio de 26 x 3 cm con sílica y se equilibró en hexano. La alta capacidad de la columna permitió sembrar en una única vez el aceite obtenido a partir de las 4 síntesis. Tras la siembra del aceite, la fase estacionaria fue lavada con hexano y a continuación se pasó por goteo la fase móvil en un gradiente desde hexano:dietiléter:Ac 80:20:0.5 hasta 70:30:0.5. Se analizaron todas las fracciones colectadas por TLC analítica como se muestra en la *figura 8*.

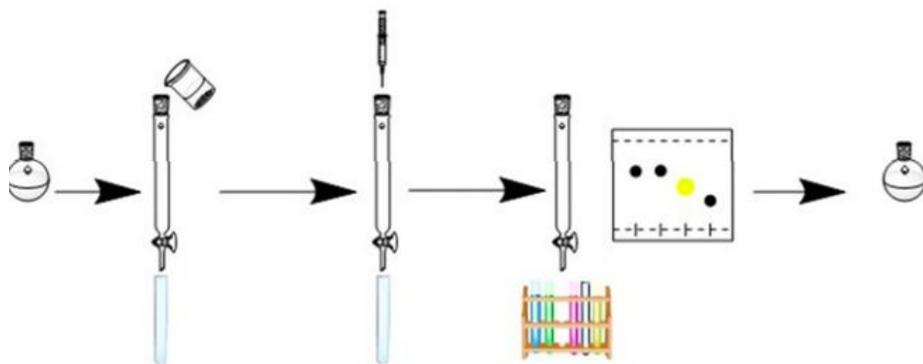


Figura 8. Esquema de separación de la mezcla de isómeros y otros subproductos por columna cromatográfica.

- e) **Análisis por H¹RMN.** El solvente utilizado fue CDCl₃ (cloroformo deuterado) realizado en el equipo de la Facultad de Química UDELAR (400 MHz).
- f) **Análisis por HPLC-MS/MS.** Los estudios de MS se realizaron con un triple cuadrupolo equipado con trampa de iones (QTRAP 4500, Applied Biosystems/MDS SCiEX), con una fuente de ionización por electrospray a presión atmosférica (ESI-MS). Para la identificación de NO₂AA y el análisis de la mezcla de reacción utilizamos los siguientes modos de escaneo: 1) Q1 scan: en este modo se analizan las relaciones masa/carga (*m/z*) de todos los productos presentes en la solución en el rango de *m/z* seleccionado y 2) enhanced product ion scan (EPI): este modo se utiliza para aumentar la sensibilidad y generar un patrón característico.

El solvente utilizado fue MeOH y las muestra se diluyeron en relación 1:1x10⁴ y se analizaron utilizando el método *multiple reaction monitoring* (MRM).

El objetivo de esta etapa fue detectar la presencia y semi cuantificar los compuestos separados mediante cc que se pueden esperar de la síntesis en medio ácido (NO₂AA, *m/z*: 348/46, NO₂OHAA *m/z*: 366/46, AA *m/z*: 301/257, (NO₂)₂AA *m/z*: 393/46, hidroxyAA (HETE) *m/z* 319/301, derivados oxidados del nitroAA (presuntamente epóxidos o hidroperóxidos *m/z* 380/46)). Esta etapa permite conocer la composición de las mezclas de reacción enriquecidas para la puesta a punto de la siguiente etapa.

- g) **Puesta a punto para la separación de isómeros por HPLC preparativo.** De acuerdo a reportes previos de nuestro laboratorio, la nitración de AA genera una mezcla de isómeros posicionales que pueden ser separados por HPLC; basados en este reporte pretendemos escalar de forma preparativa la purificación de

cada isómero. Utilizamos para ello una columna C18 semi-preparativa (5 μ m, 10 x 250mm, Phenomenex Luna Omega) con un sistema gradiente entre A (agua/ácido fórmico) y B (acetonitrilo/ácido fórmico) en las siguientes condiciones: 35 % B (0 a 5 min), 35-100 % B (5 a 55 min), 100-35 % B (55 a 60 min), 35% B (60-62 min (reequilibración) a un flujo de 3 mL/min como se muestra en la *figura 9*. Se inyectaron las mezclas obtenidas en la separación por columna preparativa por corrida 200 μ L y las bandas con máximo de absorbancia a 274 nm fueron colectadas y se les realizó una extracción, para luego analizarlas por HPLC-MS/MS.

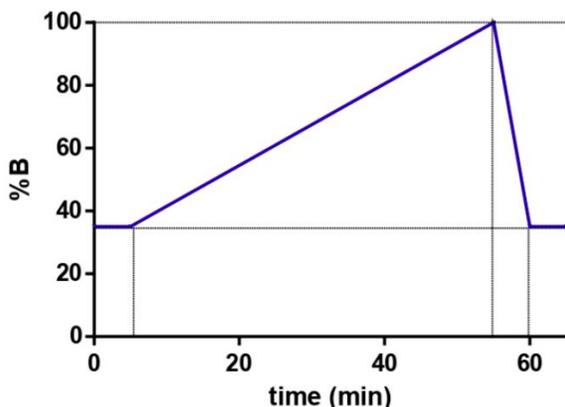


Figura 9. Gráfica del gradiente usado en la separación por HPLC.

Con el objetivo de maximizar la separación de isómeros, buscando optimizar los tiempos de trabajo y disminuir la oxidación de los compuestos de interés, en esta instancia nos encontramos poniendo a punto las siguientes variables:

- Matriz de muestra: MeOH; ACN y fase móvil inicial (65%A, 35%B)
- Porcentaje de ácido fórmico en fase móvil. Se ensayaron concentraciones de 0.05% y 0.1% basados en reportes de la bibliografía (Woodcock et al., 2014), a su vez en esta etapa se puede considerar el uso de otros ácidos para generar una mejor separación.
- Extracción de fracciones colectadas. se evaluaron 3 distintas extracciones luego de la separación de los isómeros por HPLC: i) Método de hexano, ii) Acetato de etilo (AcOEt) y H₂O 2:1 v/v, iii) Formiato de etilo (FormOEt) y H₂O 2:1 v/v.

La finalidad de las distintas extracciones fue para evaluar qué método de extracción genera un mejor rendimiento extractivo, a la vez que no altera la muestra (oxidación de los nitro lípidos) y la velocidad de evaporación del solvente.

h) Análisis en HPLC-MS/MS de fracciones obtenidas por pHPLC.

El $\text{NO}_2\text{-AA}$ se detectó en el modo de ionización negativo por MRM siguiendo la pérdida del grupo nitro (m/z 348/46) y otros fragmentos característicos como se muestra en la *figura 10*. Se evaluó tiempo retención, intensidad relativa de señales y pureza. Las fracciones que arrojen una pureza de señal $\geq 90\%$ y tiempo de retención superponible serán consideradas el mismo isómero y serán pooleadas para posterior evaporación y caracterización.

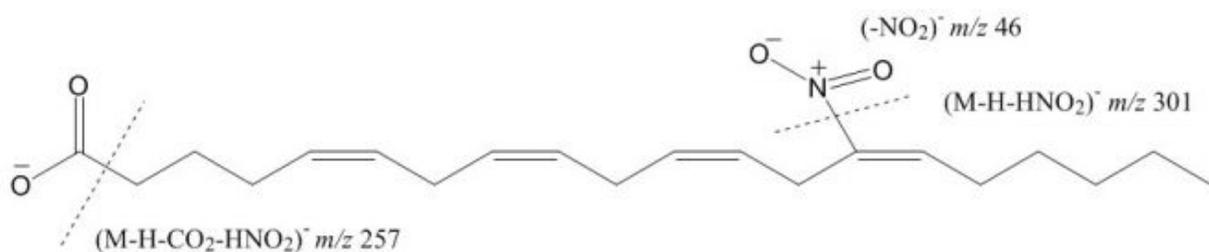


Figura 10. Fragmentación característica del $\text{NO}_2\text{-AA}$.

Resultados y discusión

Síntesis de NO_2AA . Se logró sintetizar NO_2AA mediante dos instancias de síntesis ácida en hexano (similar a la descrita por Trostchansky et al., 2008) y dos instancias de síntesis bifásica. Se obtuvieron rendimientos similares, aunque, como muestra la *Figura 11* parece ser que las mediante síntesis bifásica obtiene un rendimiento mayor.

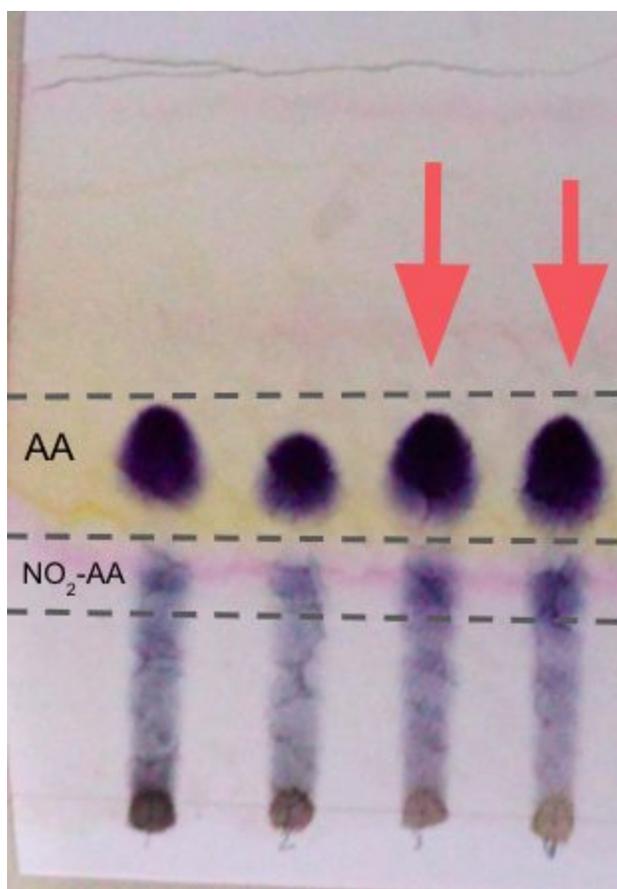


Figura 11. Comparación mediante TLC de las síntesis. Primer carril: Primera síntesis ácida. Segundo carril: síntesis ácida anhidra. Tercer carril: primer síntesis bifásica, Cuarto carril: segunda síntesis bifásica

Purificación de distintos isómeros de NO₂AA mediante columna preparativa de sílica gel y análisis mediante H¹RMN. Se obtuvieron 3 fracciones con NO₂AA, dos de ellas fueron evaporadas y resuspendidas en CDCl₃, y analizadas por RMN. Una de las fracciones resultó contener NO₂AA coeluido con un compuesto menos polar por lo que se le realizó una pTLC (TLC preparativa) posterior a la CC. Luego de separar dos bandas correspondientes a NO₂AA se extrajo y se evaporó, luego se procedió de igual manera que las otras dos fracciones.

En las *figuras 12 y 13* se pueden apreciar los espectros H¹RMN del AA como referencia (*figura 12*) y de las cuatro fracciones obtenidas luego de realizar la separación por CC y pTLC (*figura 13*).

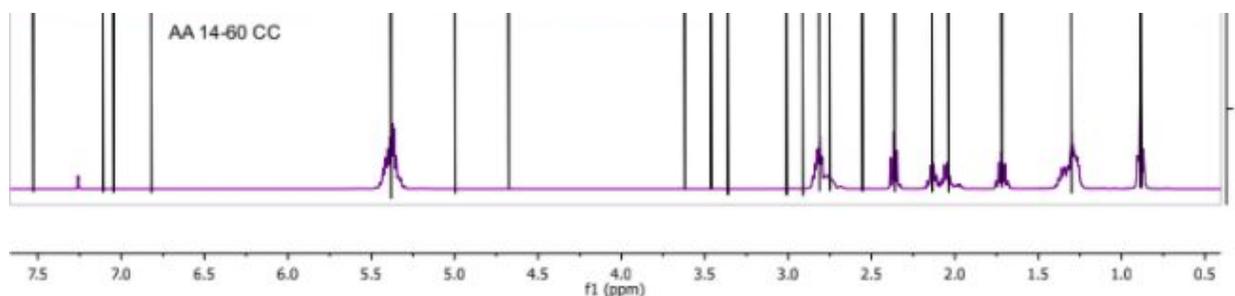


Figura 12. Espectro H¹RMN de AA.

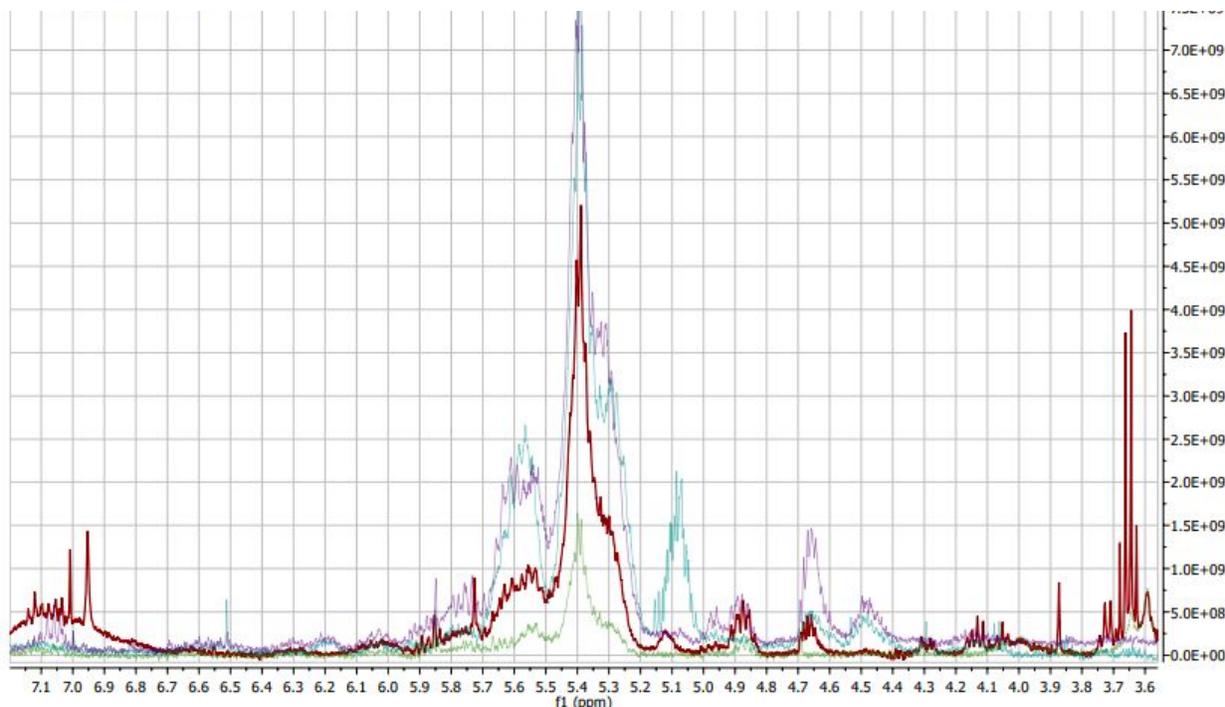


Figura 13. Espectro RMN de fracciones obtenidas. Los colores corresponden a diferentes fracciones: rojo, fracción CC-pTLC carácter polar; violeta CC-pTLC carácter apolar; turquesa CC carácter polar, verde CC carácter apolar.

Análisis comparativo de los espectros. Se puede apreciar que en todos los espectros de la Figura 13 está el paquete de los H unidos a carbonos sp² que aparecen en un acúmulo de señales entre 5.0-5.5 ppm al igual que en el espectro del araquidónico (Figura 12), estas señales se deben al sistema de dobles enlaces característico del AA y otros ácido grasos insaturados.

Las señales de 7-7.15 ppm corresponden a los H unidos a un carbono sp² vecino a un grupo nitro (carbonos unidos al alqueno). Estas señales son las que caracterizan al NO₂-AA nitroalqueno y se ven en mayor medida en las los espectros correspondientes a la fracción CC más apolar y las dos fracciones de la pTLC.

En todos los espectros de la *Figura 13* hay señales entre 4-5 ppm, estas señales son atribuibles a protones unidos a carbonos que tienen cerca un oxígeno, sea un hidroxilo, peróxido, epóxido o también se puede atribuir a que el nitro lípido no sea nitroalqueno y sea nitroalcano. Este resultado es esperable dado los subproductos de la reacción e indica que la estrategia de CC o CC-pTLC no permiten obtener una mezcla pura de isómeros NO₂AA nitroalquenos, por lo tanto se requiere de una posterior separación por pHPLC.

Por lo tanto se puede concluir de esta purificación por columna que se logró exitosamente eliminar el AA que quedó sin reaccionar o que se isomerizó a la forma trans, y enriquecer considerablemente la fracción en NO₂AA.

Análisis por HPLC-MS/MS de fracciones obtenidas por columna preparativa. Las *Figura 15 a 17* muestran espectros XIC correspondientes a una fracción obtenida de la columna o pTLC como lo indican respectivamente. En cada una de ellas se puede observar el espectro XIC del NO₂AA (A) (producto de interés) y del ácido Nitro-epoxi-araquidónico (B) (contaminante). Se comparó el cromatograma XIC del NO₂AA con el del ácido Nitro-epoxi-araquidónico debido a que era el contaminante en mayor concentración, pero a su vez había, en menor medida, AA, NO₂(OH)AA y (NO₂)₂AA.

En las *figuras 14, 16 y 17 A)* se puede apreciar el tiempo de retención correspondiente al NO₂AA con una intensidad predominante. En cambio, en la *Figura 15* esta intensidad no es la más relevante, confirmando así la conclusión obtenida por los espectros de H¹RMN que la fracción CC más polar era a su vez la más contaminada.

A su vez se confirma que las pTLC son una herramienta para purificar aún más el NO₂AA ya que se obtuvieron en los XIC las intensidades más altas correspondientes a NO₂AA y más bajas con respecto al compuesto contaminante ácido Nitro-epoxi-araquidónico.

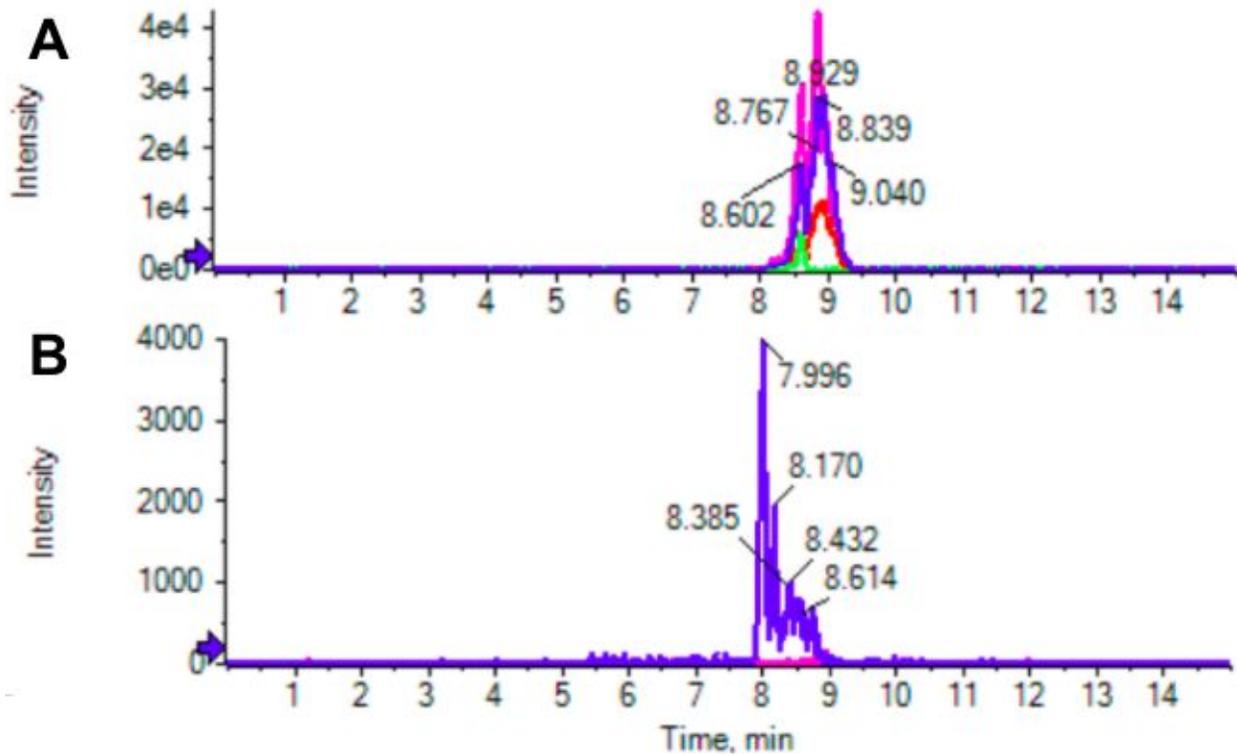


Figura 14. Espectro XIC (*extracted ion chromatogram*) de la fracción CC más apolar. A) Espectro XIC del NO_2AA con transiciones $m/z= 348/46$, $384/301$, $348/257$ y $348/142$. B) Espectro XIC del ácido Nitro-epoxi-araquidónico con transiciones $m/z= 380/46$ y $384/46$

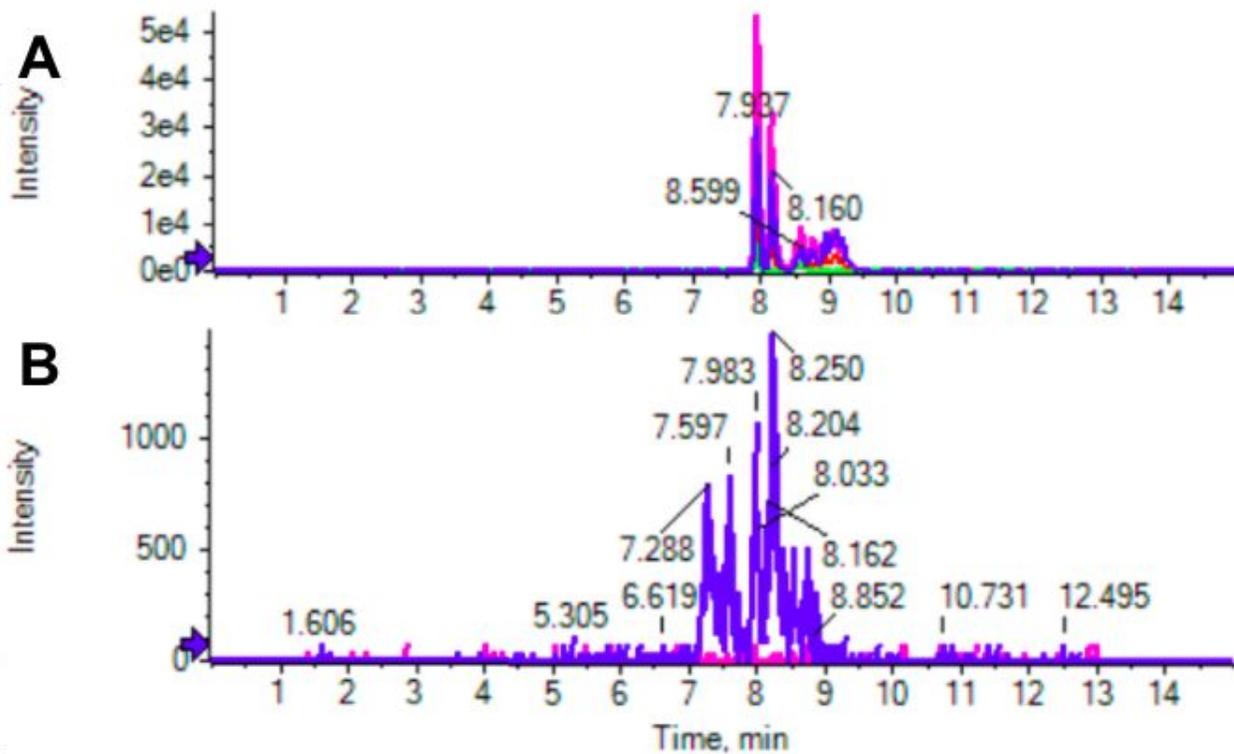


Figura 15. Espectro XIC (*extracted ion chromatogram*) de la fracción CC más polar .
 A) Espectro XIC del NO₂AA con transiciones $m/z= 348/46, 384/301, 348/257$ y $348/142$. B) Espectro XIC del ácido Nitro-epoxi-araquidónico con transiciones $m/z= 380/46$ y $384/46$

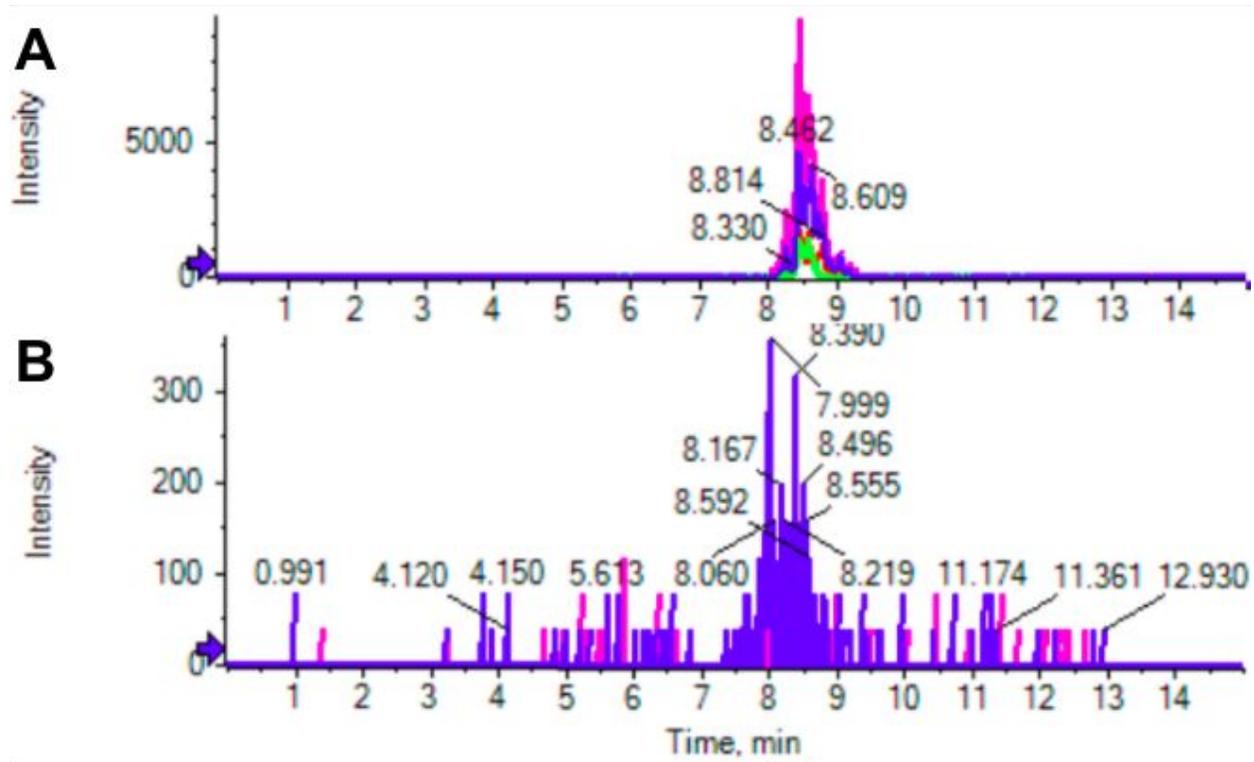


Figura 16. Espectro XIC (*extracted ion chromatogram*) de la fracción pTLC más apolar.
 A) Espectro XIC del NO₂AA con transiciones $m/z= 348/46, 384/301, 348/257$ y $348/142$.
 B) Espectro XIC del ácido Nitro-epoxi-araquidónico con transiciones $m/z= 380/46$ y $384/46$

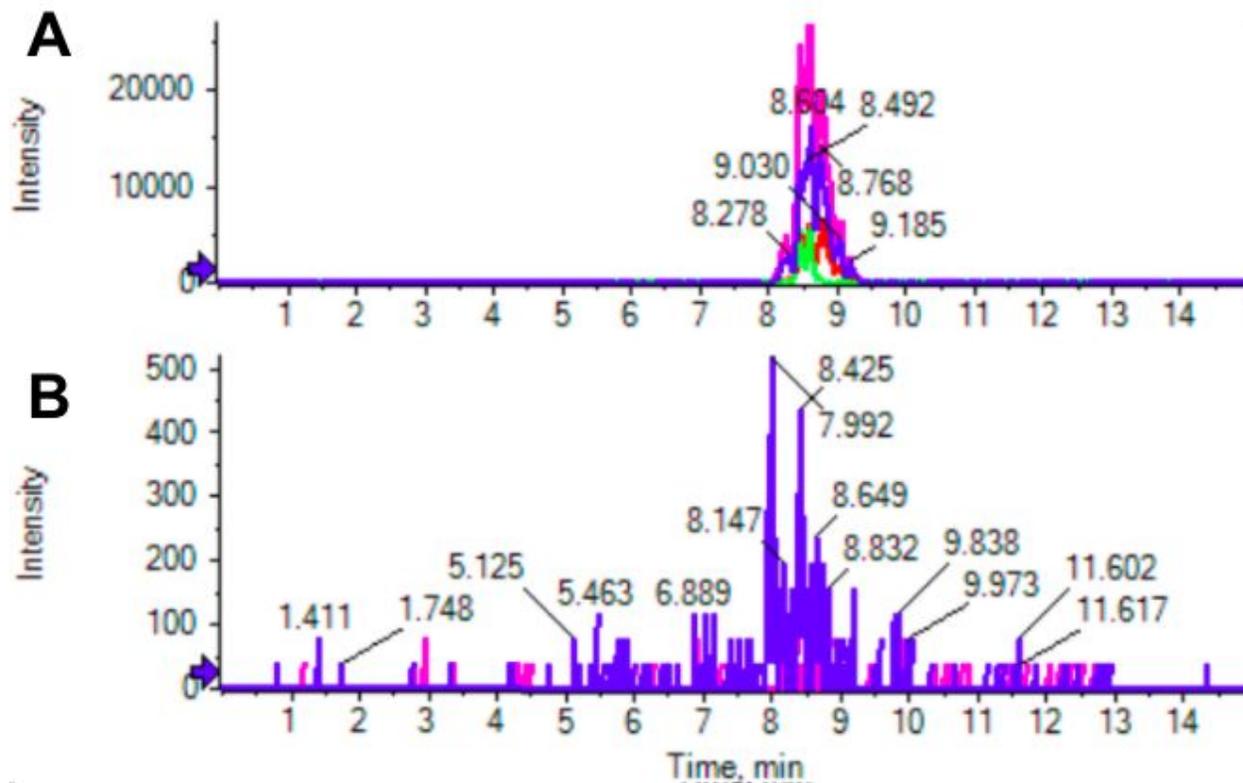


Figura 17. Espectro XIC (*extracted ion chromatogram*) de la fracción pTLC más polar. A) Espectro XIC del NO₂AA con transiciones $m/z = 348/46, 384/301, 348/257$ y $348/142$. B) Espectro XIC del ácido Nitro-epoxi-araquidónico con transiciones $m/z = 380/46$ y $384/46$

Separación de fracciones obtenidas por columna preparativa mediante pHPLC (HPLC preparativo). Se obtuvieron 4 fracciones purificadas a la salida del HPLC como se muestra en la figura 14.

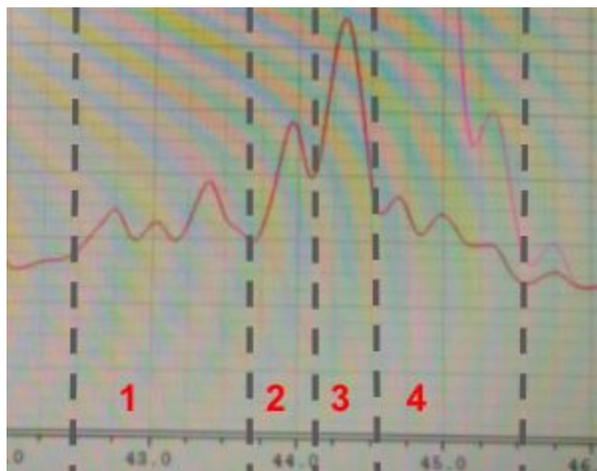


Figura 18. Espectro UV (274 nm) del HPLC con indicaciones de fracciones colectadas. Delimitadas con rayas negras punteadas se puede ver las 4 fracciones colectadas del pHPLC.

En la Figura 18 se pueden apreciar las 4 fracciones obtenidas del pHPLC, Esperamos

encontrar una pureza en orden decreciente de: 3>2>1≈4. En el siguiente punto se detalla un análisis por HPLC-MS/MS de las 4 fracciones obtenidas de la pTLC más apolar.

Los resultados sobre matriz de muestra al inyectar en el HPLC, % Ácido fórmico y método extractivo de las fracciones obtenidas se detalla a continuación:

- Matriz de muestra: Se inyectó la muestra en ACN obteniendo una resolución satisfactoria y mayor a la de su dilución en la fase móvil (ya que precipita) y en MeOH.
- % Ácido fórmico: Se determinó que el ácido fórmico en concentración de 0.1% en fase móvil mejoraba la resolución en el HPLC comparado con el ácido fórmico en 0.05%, por lo tanto se utilizó en esta concentración.
- Extracción: La mejor extracción se dió con el método de hexano ya que es en la que menos se degrada el NO₂AA (ver sección de resultados “Análisis por HPLC-MS/MS de distintas fracciones obtenidas tras la separación por pHPLC”), a su vez ,también, porque es en la que se demora menos tiempo en evaporar el solvente.

Análisis por HPLC-MS/MS de distintas fracciones obtenidas tras la separación por pHPLC de la pTLC. En general, considerando la mezcla de isómeros de NO₂AA, se pudo observar que los contaminantes mayoritarios son el AA, el nitrohidroxi-AA, el dinitro-AA y nitroepoxi-AA, al igual que se mencionó en “Análisis por HPLC-MS/MS de fracciones obtenidas por columna preparativa” (sección resultados). Sin embargo, tras la separación por pHPLC se puede apreciar que estos compuestos se encuentran en una concentración relativa conjunta total de 10% en cantidad con respecto al NO₂-AA (Fig 19). Por lo tanto, la purificación de la mezcla de isómeros se logró hasta un 90%.

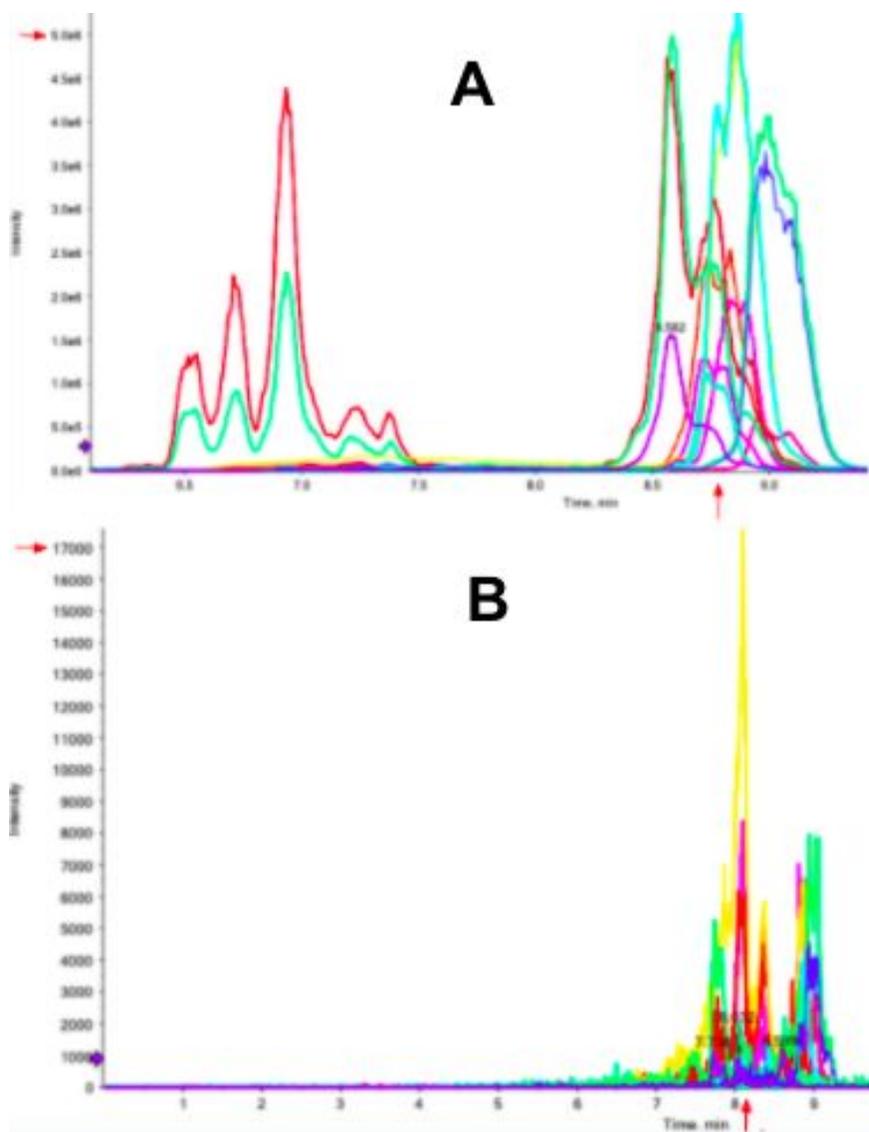


Figura 19. XIC: Tiempo de retención e intensidad relativa de señales correspondientes al A. NO_2AA y B. subproducto $(\text{NO}_2)_2\text{AA}$.

Particularmente, respecto de los isómeros de NO_2AA separados por pHPLC, las variables estudiadas hasta el momento no nos han permitido separarlos de forma eficiente, ya que varias señales parecen co-eluir con una señal adyacente (impureza), como se muestra en la Figura 20. Esto indica que es necesario seguir optimizando las condiciones de separación tal como se planteó en el ítem g) de la sección materiales y métodos.

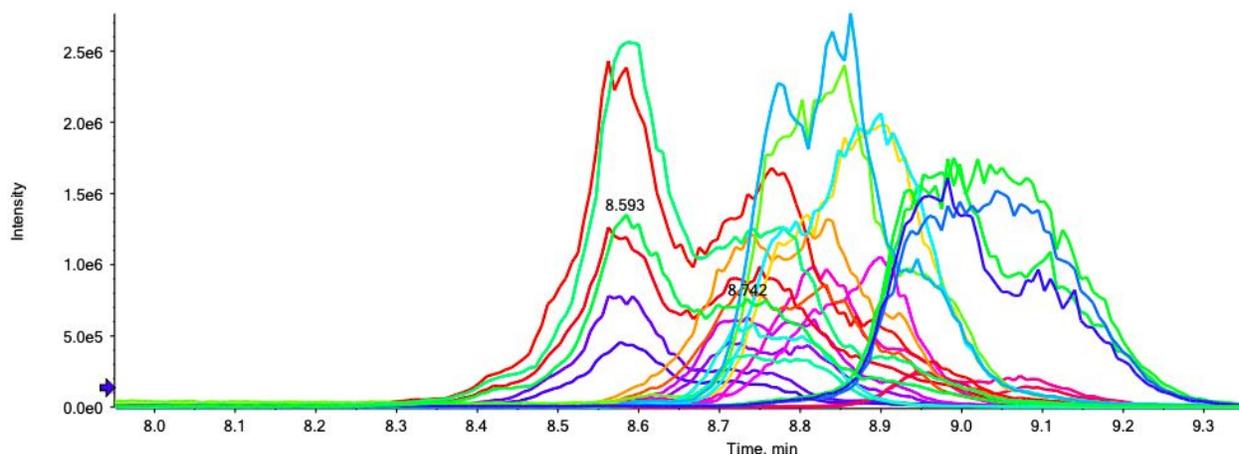


Figura 20. XIC: Tiempo de retención e intensidad relativa de señales correspondientes al NO_2AA (m/z 348/46).

Por último, es importante destacar que en las extracciones en las cuales se le agregó agua a la fracción eluida del pHPLC (AcOEt y FormOEt) se observa tras el análisis en MS como hay una mayor degradación del NO_2AA (figura 19 y 21), potencialmente mediante un mecanismo de hidratación, por lo tanto el mejor método de extracción para luego del pHPLC es el método de Hexano ya que es en el que en menor medida se degrada el NO_2AA .

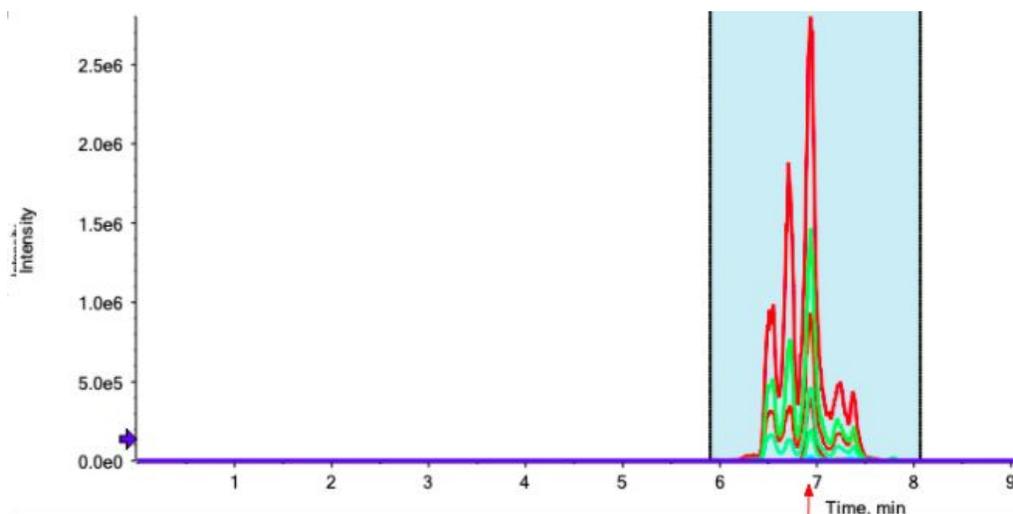


Figura 21. XIC: Tiempo de retención e intensidad relativa de señales correspondientes al $\text{NO}_2(\text{OH})\text{AA}$ (m/z 366/46).

Conclusiones

- Se logró realizar la síntesis de NO₂AA mediante dos formas similares a la descrita por Trostchansky et al., 2008 y a su vez dos síntesis bifásicas no descritas en literatura hasta el momento para el NO₂AA.
- Se logró purificar mediante CC y pTLC los productos de reacción obtenidos y analizar estos por H¹RMN y HPLC-MS/MS.
- Se logró purificar las fracciones de CC y pTLC obtenidas por pHPLC y analizar estas nuevas fracciones obtenidas por HPLC-MS/MS y concluir que el mejor método de extracción es el método de hexano comparado con el de AcOEt y FormOEt.

Referencias

Fazzari M, Trostchansky A, Schopfer FJ, Salvatore SR, Sánchez-Calvo B, Vitturi D, Valderrama R, Barroso JB, Radi R, Freeman BA, Rubbo H. Olives and olive oil are sources of electrophilic fatty acid nitroalkenes. PLoS One. 2014 Jan 14;9(1):e84884. doi: 10.1371/journal.pone.0084884.

Jensen, S.K. (2008), Improved Bligh and Dyer extraction procedure. Lipid Technology, 20: 280-281. <https://doi.org/10.1002/lite.200800074>

Mastrogiovanni M, Trostchansky A, Rubbo H. Data of detection and characterization of nitrated conjugated-linoleic acid (NO₂-cLA) in LDL. Data Brief. 2019 Dec 20;28:105037. doi: 10.1016/j.dib.2019.105037. PMID: 31909129; PMCID: PMC6940714.

Bauman DE, Mather IH, Wall RJ, Lock AL. 2006. Journal of Dairy Science, 89: 1235-1243

Lock AL, Bauman DE. 2004. Lipids. 2004 Dec;39(12):1197-206

Ferlay A., Bernard L., Meynadier A., Malp

Ferreira AM, Ferrari MI, Trostchansky A, Batthyany C, Souza JM, Alvarez MN, et al. Biochem J. 2009;417(1):223-34 Fuke G., Nornberg JL. 2017. . Crit Rev Food Sci Nutr. 2017 Jan 2;57(1):1-7.

Trostchansky A, Souza JM, Ferreira A, Ferrari M, Blanco F, Trujillo M, et al. Synthesis, isomer characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate. *Biochemistry*. 2007;46(15):4645-53.

Bonacci G, Ascitutto E.K., Woodcock S.R., Salvatore S.R., Freeman B.A., and Schopfer F.J. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2011;22(9):1534-51.

Gonzalez-Perilli L, Alvarez MN, Prolo C, Radi R, Rubbo H, Trostchansky A. *Free Radic Biol Med*. 2013;58:126-33
Heidarpour M, Mohri M, Fallah-Rad AH, Dehghan Shahreza F, Mohammadi M. 2012. *A. Vet Rec*. 171(9):219. doi: 10.1136/vr.100947

Trostchansky A, Souza JM, Ferreira A, Ferrari M, Blanco F, Trujillo M, Castro D, Cerecetto H, Baker PR, O'Donnell VB, Rubbo H. Synthesis, isomer characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate. *Biochemistry*. 2007 Apr 17;46(15):4645-53. doi: 10.1021/bi602652j. Epub 2007 Mar 21.

Lima, E. S., Di Mascio, P., Rubbo, H., and Abdalla, D. S. (2002) Characterization of linoleic acid nitration in human blood plasma by mass spectrometry, *Biochemistry* 41, 10717-10722.

Balazy, M., and Poff, C. D. (2004) Biological nitration of arachidonic acid, *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2, 81-93.

Goodwin, D. C., Landino, L. M., and Marnett, L. J. (1999) Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis, *FASEB J.* 13, 1121-1136.

Trostchansky, A., O'Donnell, V. B., Goodwin, D. C., Landino, L. M., Marnett, L. J., Radi, R., and Rubbo, H. (2007) Interactions between nitric oxide and peroxynitrite during prostaglandin endoperoxide H synthase catalysis: a free radical mechanism of inactivation, *Free Radical Biol. Med.* 42, 1029-1038.

Benavides Trujillo, Maria Carolina, & Pinzón Tovar, Alejandro. (2008). Oxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas. *Colombian Journal of Anesthesiology*, 36(1), 45-52. Retrieved December 13, 2020.

Woodcock SR, Salvatore SR, Bonacci G, Schopfer FJ, Freeman BA. Biomimetic nitration of conjugated linoleic acid: formation and characterization of naturally occurring

conjugated nitrodienes. *J Org Chem.* 2014 Jan 3;79(1):25-33. doi: 10.1021/jo4021562. Epub 2013 Dec 19. PMID: 24350701; PMCID: PMC4061743.

Napolitano A, Camera E, Picardo M, d'Ischia M. Acid-promoted reactions of ethyl linoleate with nitrite ions: formation and structural characterization of isomeric nitroalkene, nitrohydroxy, and novel 3-nitro-1,5-hexadiene and 1,5-dinitro-1, 3-pentadiene products. *J Org Chem.* 2000 Aug 11;65(16):4853-60. doi: 10.1021/jo000090q. PMID: 10956463.

SR, Salvatore SR, Bonacci G, Schopfer FJ, Freeman BA. Biomimetic nitration of conjugated linoleic acid: formation and characterization of naturally occurring conjugated nitrodienes. *J Org Chem.* 2014 Jan 3;79(1):25-33. doi: 10.1021/jo4021562. Epub 2013 Dec 19. PMID: 24350701; PMCID: PMC4061743

O'Donnell VB, Eiserich JP, Chumley PH, Jablonsky MJ, Krishna NR, Kirk M, Barnes S, Darley-Usmar VM, Freeman BA. Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. *Chem Res Toxicol.* 1999 Jan;12(1):83-92. doi: 10.1021/tx980207u. PMID: 9894022.

Woodcock SR, Bonacci G, Gelhaus SL, Schopfer FJ. Nitrated fatty acids: synthesis and measurement. *Free Radic Biol Med.* 2013 Jun;59:14-26. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.015. Epub 2012 Nov 29. PMID: 23200809; PMCID: PMC4020000.

Anexo

Experimentos realizados

Experimento 1

Objetivo: Extracción lipídica de muestra de leche número 9898

Método: Bligh and Dyer

Procedimiento:

Tubo 1: 1.5 mL leche, luego vortex y centrifugar.

Tubo 2: 1 mL leche + 0.5 mL MeOH, luego vortex y centrifugar.

Tubo 3: 1.5 mL leche luego vortex, sin centrifugar.

Posteriormente de tubos 1 y 2 y 3 se tomó sobrenadante y se transvasó 0.55 mL a un tubo de vidrio de centrifuga.

Luego, a tubos 1, 2 y 3 se les realizó una extracción B&D. Posteriormente a estos tres tubos de centrifuga se los centrifugó a 1800 rpm, 4°C por 5 minutos, se tomó el 90% de la fase inferior, se evaporó solvente y se retomó en 0.1 mL de CHCl_3 para luego realizar una TLC la cual se muestra en la figura 22.

Resultados:



Figura 22. TLC de extracción.

Conclusión:

- Se logró la extracción lipídica exitosamente. Obteniendo la separación de los lípidos por TLC y logrando identificar presuntos TAG (triglicéridos).
- Hay defectos en la siembra de TLC ya que hay una sobre siembra de producto.

Experimento 2

Objetivo: Extracción lipídica de muestra de leche número 9567

Método: Bligh and Dyer

Procedimiento:

Tubo 1: 1 mL leche, 0.5 mL MeOH, luego vortex y centrifugar.

Tubo 2: 1 mL leche + 0.2 mL MeOH, luego vortex y centrifugar.

Tubo 3: 1 mL leche + 0.1 mL MeOH, luego vortex y centrifugar.

Posteriormente de tubos 1 y 2 y 3 se tomó sobrenadante y se transvasó 0.55 mL a tubo de vidrio de centrifuga.

Luego, a los tubos 1, 2 y 3 se les realizó una extracción B&D. Al notar que no se separaron las fases se agregó 1 Vol de CHCl_3 y se vortexeó.

Estos tres tubos de centrifuga se centrifugaron a 1800 rpm, 4°C por 5 minutos, se tomó el 90% de la fase inferior, se evaporó solvente y se retomó en 0.1mL de CHCl_3 para luego realizar una TLC la cual se muestra en la figura 23.

Resultados:

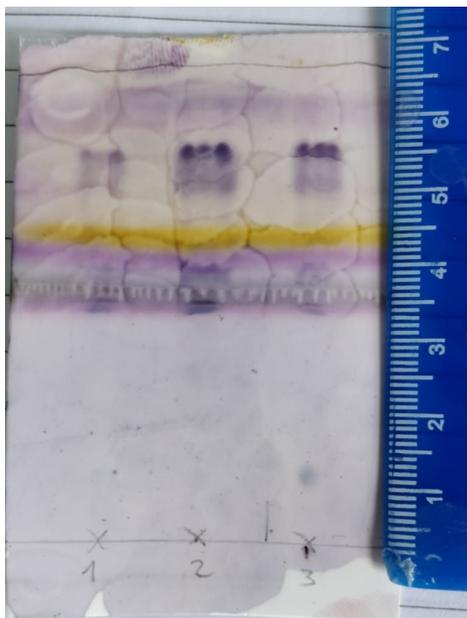


Figura 23. TLC de extracción.

Conclusión:

- Se logró la extracción exitosamente.
- La mejor extracción se dió con el tubo 2 (proporción leche:MeOH 1:5).

Experimento 3

Objetivo: Extracción lipídica de muestra de leche número 9567 para confirmar método de experimento 2.

Método: Bligh and Dyer.

Procedimiento:

Tubo 1: 1 mL leche, 0.5 mL MeOH luego vortex y centrifugar.

Tubo 2: 1 mL leche + 0.2 mL MeOH luego vortex y centrifugar.

Tubo 3: 1 mL leche + 0.1 mL MeOH luego vortex y centrifugar.

Posteriormente de tubos 1 y 2 y 3 se tomó sobrenadante y se transvasó 0.55 mL a tubo de vidrio de centrifuga.

Luego, tubos 1, 2 y 3 se le realizó un B&D. Al notar que no se separaron las fases se agregó 1 Vol de CHCl_3 y se vortexeó. Luego de llevar a sequedad se retomó en 0.1mL de CHCl_3 para luego realizar una TLC la cual se muestra en la figura 24.

Resultados:

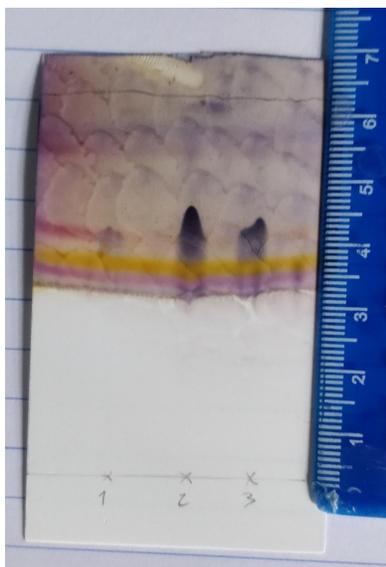


Figura 24. TLC de extracción.

Conclusión:

- Se logró la extracción exitosamente. Obteniendo presuntos TAG.
- La mejor extracción se dió con el tubo 2 (proporción leche:MeOH 1:5) confirmando así resultados del experimento 2.

Experimento 4

Objetivo: Probar nuevo método de extracción y compararlo con los anteriores.

Métodos: Método de extracción con Butanol:MeOH: CHCl_3 .

Procedimiento:

Tubo 1: 1 mL leche muestra número 9567 + 0.2 mL MeOH, luego vortex.

Tubo 2: 1 mL leche muestra número 9567 y centrifugar, luego vortex.

Tubo 3: 1 mL leche muestra número 9567, luego vortex.

Luego se centrifugó y se tomaron 0.55 mL sobrenadante y se transvasaron a un tubo de centrifuga junto con 5.5 ml de una solución de Butanol:MeOH: CHCl_3 3:5:4 v/v.

Posteriormente se vortexeó y se llevó a centrifuga por 15 min a 15000g y 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo y se evaporó el solvente. Finalmente se agregó 0.1 mL de CHCl_3 y se corrió por TLC.

TLC: No se realizó TLC ya que se encontró luego de evaporar solvente un sólido blanco no característico de lípidos purificados

Resultados y conclusión: No se logró purificar lípidos. Debido a un error, en vez de centrifugar la muestra a 15000 g se hizo 1500 g, lo que podría explicar la falta de resultados positivos en la purificación de lípidos.

Experimento 5

Objetivo: Repetir el experimento 4 con centrifugación a 15000 g.

Métodos: Método de extracción con Butanol:MeOH: CHCl_3 .

Procedimiento:

Tubo 1: 1 mL leche muestra número 9567 + 0.2 mL MeOH, luego vortex.

Tubo 2: 1 mL leche muestra número 9567 y centrifugar, luego vortex.

Tubo 3: 1 mL leche muestra número 9567, luego vortex.

Luego se centrifugó y se tomaron 0.55 mL sobrenadante y se transvasaron a un tubo de centrífuga junto con 5.5 ml de una solución de But:MeOH: CHCl_3 3:5:4 v/v. Posteriormente se vortexeó y se llevó a centrifuga por 15 min a 15000g y 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo y se evaporó el solvente. Finalmente se agregó 0.1 mL de CHCl_3 y se corrió por TLC como se muestra en la figura 25.

Resultados:

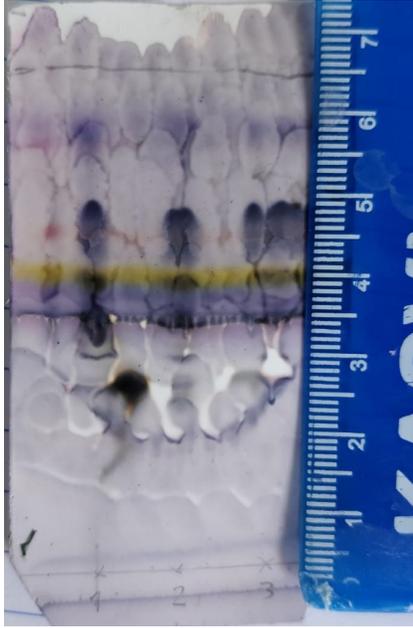


Figura 25. TLC luego de extracción

Conclusión

- No se logró purificar los lípidos ya que luego de llevar a sequedad habían cristales (presuntos azúcares) remanentes.
- Sí se logró extraer los lípidos y realizar TLC satisfactoriamente obteniendo como mejor extracción el tubo 1.

Experimento 6

Objetivo: Obtener extracción lipídica con método de hexano.

Métodos: Método de Hexano.

Procedimiento:

Se tomó en un tubo eppendorf 1 mL leche muestra número 9567 + 0.2 mL MeOH, luego se vortexeó. Luego se centrifugó y se tomaron 0.55 mL sobrenadante y se transvasaron a un tubo para realizar el método de extracción de Hexano. Luego se llevó a centrifuga por 5 min a 1800g y 4°C. Se transfirió la fase superior a un tubo de ensayo, luego a la fase inferior se le agregaron 1.375 mL de Hexano, se vortexeó y se centrifugó en mismas condiciones ya mencionadas, luego se tomó la fase superior, se juntó con la fase superior anteriormente extraída y se evaporó el solvente. Finalmente se agregó 0.1 mL de CHCl_3 y se corrió por TLC junto con tubo 1 (número 1 en la TLC)

del experimento 5 y tubo 2 del experimento 2 (número 3 en la TLC) con misma FM utilizada días antes. En las figuras 26 y 27 se muestran las TLC obtenidas.

Resultados:

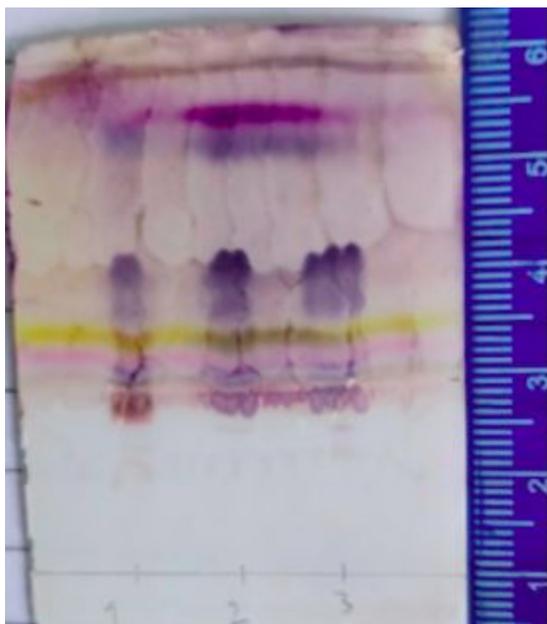


Figura 26



Figura 27

Conclusión

- Se logró purificar lípidos y realizar TLC satisfactoriamente obteniendo como mejor extracción el tubo 1 del experimento 5 y tubo 2 del experimento 4.

Experimento 7

Objetivo: repetir experimento 6 para confirmar resultados.

Métodos: Método de Hexano.

Procedimiento: Se realizó exactamente lo mismo que el experimento 6.

Resultados:

Los resultados de la TLC se pueden apreciar en la figura 8.1.

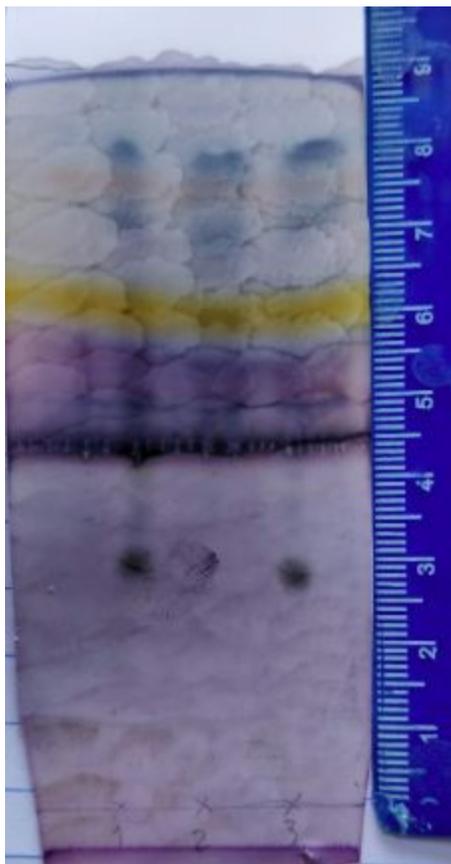


Figura 28.

- Se logró purificar lípidos y realizar TLC satisfactoriamente obteniendo resultados similares al experimento 6.
- Se concluye que este método de extracción y detección por TLC es un método confiable y de alta reproducibilidad.
- Se concluye que el método de hexano no es un método representativo ya que los lípidos más polares no se extraen adecuadamente como lo muestra la figura 28 8.1.

Experimento 8

Objetivo: Hacer B&D volviendo a extraer con CHCl_3 .

Procedimiento: Tubo 1: 1 mL leche + 0.2 mL MeOH luego vortex y centrifugar. Posteriormente se tomó sobrenadante y se trasvasan 0.55 mL a tubo de vidrio de centrifuga.

Luego se agregaron 2.5 vol de MeOH y luego vortex. Posteriormente se agregó 1 Vol de CHCl_3 y luego vortex, por último se agregó 1 Vol H_2O y luego vortex. Al notar que no se separaron las fases se agregó 1 Vol de CHCl_3 y se vortexeó.

Posteriormente se centrifugó a 1800 rpm, 4 °C por 5 minutos, se tomó el 90% de la fase inferior, luego al líquido remanente se volvió a agregar 1 vol de CHCl_3 y se centrifugó de nuevo en mismas condiciones, se tomó 90% de fase inferior y se juntó con la primera, finalmente se evaporó solvente y se retomó en 0.1mL de CHCl_3 para luego realizar una TLC en comparación con la cual se muestra en la figura 1.

Tubo 2: igual a tubo 1 solo que al re extraer lo hago con 4 volúmenes de hexano.

Resultados:

En la Figura 29 se puede ver la comparación por TLC

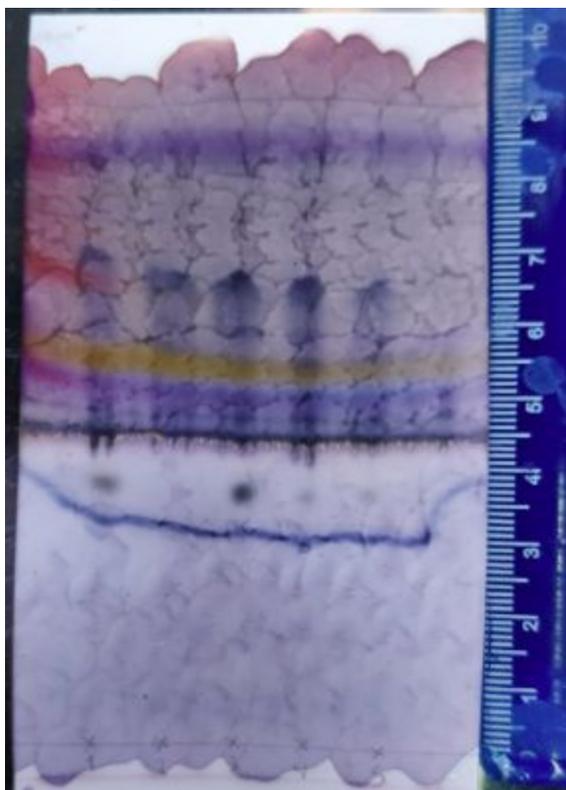


Figura 29. Comparación por TLC de muestras:

Nomenclatura:

- 1: tubo 1 del experimento 4
- 2: tubo 1 del experimento 6
- 3: tubo 2 del experimento 3
- 4: tubo 1 del experimento 8
- 5: tubo 2 del experimento 8

Conclusión:

- Se logró purificar lípidos y realizar TLC satisfactoriamente obteniendo como mejor extracción el tubo 2 del experimento 3 y tubo 1 del experimento 8.

Experimento 9

Objetivo: Probar distintos B&D y compararlos mediante TLC.

Procedimiento:

Tubo 1: Igual que tubo 2 de experimento 8:

Se tomó 1 mL leche, 0.2 mL MeOH luego vortex y centrifugar.

Posteriormente se tomó sobrenadante y se transvasó 0.55 mL a tubo de vidrio de centrífuga.

Luego se agregaron 2.5 vol de MeOH y luego vortex. Posteriormente se agregó 1 Vol de CHCl_3 y luego vortex, por último se agregó 1 Vol H_2O y luego vortex. Al notar que no se separaron las fases se agregó 1 Vol de CHCl_3 y se vortexeó.

Luego se centrifugó a 1800 rpm, 4 °C por 5 minutos, se tomó el 90% de la fase inferior, se evaporó solvente y se retomó en 0.1mL de CHCl_3 para luego realizar una TLC comparativa.

Tubo 2: Igual a tubo 1 excepto que sin precipitar primero la leche con 0.2 mL de MeOH.

Tubo 3: Igual a tubo 2 excepto que luego de agregar CHCl_3 se sónica 13 min a 40 rpm en baño de hielo.

Tubo 4: Igual a tubo 2 excepto que se sonica 13 min a 40 la leche a 37 °C en baño de hielo.

Tubo 5: Igual a tubo 2 excepto que se sonica (luego de agregarle el H_2O) 13 min a 40 en baño de hielo.

Tubo 6: Igual a tubo 1 excepto que se sonica 13 min a 40 la leche a 37 °C en baño de hielo.

Nota: siempre al sonicar, se observó que la temperatura sube aproximadamente a 50 °C.

Tubo 7: Igual a tubo 1 excepto que previo a precipitar con MeOH al comienzo se le agrega 73 uL de SLN de NH_3 13.4 M.

Tubo 8: Igual a tubo 7 excepto que no se precipita con MeOH al comienzo.

Resultados:

Tubos 7 y 8 no se separaron las fases por lo tanto no se pudo extraer.

El resto de los tubos se muestra en la figura 30.

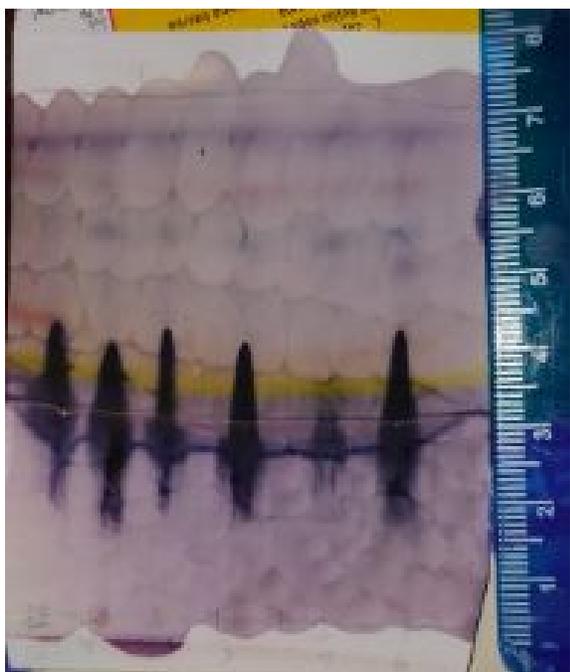


Figura 30.

Conclusión:

- Se logró purificar lípidos pero no realizar la TLC.
- El éter de la fase móvil 2 se había evaporado, por lo tanto la resolución esperada no se logró en la TLC y no se pueden comparar las distintas extracciones.
- Sonicar contamina la muestra con metales y eleva la temperatura, no es un adecuado método homogeneizante para extraer lípidos de leche vacuna.

Experimento 10

Objetivo: Extraer lípidos mediante B&D homogeneizando la leche antes con Bullet blender.

Procedimiento: Condiciones operativas de **Bullet blender:** Se utilizaron los tubos eppendorf GREEN para homogeneizar con el tiempo 4 min y la velocidad de 10.

- Tubo 1: H₂O con NaCl (0.69 m/m) en B&D.
 - Tubo 2: H₂O sin NaCl en B&D.
- Luego se resuspendió en 0.1 vol de CHCl₃ y se realizó una TLC.

Resultados:

En la figura 31 se puede apreciar el resultado de la TLC.

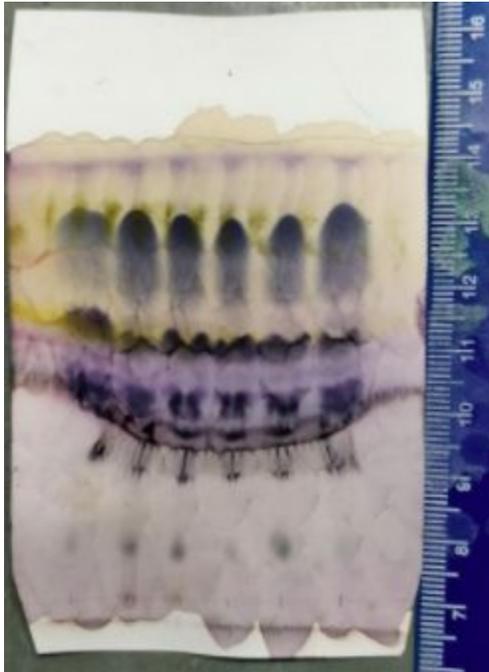


Figura 31. TLC comparativa de muestras:

- 1: tubo 4 del experimento 9
- 2: tubo 3 del experimento 9
- 3: tubo 2 del experimento 10
- 4: tubo 1 del experimento 10
- 5: tubo 6 del experimento 9
- 6: tubo 2 del experimento 9

Conclusión:

- Se logró purificar lípidos y realizar TLC satisfactoriamente. La comparación se ve difícil por este método, se necesita analizar con métodos más sensibles y exactos (HPLC-MS/MS).

Experimento 11

Objetivo: Extraer lípidos mediante B&D homogeneizando la leche antes con Bullet blender y precipitando con MeOH.

Procedimiento: Condiciones operativas de Bullet blender: Se usaron los tubos eppendorf GREEN para homogeneizar con el tiempo 4 min y la velocidad de 10.

Tubo 1(M1): Luego de homogenizar con Bullet blender se extrajo mediante B&D sin precipitar con MeOH previamente.

Tubo 2(M2): Luego de homogenizar con Bullet blender se extrajo mediante B&D precipitando con MeOH.

Resultados:

En la figura 32 se puede apreciar la TLC comparativa y su nomenclatura.

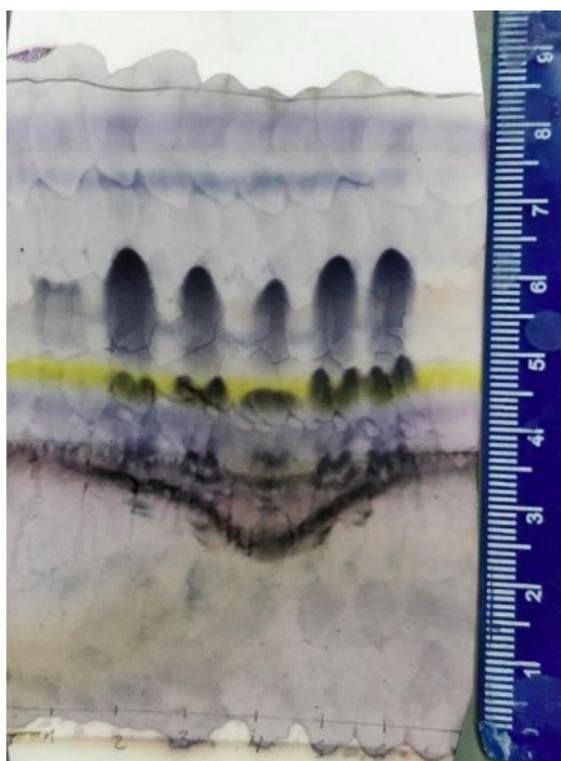


Figura 32. TLC comparativa de muestras:

- 1:tubo 1 del experimento 3
- 2:tubo 6 del experimento 9
- 3:tubo 2 del experimento 10
- 4:tubo 1 del experimento 10
- 5:tubo 1 del experimento 11
- 6:tubo 2 del experimento 11

Conclusión:

- Se logró purificar lípidos y realizar TLC satisfactoriamente. La comparación se ve difícil por este método, se necesita analizar con métodos más sensibles y exactos (HPLC-MS/MS).

Experimento 12

Objetivo: Analizar muestras obtenidas la semana 11 cualitativamente mediante ESI-MS/MS.

Procedimiento: Se diluyeron en FM de MS y se inyectaron directamente en el equipo mediante un capilar no plástico (debido a que la fase móvil contiene CHCl_3 y este diluye el plástico).

M1: Luego de homogenizar con Bullet blender se extrajo mediante B&D sin precipitar con MeOH previamente.

M2: Luego de homogenizar con Bullet blender se extrajo mediante B&D precipitando con MeOH.

Resultados:

Los resultados se muestran por grupos químicos y/o distintos métodos de ionización en gráficos de "tortas" en las figuras 33, 34, 35, 36, 37 y 38.

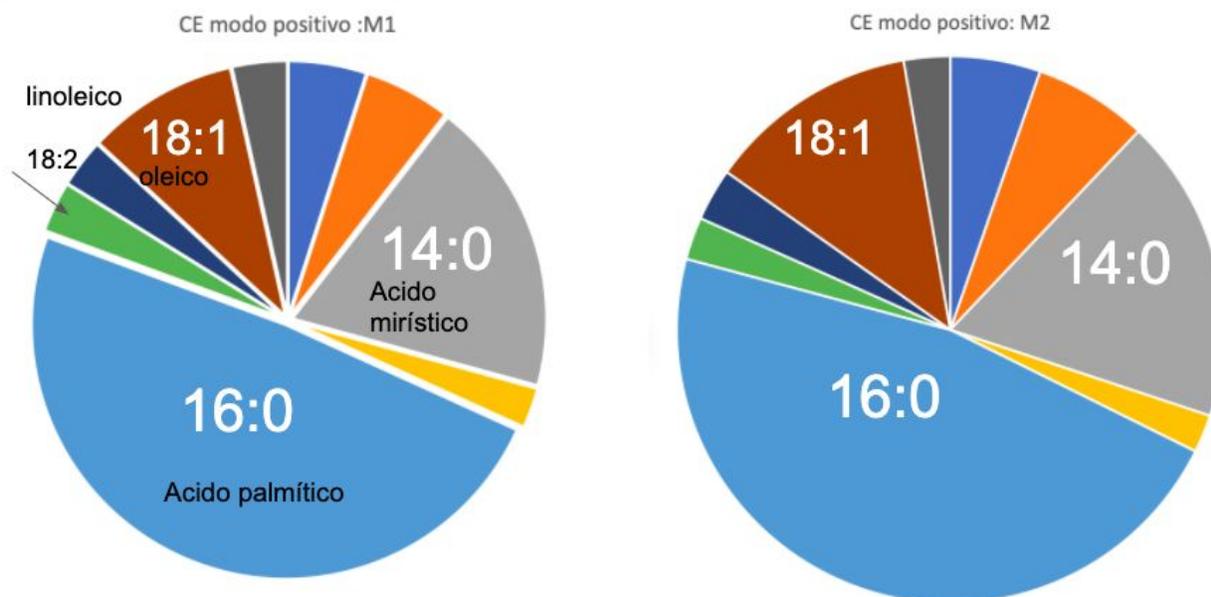


Figura 33. CE modo positivo (esteres de colesterol ionizados positivamente en ESI).

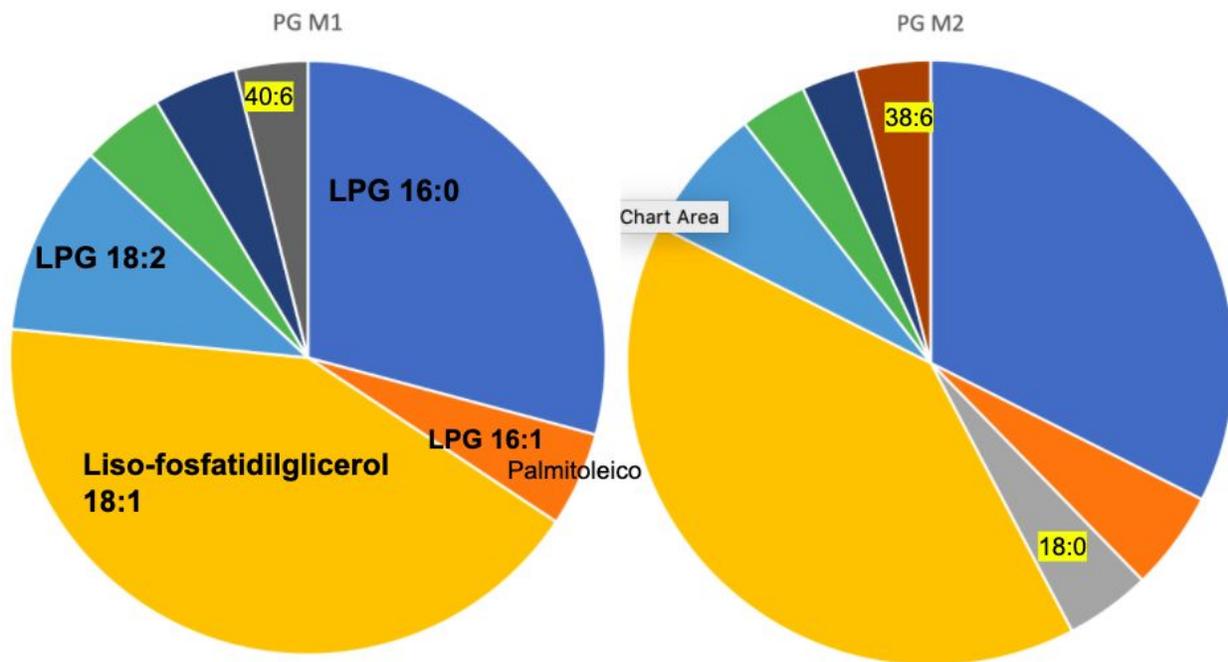


Figura 34. Fosfatidilgliceroles y liso fosfatidilgliceroles.

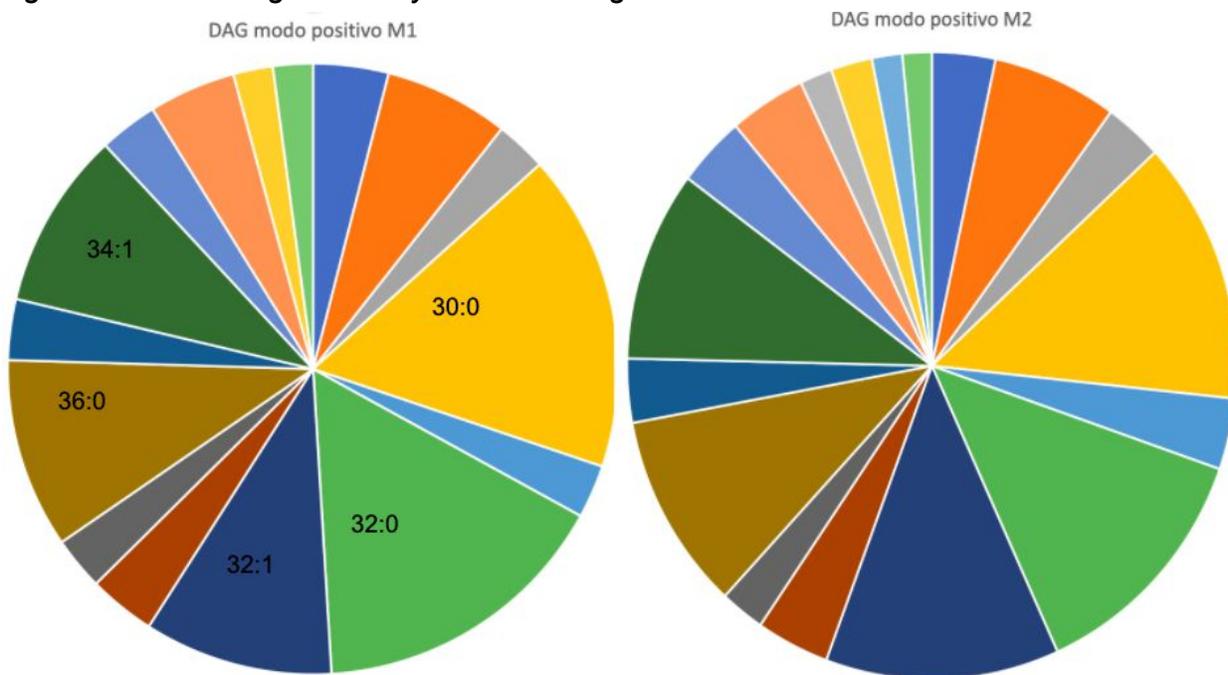


Figura 35. Diacilgliceroles en modo positivo.

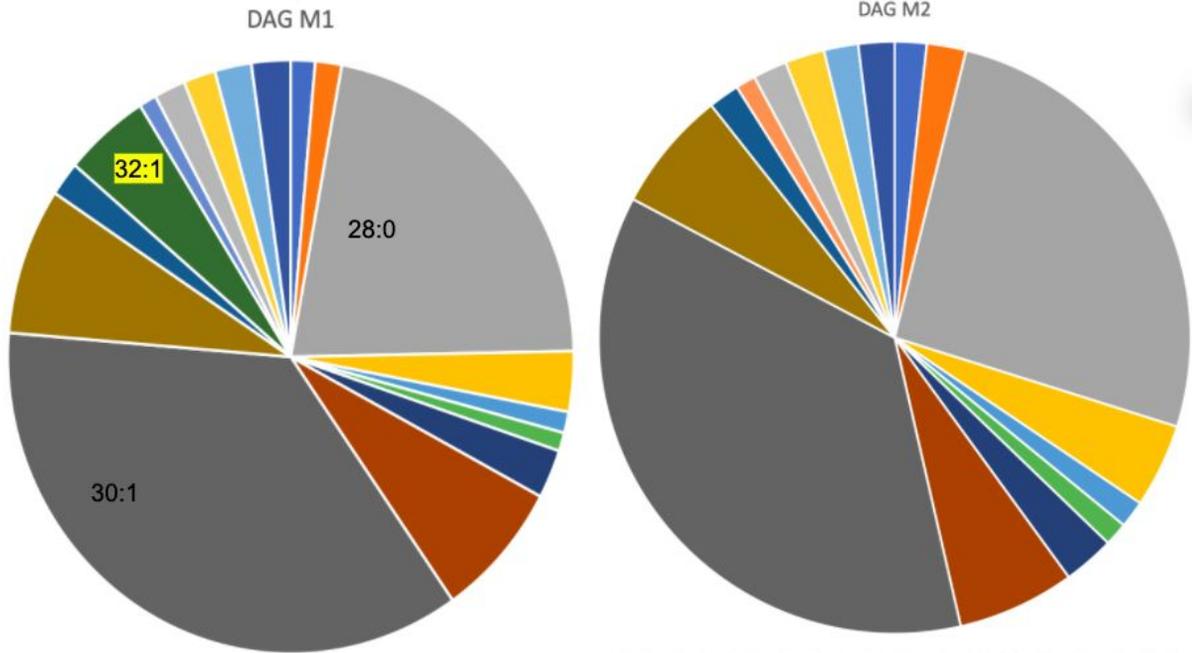


Figura 36. Diacilgliceroles.

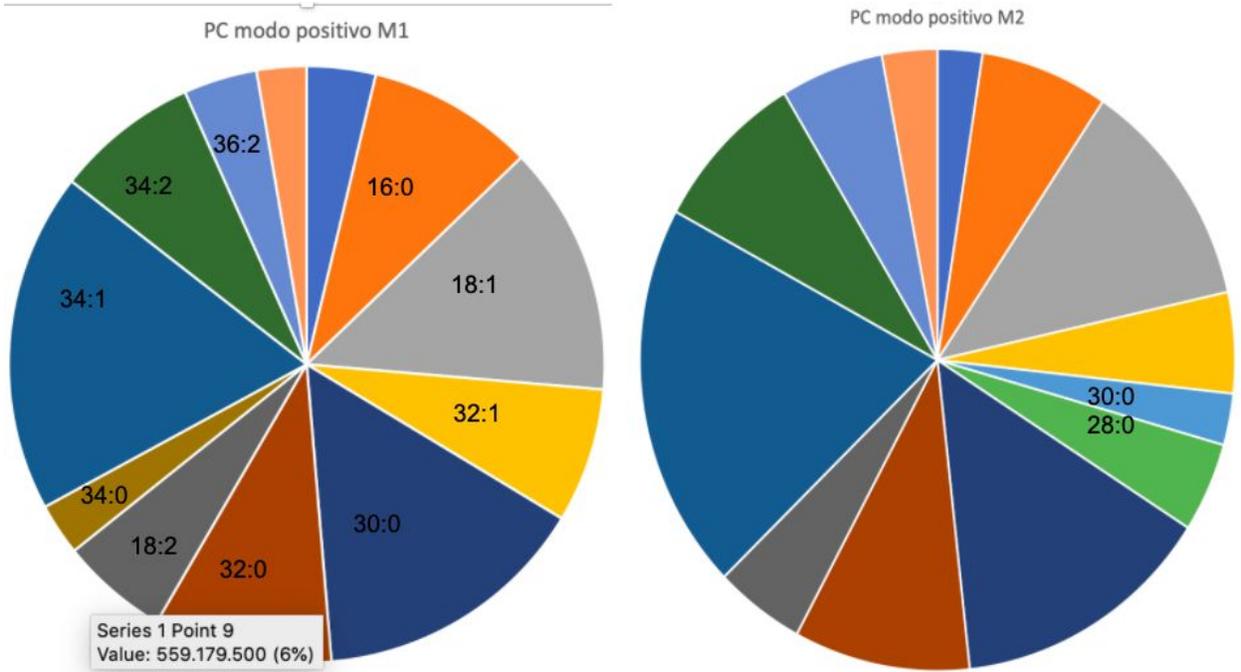


Figura 37. Fosfatidilcolinas en modo positivo.

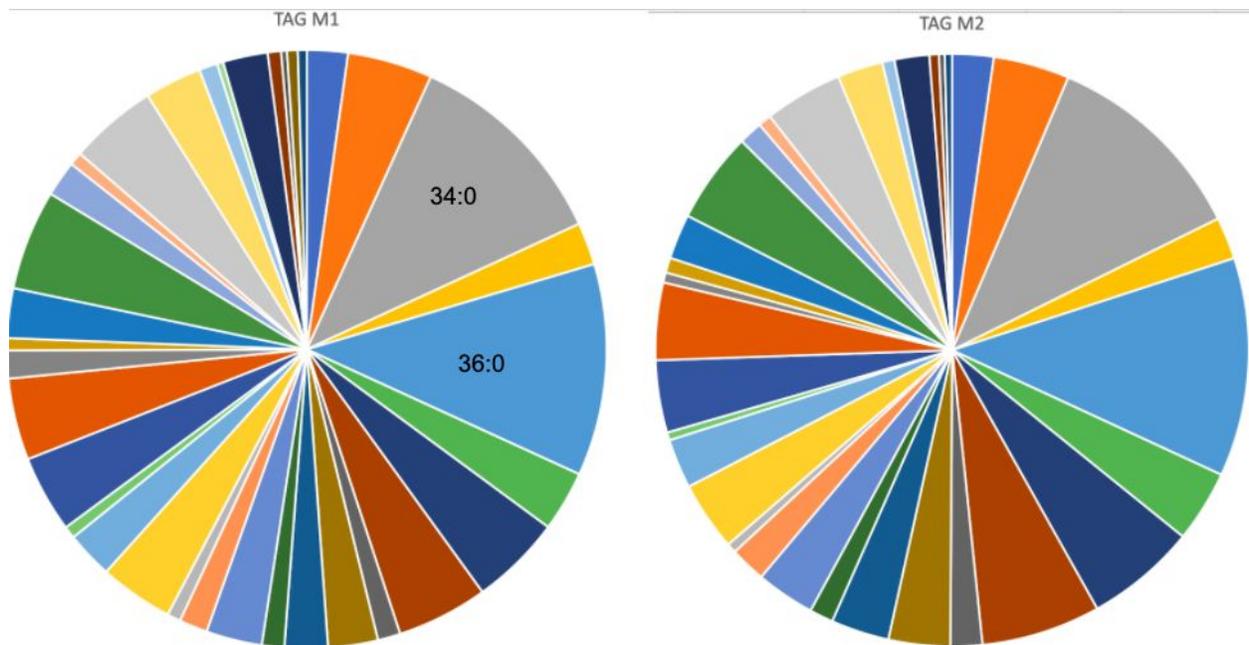


Figura 38. Triacilgliceroles.

Conclusión:

- La precipitación previa con MeOH parece tener mejoras en algunos modos de detección (por ejemplo en el análisis de Fosfatidilgliceroles y liso fosfatidilgliceroles se encontró un compuesto que no se encontraba en la extracción sin precipitación previa con MeOH) y parece tener carencias en otros compuestos y otros modos de detección.

Experimento 13

Objetivo: Análisis de NFAs (Nitro fatty acids) en muestras de leche, una muestra tratándola con una nitración gástrica y la otra sin nitración gástrica, a las dos muestras se las trató con una hidrólisis enzimática. A su vez correr un std (estándar) de NO₂-cLA.

Método: Homogeneizado por bullet blender, Extracción de Hexano, extracción de B&D, nitración gástrica, hidrólisis enzimática y extracción SPE, finalmente HPLC-MS/MS.

Procedimiento: Se llevan las dos muestras de leche a 37 °C, luego en cámara de frío se realiza bullet blender: 4 min, velocidad 10, eppendorf GREEN. Luego a una muestra se le realiza una nitración gástrica. Posteriormente se extraen las dos muestras dos veces con método de Hexano y se lleva a sequedad, luego se realiza una hidrólisis enzimática de las dos muestras para luego extraer los lípidos mediante B&D y se lleva

a sequedad. Finalmente se realiza una extracción en fase sólida y luego se retoman las muestras en 100 uL de MeOH para ser inyectadas en HPLC-MS/MS.

Resultados

En las figuras 39, 40 y 41 se muestran los resultados:

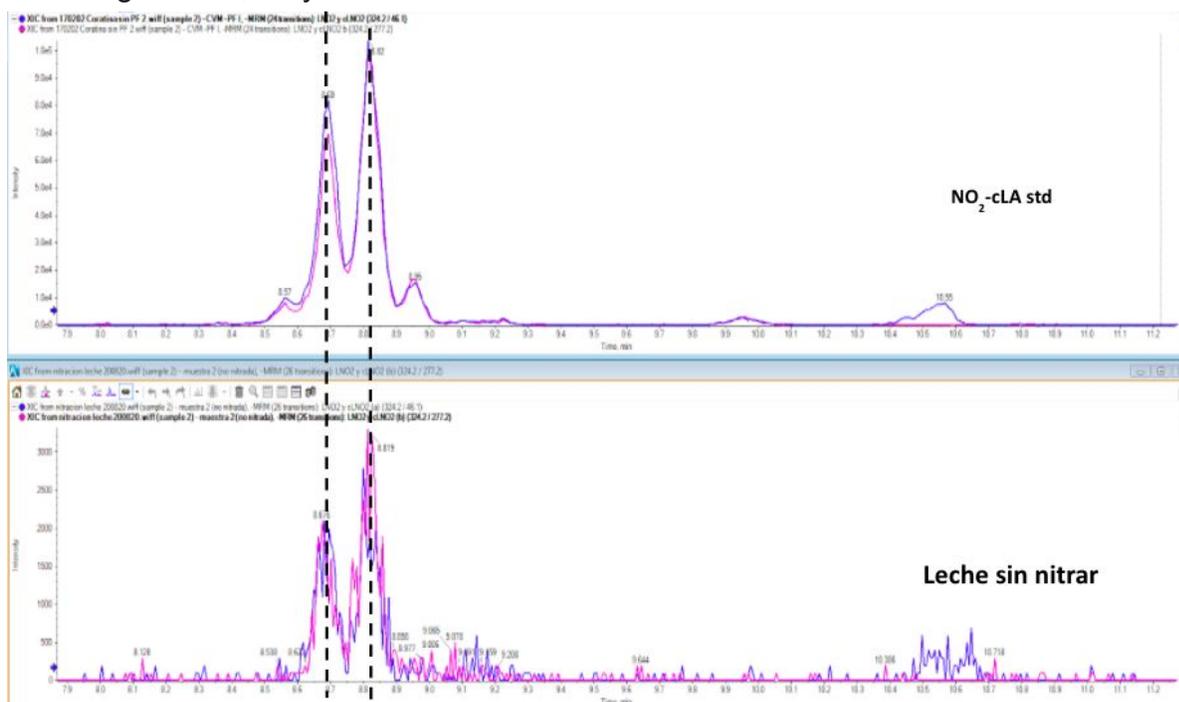


Figura 39: Cromatograma de muestra de leche sin nitrar de las dos transiciones características de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ comparado con el std de $\text{NO}_2\text{-cLA}$. Se puede ver como coinciden los tiempos de retención y también los picos característicos de las dos transiciones del $\text{NO}_2\text{-cLA}$.

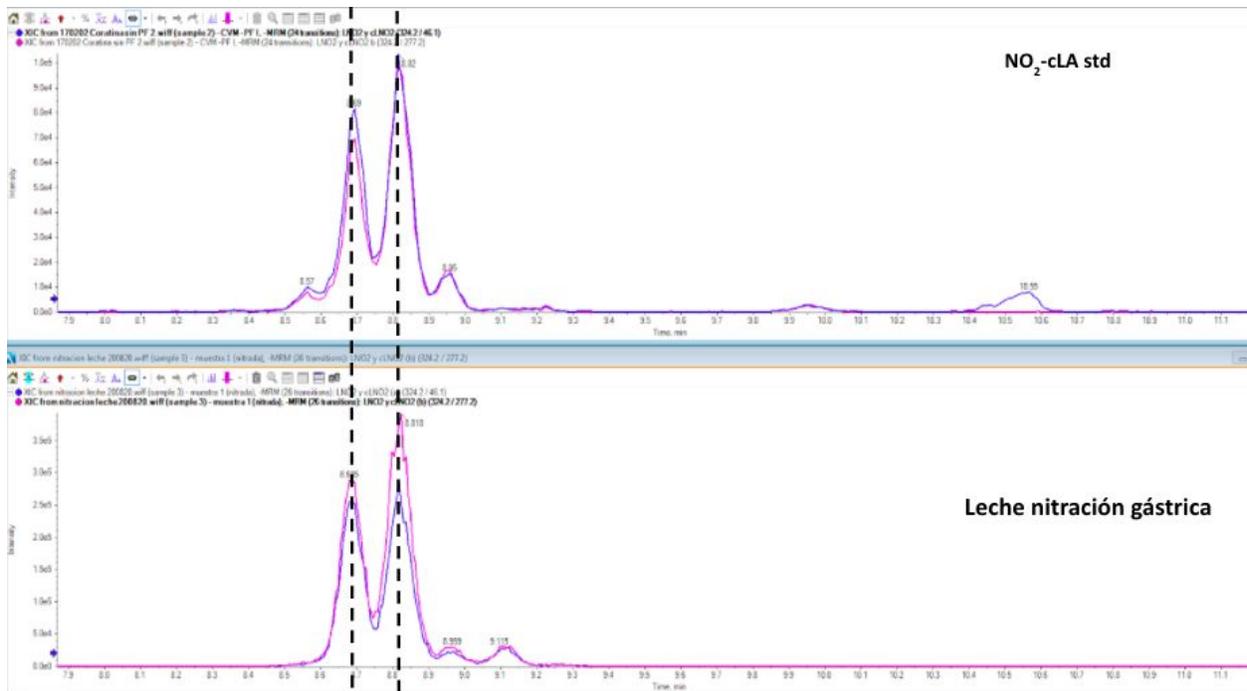


Figura 40: Cromatograma de muestra de leche nitrada de las dos transiciones características de NO₂-cLA comparado con el std de NO₂-cLA. Se puede ver como coinciden los tiempos de retención y también los picos característicos de las dos transiciones del NO₂-cLA.

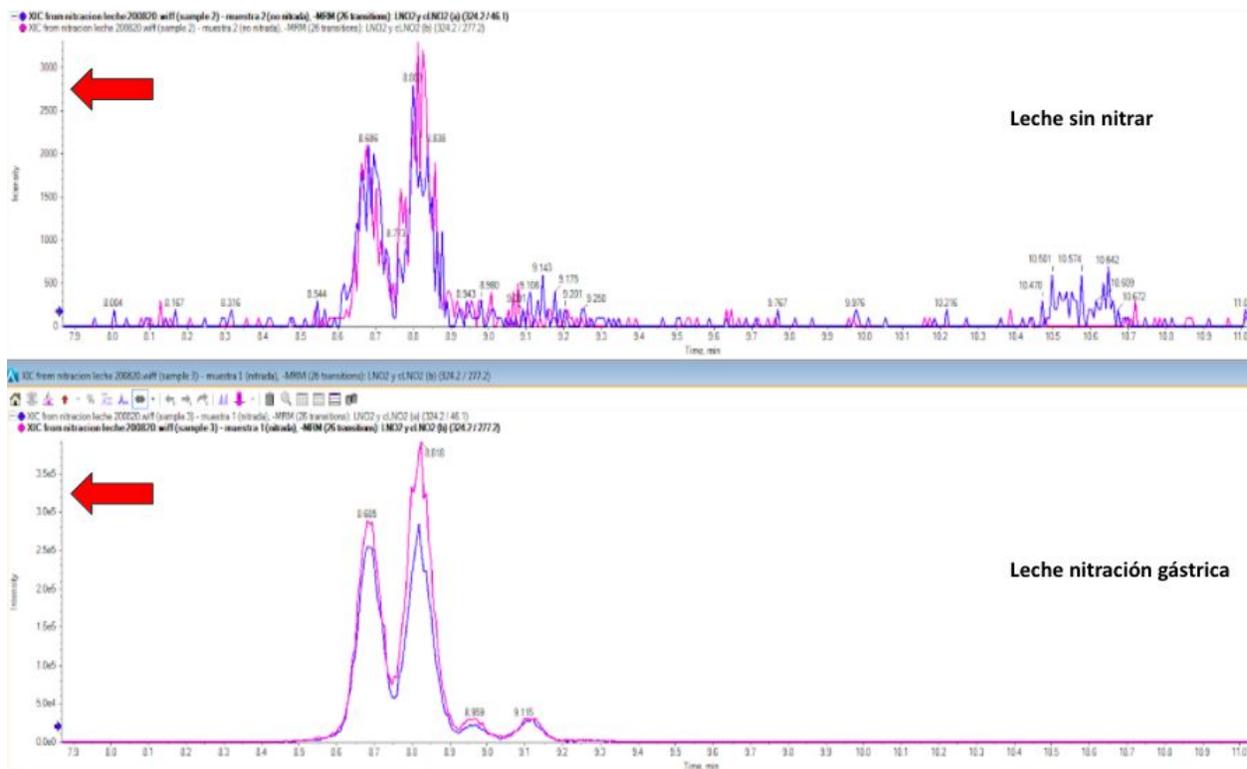


Figura 41: Comparación de los cromatogramas de las dos transiciones características de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ de muestra de leche sin nitrar y muestra de leche nitrada. Se puede observar como la intensidad de la muestra de leche nitrada es 2 órdenes mayor al de la leche sin nitrar.

Conclusión:

- Se logró analizar nitro lípidos en muestras de leche.
- Se pudo detectar e identificar $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en las dos muestras de leche y en la nitrada se obtiene una cantidad apreciablemente mayor, por lo tanto se puede concluir que hay $\text{NO}_2\text{-cLA}$ endógeno en muestra de leche vacuna y a su vez que una gran cantidad de cLA presente en la leche vacuna se nitra en condiciones de nitración gástrica.

Experimento 14

Objetivo:

Análisis de NFAs (Nitro fatty acids) en 4 muestras de leche de vacas con una dieta de pastoreo y un genotipo N.Z, dos de las muestras corresponden a una lactancia temprana y otras dos a lactancia tardía, una muestra de lactancia temprana y otra de tardía tratándolas con una nitración gástrica y las otras dos correspondientes sin nitración gástrica, a las cuatro muestras se les realizó una hidrólisis enzimática. Se utilizó un std interno de $^{15}\text{NO}_2\text{-cLA}$ y $\text{NO}_2\text{-OA}$.

Métodos:

Homogeneizado por bullet blender, Extracción de Hexano, extracción de B&D, nitración gástrica, hidrólisis enzimática y extracción SPE, finalmente HPLC-MS/MS.

Procedimiento:

Se llevan las cuatro muestras de leche a 37 °C, luego en cámara de frío se realiza bullet blender: 4 min, velocidad 10, eppendorf GREEN. Luego a dos muestras se le realiza una nitración gástrica. Posteriormente se extraen las cuatro muestras dos veces con método de Hexano y se lleva a sequedad, luego se realiza una hidrólisis

enzimática de las dos muestras, posteriormente se agregan los std internos en una concentración final de 20 nM en 100 uL, luego se extrajeron los lípidos mediante B&D y se lleva a sequedad. Finalmente se realiza una extracción en fase sólida y luego se retoman las muestras en 100 uL de MeOH para ser inyectadas en HPLC-MS/MS.

Resultados:

En las figuras 42 y 43 se muestran los resultados:

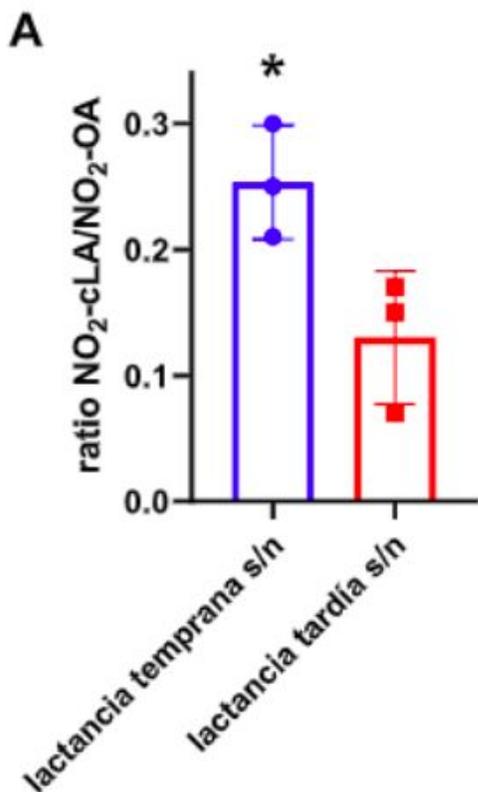


Figura 42. Esta figura corresponde a muestra de leche sin nitrar correspondiente a lactancia temprana y lactancia tardía. El $\text{NO}_2\text{-cLA}$ presente se cuantificó con respecto a $\text{NO}_2\text{-OA}$.

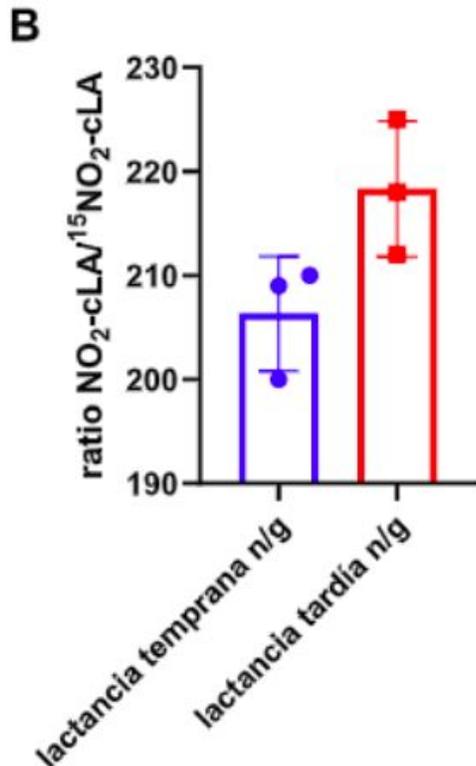


Figura 43. Esta figura corresponde a muestra de leche nitrada correspondiente a lactancia temprana y lactancia tardía. El $\text{NO}_2\text{-cLA}$ presente se cuantificó con respecto a $^{15}\text{NO}_2\text{-cLA}$.

Conclusión:

- Hay mayor cantidad de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en la muestra de lactancia temprana comparada a la tardía (A, * $p > 0.05$) para las muestras de leche no nitradas.
- Los niveles de $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en la nitración gástrica son similares, no observándose diferencias estadísticas entre los grupos.

Experimento 15

Objetivo

Análisis de NFAs (Nitro fatty acids) en leche de 3 vacas distintas, dos muestras por cada vaca, una correspondiente a una lactancia temprana y otra a lactancia tardía por cada vaca, ninguna de las muestras se trató con nitración gástrica. Se utilizó un std interno de $^{15}\text{NO}_2\text{-cLA}$ y $[^{13}\text{C}]\text{-NO}_2\text{-OA}$.

Métodos

Homogeneizado por bullet blender, Extracción de Hexano, extracción de B&D, nitración gástrica, hidrólisis enzimática y extracción SPE, finalmente HPLC-MS/MS.

Procedimiento

Se llevan las muestras de leche a 37 °C, luego en cámara de frío se realiza bullet blender: 4 min, velocidad 10, eppendorf GREEN. Luego se agregan los std internos en una concentración final de 20 nM en 100 uL. Posteriormente se extraen dos veces con método de Hexano y se lleva a sequedad, luego se realiza una hidrólisis enzimática, luego se extraen los lípidos mediante B&D y se lleva a sequedad. Finalmente se realiza una extracción en fase sólida y luego se retoman las muestras en 100 uL de MeOH para ser inyectadas en HPLC-MS/MS.

Resultados

En las Figuras 44, 45, 46, 47, 48 y 49 se muestran los resultados:

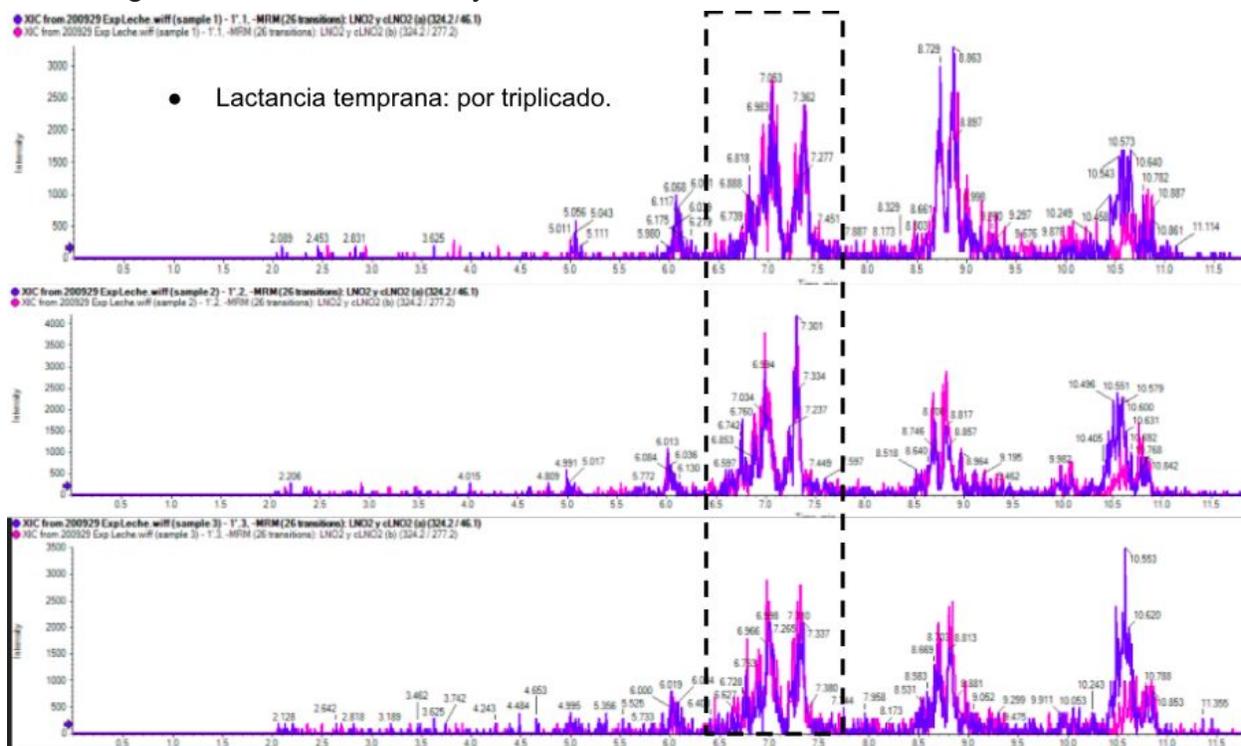


Figura 44: Correspondientes a Vaca 1 en lactancia temprana como indica la figura.

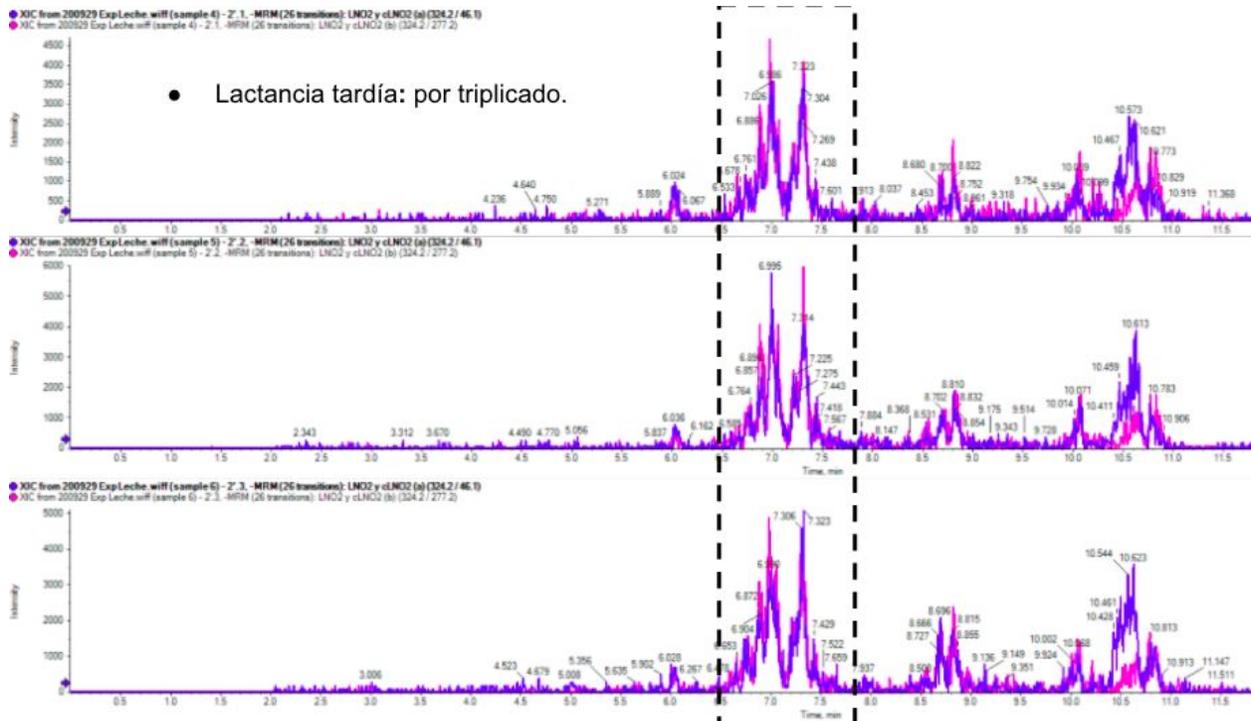


Figura 45: Correspondientes a Vaca 1 en lactancia tardía como indica la figura.

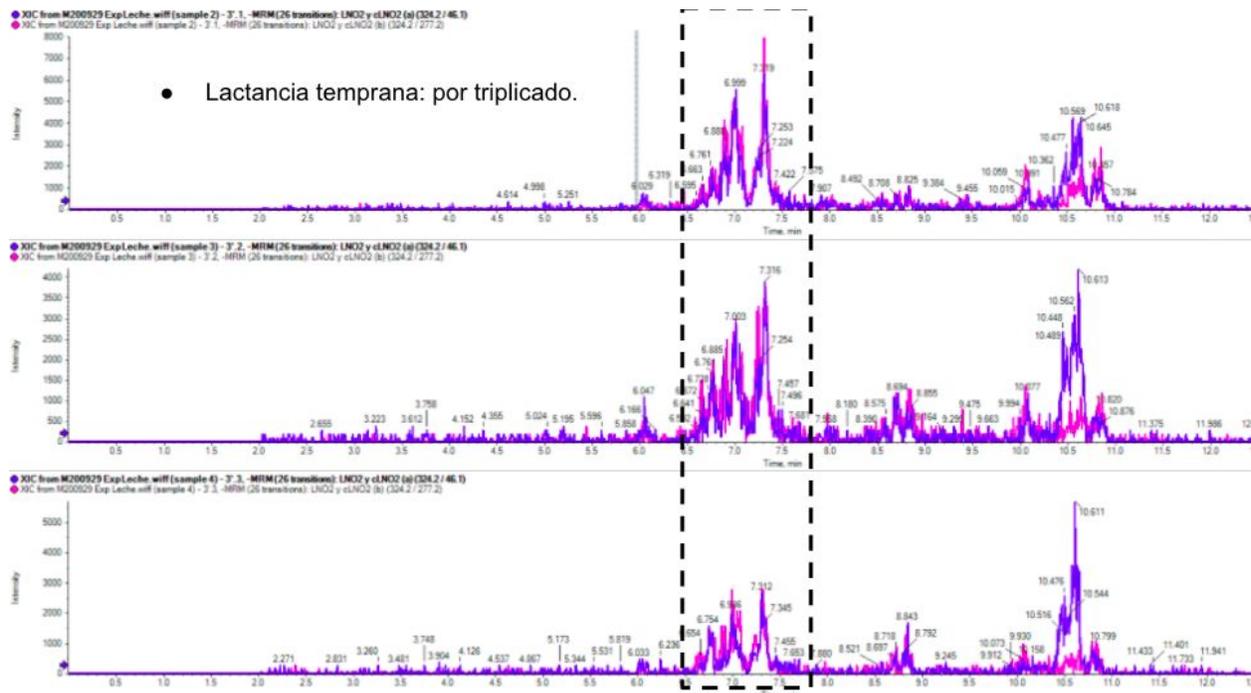


Figura 46: Correspondientes a Vaca 2 en lactancia temprana como indica la figura.

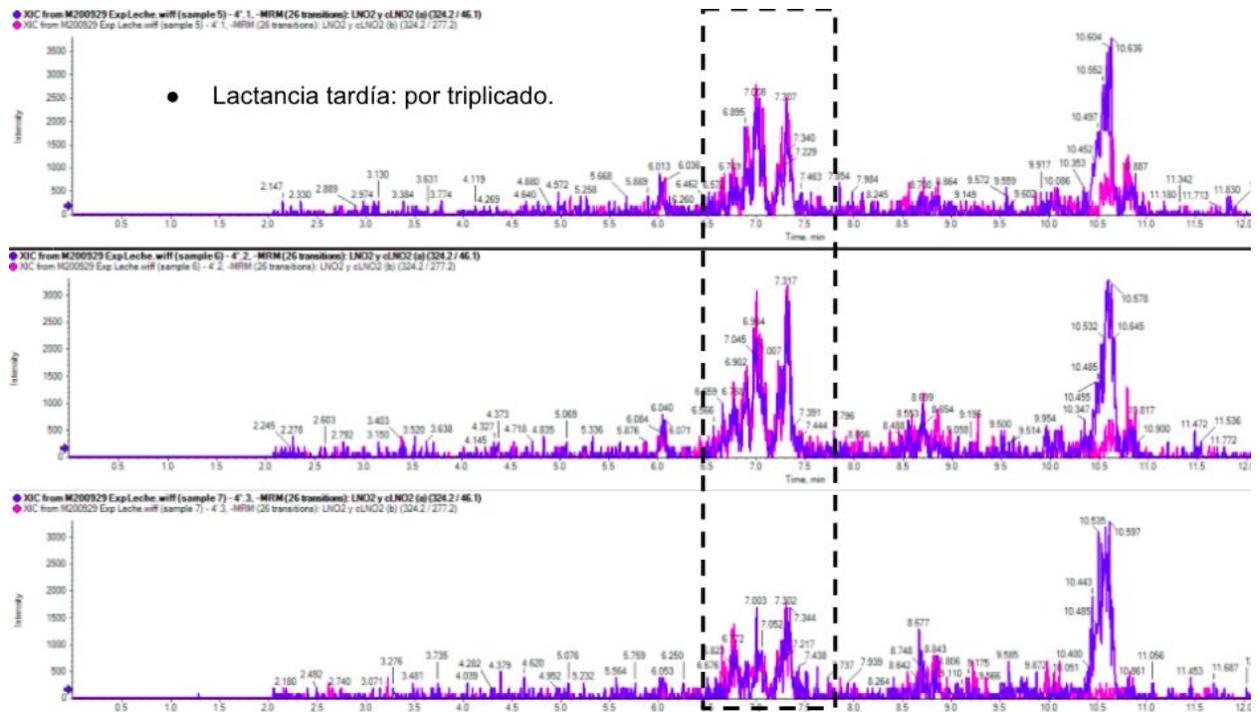


Figura 47: Correspondientes a Vaca 2 en lactancia tardía como indica la figura.

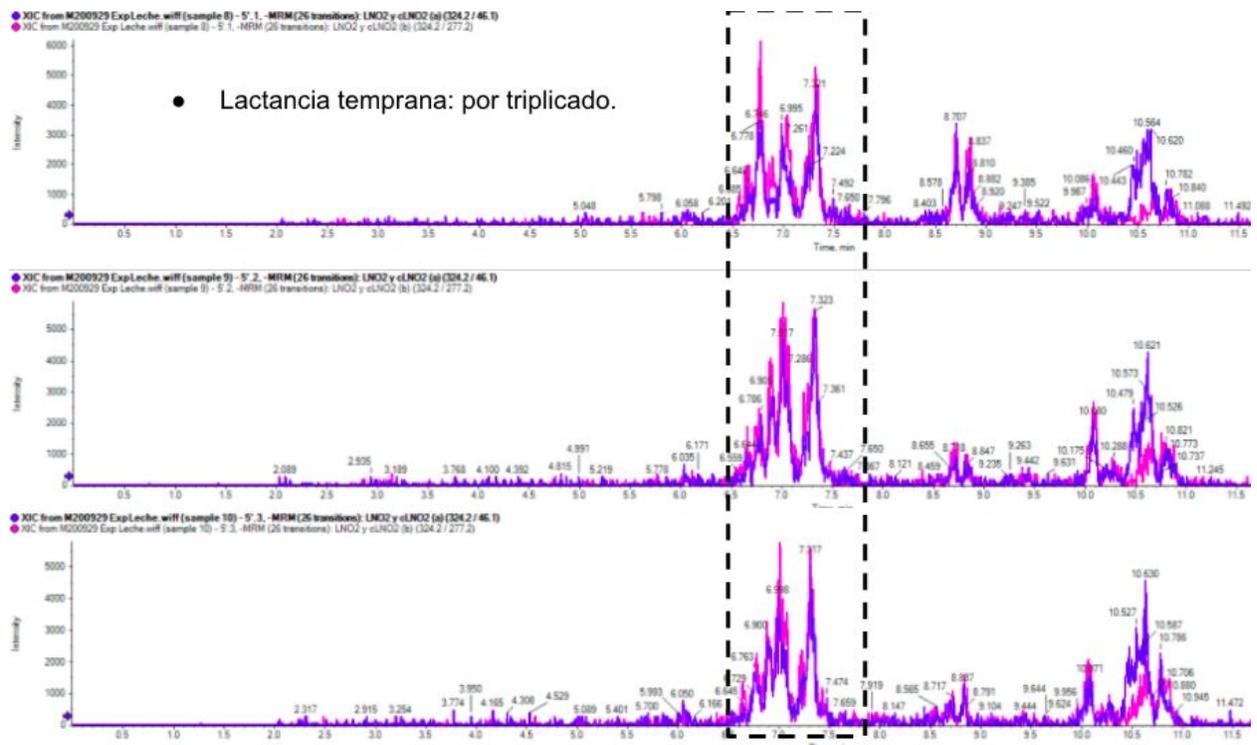


Figura 48: Correspondientes a Vaca 2 en lactancia temprana como indica la figura.

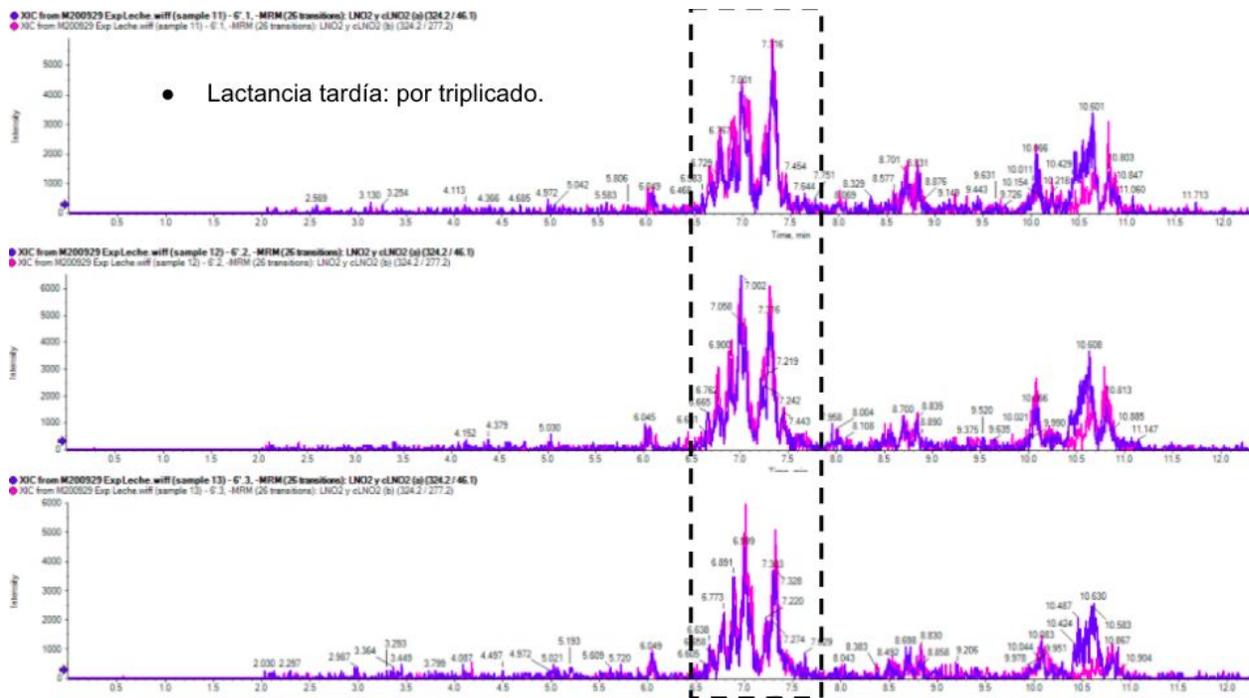


Figura 49 Correspondientes a Vaca 2 en lactancia tardía como indica la figura.

Conclusión

- Se logró realizar exitosamente todo el procedimiento pudiendo identificar $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en cada muestra.
- Se usaron estándares internos en mal estado por lo tanto no se pudo lograr la cuantificación de el $\text{NO}_2\text{-cLA}$ en cada muestra.

Experimento 16

Objetivo: Realizar la síntesis de $\text{NO}_2\text{-AA}$ aumentando el tiempo de reacción a 120 minutos.

Procedimiento: Para aumentar el rendimiento de síntesis de NO_2AA modificamos una técnica previamente descrita (Trostchansky et al., 2008) para la nitración de AGIs por $\bullet\text{NO}_2$ en medio ácido. El AA (150 mg, Nu-Check Prep, Elysian, MN) se incubó con NaNO_2 (Sigma Chemicals, relación n:n 1:1) en un vial de vidrio con hexano (4 mL) a temperatura ambiente. La solución se borbotea con argón por 15 minutos para disminuir la tensión de O_2 y se selló con un septo de goma. Se inició la reacción por adición de 10 μL H_2SO_4 concentrado y se incubó 30 minutos bajo agitación antes de agregar nuevamente NaNO_2 y H_2SO_4 . A los 120 minutos se detuvo

la reacción por adición de acetato de etilo (v/v 1:1) y NaCl saturado (mezcla:NaCl v/v 1:2). La fase hidrofílica se lavó al menos una vez con acetato de etilo y el volumen obtenido se secó con Na_2SO_4 anhidro (0.5 gr) y se evaporó en ambiente de N_2 hasta obtener un aceite amarillento. La mezcla obtenida (aceite) se analizó por TLC (cromatografía en capa fina) analítica (Analtech) utilizando hexano:dietiléter:acético (80:20:0.1) como fase móvil y anisaldehído como revelador, o por espectrometría de masa (MS). Todos los solventes utilizados fueron de calidad HPLC.

El procedimiento se puede ver en la figura 50.

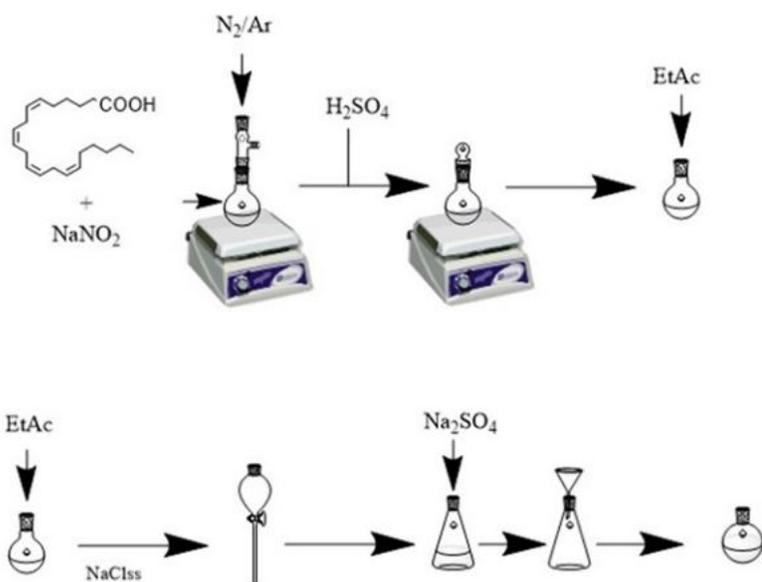


Figura 50. Procedimiento de síntesis.

Resultados

Se obtuvo un presunto NO_2AA aunque el rendimiento sigue siendo bajo.

La reacción luego de los 30 minutos no parece mejorar.

En la figura 51 se puede apreciar la TLC

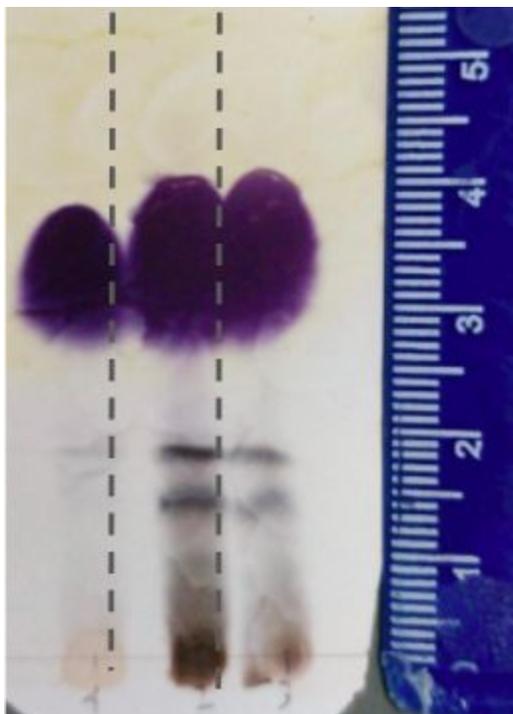


Figura 51. TLC obtenida.

- 1: patrón de AA
- 2: Reacción a los 30 minutos
- 3: Reacción al finalizar

Conclusión

Se logró realizar la síntesis satisfactoriamente pero no se logró optimizarla.

Experimento 17

Objetivo: Optimizar síntesis de $\text{NO}_2\text{-AA}$

Procedimiento:

Se realizó el mismo procedimiento que la síntesis 1 solo que el Hexano se mantuvo en reflujo con una presión positiva de N_2 y se secó previamente con tamices moleculares por 48 horas para eliminar las trazas de agua.

Resultados

En la Figura 52 se puede visualizar la TLC comparativa de la reacción a los 30 minutos y la reacción luego de 2 horas.

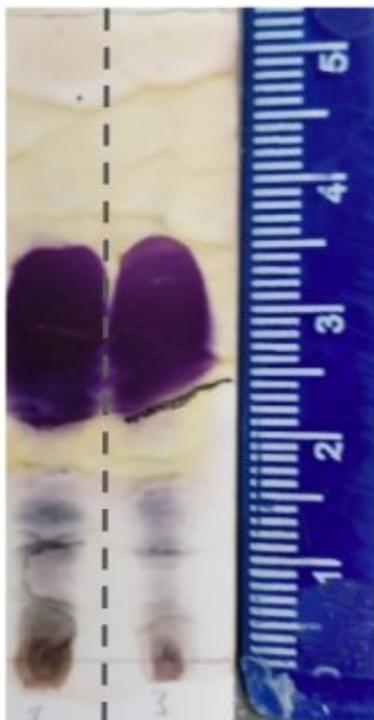


Figura 52. TLC obtenida.

1: Reacción a los 30 min

2: Reacción a los 120 min

Conclusión

Se logró realizar la síntesis satisfactoriamente pero no se ven cambios favorables apreciables con esta nueva síntesis que contiene hexano seco y en reflujo.

Experimento 18

Objetivo: Optimizar síntesis de NO_2 -AA

Procedimiento:

Se realizó el mismo procedimiento que la síntesis 1 solo que en vez de agregar NaNO_2 directamente, este se agrego disuelto en H_2O como se puede apreciar en la figura 53, apoyándonos en los artículos científicos de: Napolitano et al.,2000 y Woodcock et al., 2014.

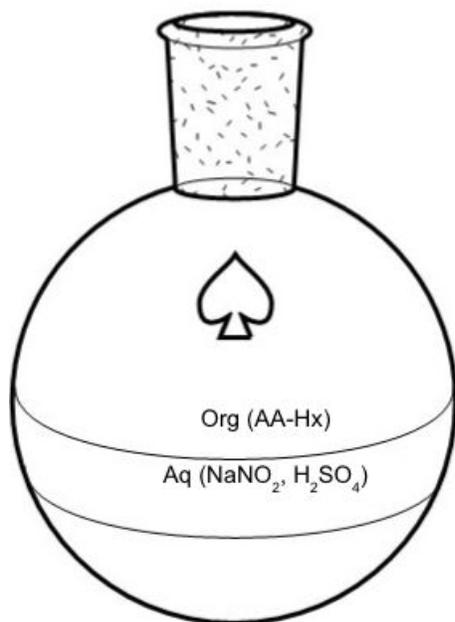


Figura 53. Esquema de balón de síntesis

Resultados

Se realizó la síntesis satisfactoriamente obteniendo el producto deseado pero sin lograr una apreciable mejora en el rendimiento. En la figura 54 se puede observar la TLC.



Figura 54. TLC obtenida

Conclusión

Se logró sintetizar AA-NO₂ por medio de una síntesis bifásica pero sin cambios significativos en el rendimiento.

Experimento 19

Objetivo: Optimizar síntesis de NO₂-AA

Procedimiento

Se realizó el mismo procedimiento que la tercera síntesis solo que se dejó reaccionar durante 48 horas.

Resultados

En la figura 55 se puede observar la TLC de la reacción en dos tiempos distintos, parece ser que el tiempo de reacción no es una limitante ya que no mejoró la síntesis, todo lo contrario, parece haber empeorado la formación de producto.



Figura 55. TLC obtenida

1: síntesis luego de 2 horas

2: síntesis luego de 48 horas

Conclusión

Se realizó la síntesis satisfactoriamente. No se encontraron mejoras al prolongar el tiempo de síntesis.

Experimento 20

Objetivo: Purificación de NO₂AA por columna de sílica gel preparativa.

Métodos: Columna de sílica gel preparativa, H¹RMN.

Resultados y discusión:

En la Figura 56 se puede ver el espectro RMN del AA.

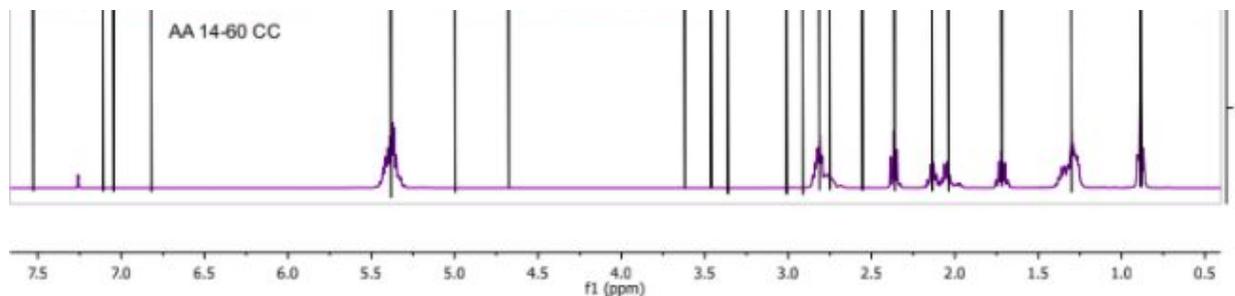


Figura 56 Espectro RMN de AA.

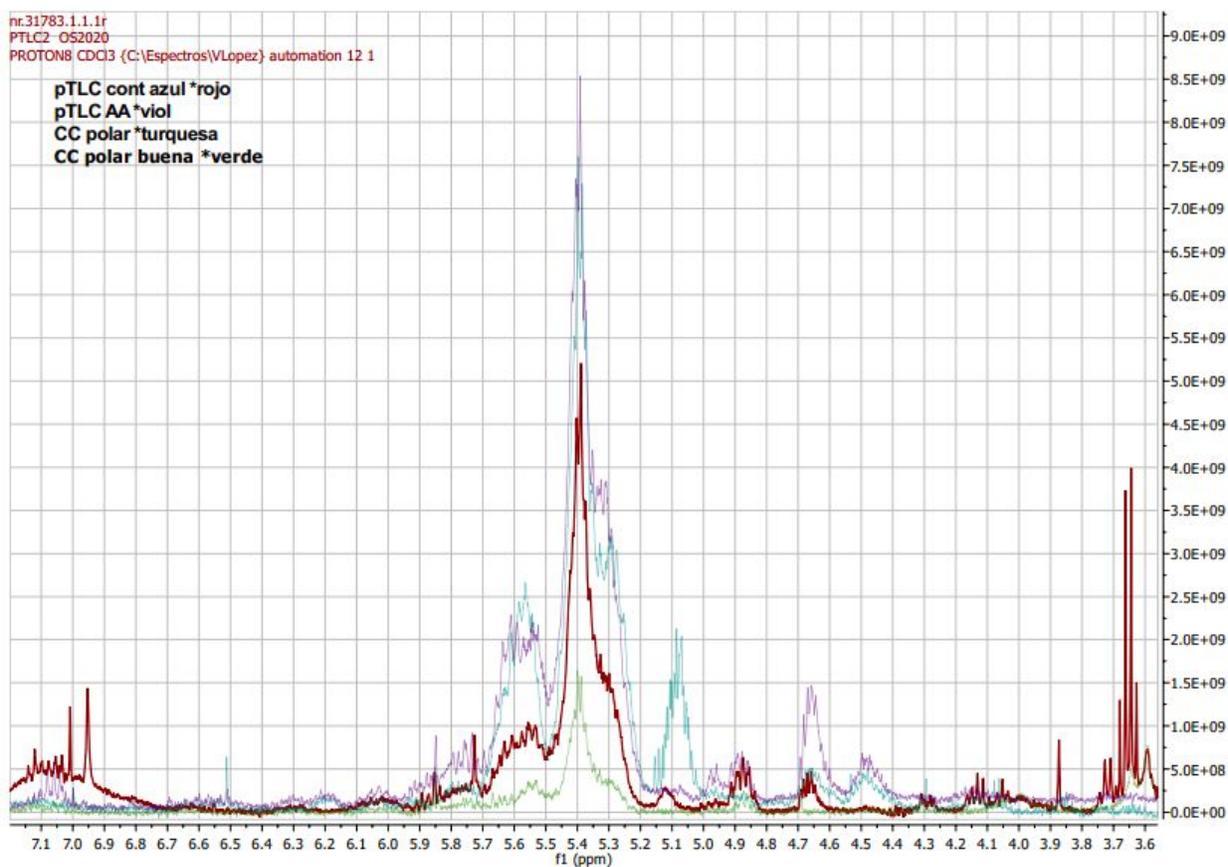


Figura 57. Espectro RMN de fracciones obtenidas.

En color rojo se puede apreciar la pTLC más apolar.

En color violeta se puede apreciar la pTLC más polar.

En color turquesa se puede apreciar la fracción más polar.

En color verde se puede apreciar la segunda fracción más polar.

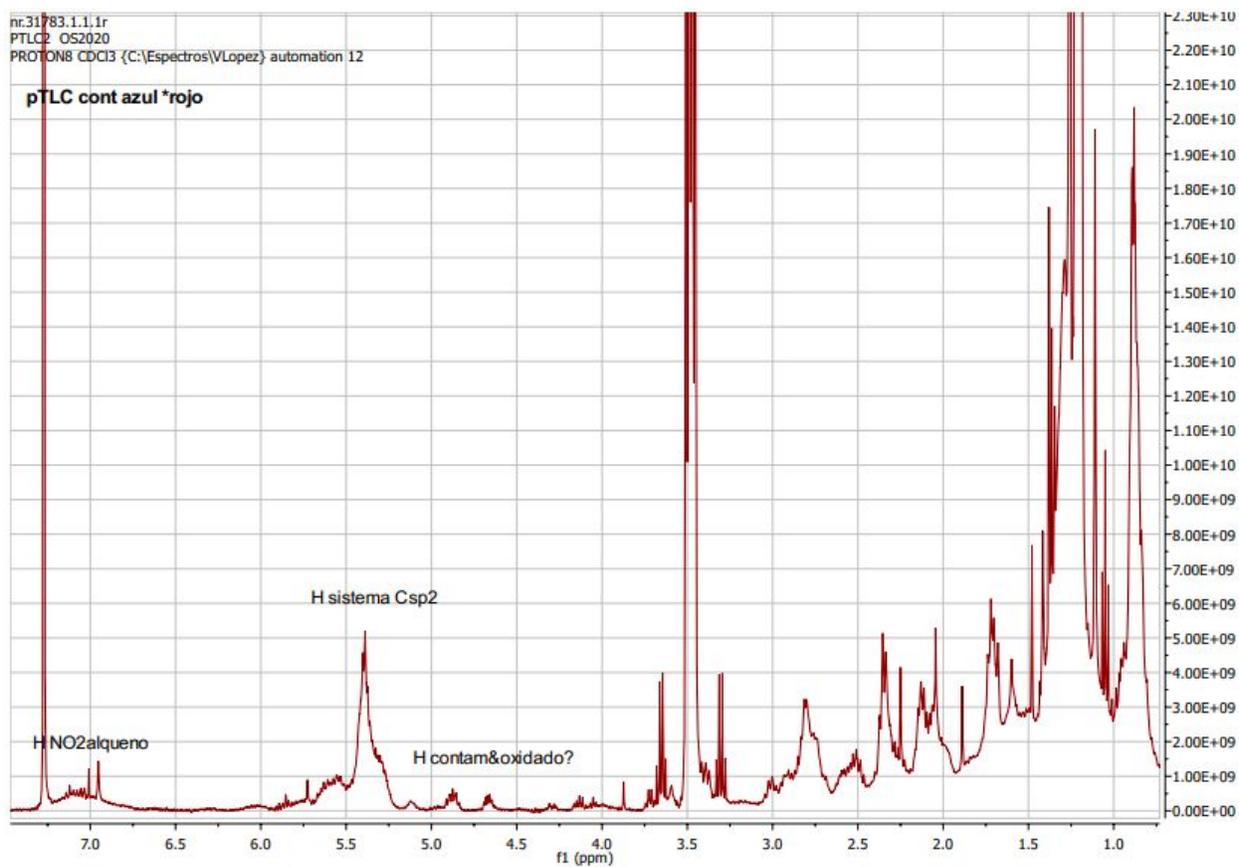


Figura 58. Espectro RMN de la pTLC más polar.

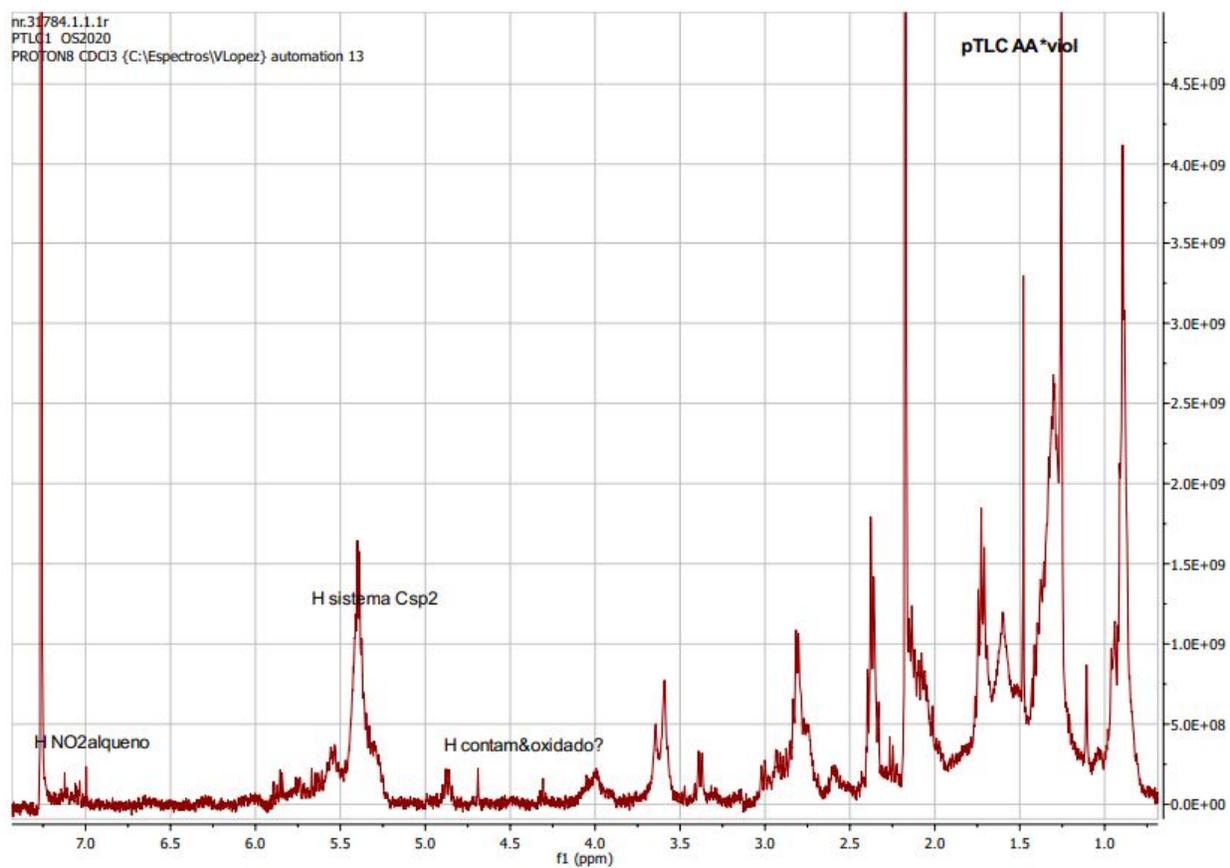


Figura 59. Espectro RMN de la pTLC más polar.

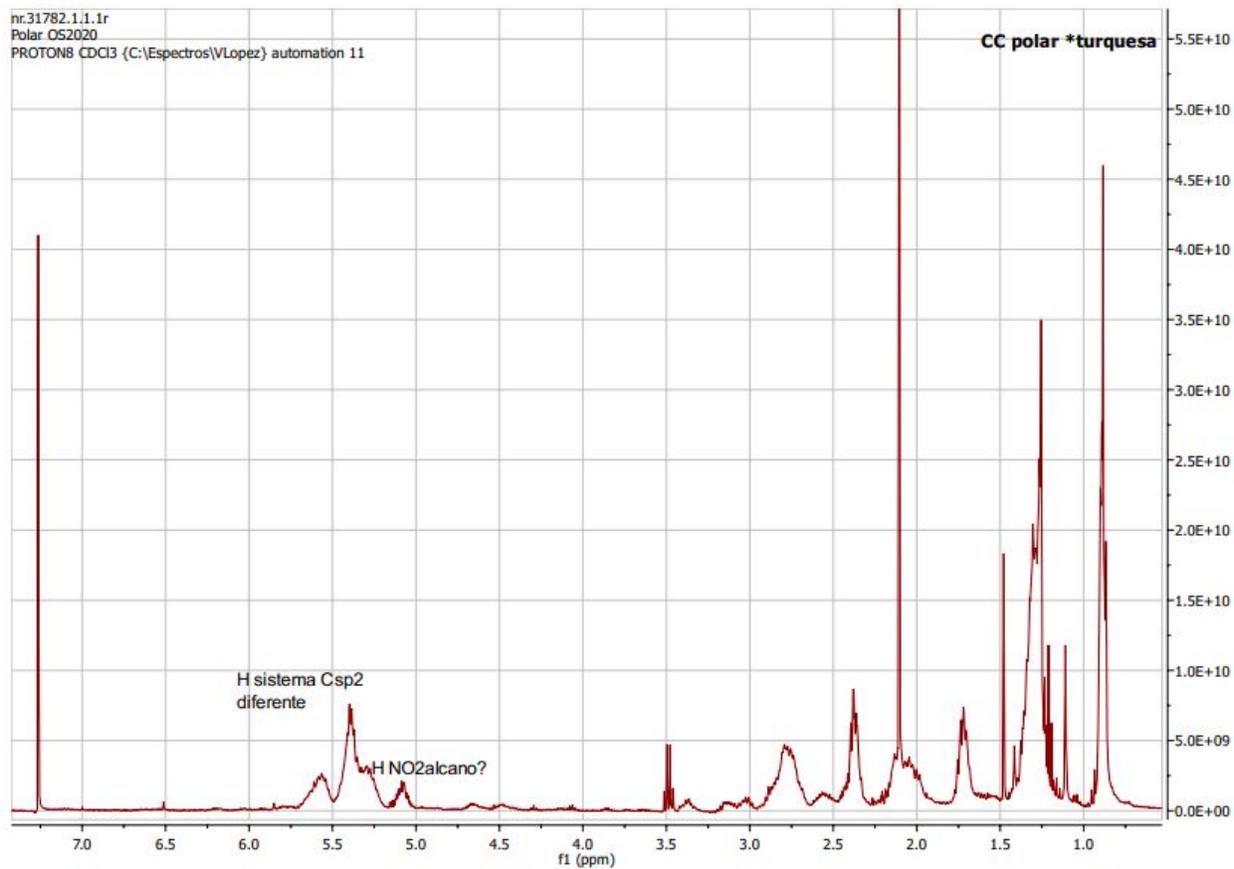


Figura 60. Espectro RMN de la fracción más polar.

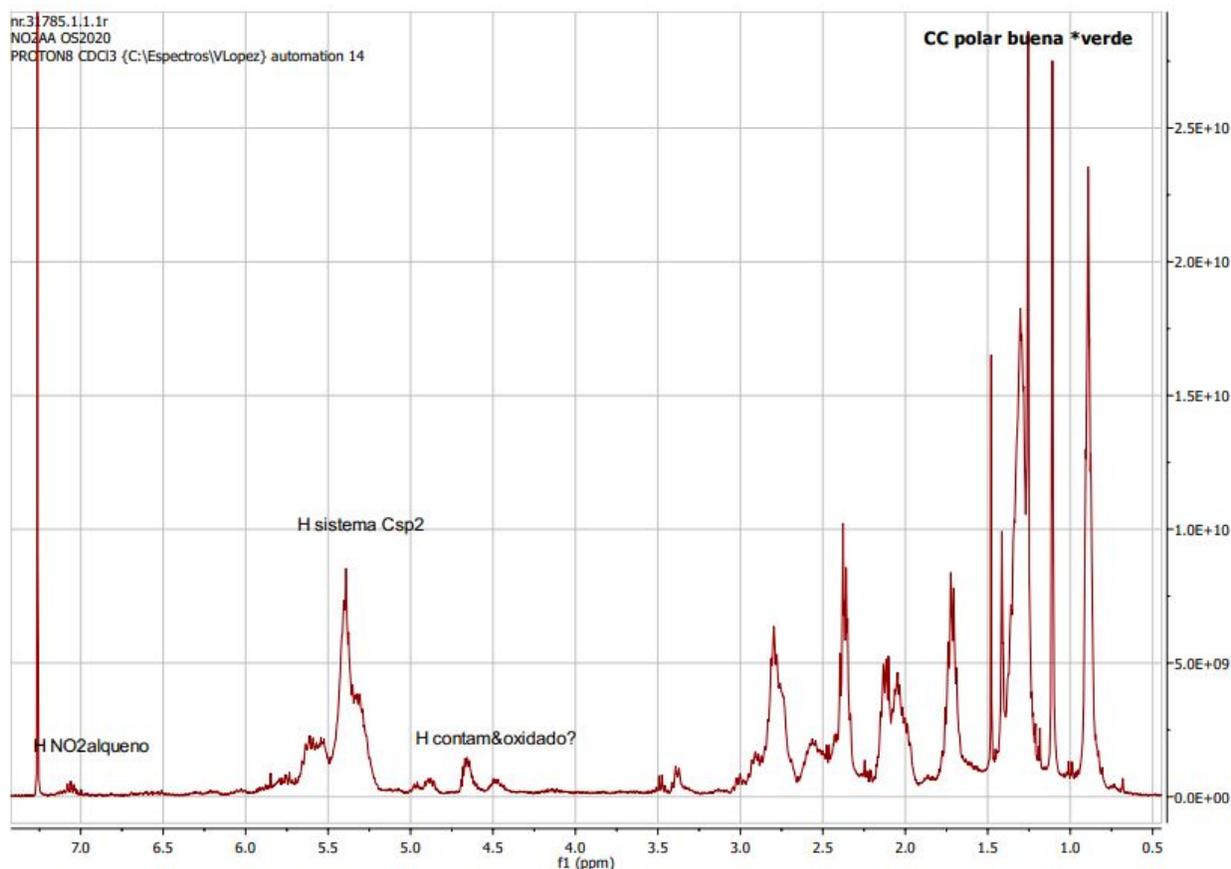


Figura 61. Espectro RMN de la fracción más apolar.

Análisis de la Figura 57. Se puede apreciar como en todos los espectros de la figura 57 está el paquete de los carbonos sp^2 que salen en un acumulo de picos entre 5.0-5.5 ppm al igual que en el espectro del araquidónico (Fig 56), estos picos se deben al sistema de dobles enlaces característico del AA.

Los picos de 7-7.15 ppm son los protones unidos a un carbono sp^2 que contienen el grupo nitro (carbonos unidos al alqueno), estos carbonos ven protones sólo de un lado y del otro lado no los ven ya que se encuentra el doble enlace y el grupo nitro (no hay protones). Estos picos son los que caracterizan al NO_2 -AA y se ven en las las figuras correspondientes a la fracción más apolar y las dos fracciones de la TLC, descartando así la fracción más polar obtenida (figura 60).

En todas las fracciones de la figura 57 hay picos entre 4-5 ppm, estos picos son atribuibles a protones unidos a carbonos que tienen cerca un oxígeno, sea un hydroxy, peroxy, epoxi o también se puede atribuir a que el nitrolípido no sea nitroalqueno y sea nitroalcano.

Por lo tanto se puede concluir de esta purificación por columna que se logró

exitosamente separar distintas fracciones de compuestos derivados del AA y la purificación de NO₂-AA aumentó mucho al hacerle una pTLC luego.

Conclusión

Se logró separar exitosamente las distintas fracciones de isómeros de NO₂-AA y purificar estos luego por pTLC.