



**FACULTADE DE CIENCIAS**

**GRAO EN BIOQUÍMICA**

**D.<sup>a</sup> Sofía Lage González**

**Análisis del contenido de  
ácido úrico, inosina y  
adenosina en leche consumida  
en Galicia.**

**Análise do contido de ácido úrico,  
inosina e adenosina en leite  
consumido en Galicia.**

**Analysis of the uric acid,  
inosine, and adenosine  
content in milk consumed in  
Galicia.**

Traballo Fin de Grao

*Xuño 2025*

## RESUMEN

La metabolómica es una disciplina centrada en analizar el metaboloma, es decir el conjunto de metabolitos presentes en una célula, fluido, tejido u organismo. Uno de los campos a los que se aplican los estudios metabolómicos es en la caracterización de alimentos buscando una alimentación segura y saludable, lo que se conoce como Foodomica. Un objetivo principal de la Foodomica es la investigación sobre los compuestos bioactivos, metabolitos que se encuentran en cantidades pequeñas en los alimentos y que pueden modular uno o más procesos metabólicos resultando beneficiosos para la salud.

El objetivo de este trabajo fin de grado (TFG) consiste en caracterizar la leche consumida en Galicia, un alimento fundamental en nuestra dieta, en cuanto a su contenido en 3 metabolitos bioactivos: los nucleósidos adenosina e inosina y la base nitrogenada ácido úrico utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleando un método puesto a punto en un TFG previo. Para llevar a cabo el análisis, se recogieron muestras de leche en diferentes etapas (leche cruda, termizada, de silo y UHT) en una industria láctea gallega (LARSA) y se aplicaron técnicas de desproteización, centrifugación y filtración permitiendo identificar los compuestos mediante tiempos de retención, espectros de absorción, sobrecargas de patrones y liofilización. Los resultados mostraron que el trabajo permitió validar el método puesto a punto para el análisis de estos metabolitos bioactivos en leche y el método aplicado no modificaba las concentraciones de los tres metabolitos en las distintas etapas de procesado a las que se sometieron las leches. En conclusión, el trabajo demostró la gran importancia de la aplicación del HPLC para la investigación en nutrición y calidad alimentaria.

*Palabras clave:* HPLC, leche, foodomica, metabolitos, fase reversa,

## SUMMARY

Metabolomics is a discipline focused on analysing the metabolome, i.e. the set of metabolites present in a cell, fluid, tissue or organism. One of the fields to which metabolomic studies are applied is the characterisation of foods in pursuit of safe and healthy nutrition, known as Foodomics. A main objective of Foodomics is research into bioactive compounds, metabolites found in small quantities in food that can modulate one or more metabolic processes, resulting in health benefits.

The aim of this final degree project (TFG) is to characterise the milk consumed in Galicia, a staple food in our diet, in terms of its content of three bioactive metabolites: the nucleosides adenosine and inosine and the nitrogenous base uric acid, using high-performance liquid chromatography (HPLC) equipment and a method developed in a previous TFG. To carry out the analysis, milk samples were collected at different stages (raw milk, thermised milk, silo milk and UHT milk) at a Galician dairy (LARSA) and deproteinisation, centrifugation and filtration techniques were applied to identify the compounds using retention times, absorption spectra, pattern overloads and freeze-drying. The results showed that the work validated the method developed for the analysis of these bioactive metabolites in milk and that the method applied did not alter the concentrations of the three metabolites at the different stages of processing to which the milk was subjected. In conclusion, the work demonstrated the great importance of applying HPLC to research in nutrition and food quality.

*Keywords:* HPLC, milk, foodomics, metabolites, reverse phase,

## RESUMO

A metabolómica é unha disciplina centrada en analizar o metaboloma, é dicir o conxunto de metabolitos presentes nunha célula, fluído, tecido ou organismo. Un dos campos aos que se aplican os estudos metabolómicos é na caracterización de alimentos buscando unha alimentación segura e saudable, o que se coñece como Foodomica. Un obxectivo principal da Foodomica é a investigación sobre os compostos bioactivos, metabolitos que se atopan en cantidades pequenas nos alimentos e que poden modular un ou máis procesos metabólicos resultando beneficiosos para a saúde.

O obxectivo de leste traballo fin de grao (TFG) consiste en caracterizar o leite consumido en Galicia, un alimento fundamental na nosa dieta, en canto ao seu contido en 3 metabolitos bioactivos: os nucleósidos adenosina e inosina e a base nitroxenada ácido úrico utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empregando un método posto a punto nun TFG previo. Para levar a cabo a análise, recolléronse mostras de leite en diferentes etapas (leite cruda, termizada, de silo e UHT) nunha industria láctea galega (LARSA) e aplicáronse técnicas de desproteización, centrifugación e filtración permitindo identificar os compostos mediante tempos de retención, espectros de absorción, sobrecargas de patróns e liofilización. Os resultados mostraron que o traballo permitiu validar o método posto a punto para a análise destes metabolitos bioactivos en leite e o método aplicado non modificaba as concentracións dos tres metabolitos nas distintas etapas de procesado ás que se someteron os leites. En conclusión, o traballo demostrou a gran importancia da aplicación do HPLC para a investigación en nutrición e calidade alimentaria.

*Palabras chave:* HPLC, leite, foodomica, metabolitos, fase reversa,

# ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN .....	6
<b>1.1. Metabolómica y metaboloma</b> .....	6
<b>1.2. Aplicaciones de los estudios metabolómicos</b> .....	6
<b>1.3. Aplicación de los estudios metabolómicos a la caracterización de alimentos (Foodomica).</b> .....	7
<b>1.4. Aplicación de la metabolómica a la caracterización de la leche</b> .....	8
1.4.1. <i>¿Qué es la leche?</i> .....	8
1.4.2 <i>Composición de la leche</i> .....	8
1.4.3 <i>Leche UHT</i> .....	9
1.4.4. <i>Importancia de los nucleósidos y los nucleótidos en la leche</i> .....	10
1.6.1 <i>Adenosina, Inosina y Ácido Úrico</i> .....	11
<b>1.5. Etapas en un estudio metabolómico</b> .....	13
2.OBJETIVOS .....	16
3.MATERIAL Y METODOS .....	17
3.1. MATERIAL .....	17
3.1.1. Muestras biológicas.....	17
3.1.2. Reactivos .....	17
3.1.3. Equipos.....	17
3.2. METODOS .....	20
3.2.1. Preparación de la fase móvil .....	20
3.2.2. Preparación de los patrones Adenosina, Inosina y Ácido Úrico. ....	20
3.2.3. Preparación de las muestras biológicas .....	20
3.2.4. Método de Bradford .....	22
3.2.6. Liofilización de las muestras biológicas .....	23
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1. Preparación de las muestras .....	27
4.2. Identificación de los picos.....	29
4.3. Cuantificación de adenosina, inosina y ácido úrico en las leches. ....	33
5.CONCLUSIONES .....	36
6.BIBLIOGRAFÍA.....	37

## ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

BSA: Seroalbúmina bovina

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

KOH: Hidróxido de potasio

PCA: Ácido Perclórico

RMN: Resonancia magnética nuclear

UHT: Ultra High Temperature

UV: Ultravioleta

## 1.INTRODUCCIÓN

### 1.1. Metabolómica y metaboloma

La metabolómica es un campo en constante desarrollo dentro de las ciencias de la vida que combina técnicas avanzadas de química analítica con métodos estadísticos sofisticados para analizar de manera completa el metaboloma. El metaboloma representa la manifestación más cercana del fenotipo capaz de proporcionar información sobre los procesos celulares en respuesta a algunos estímulos y consiste en el conjunto total de metabolitos o pequeñas moléculas con una masa molecular inferior a 1500 Da presentes en una muestra.

El metaboloma es complejo, está formado por cientos de miles de sustancias químicas individuales que pertenecen a numerosas clases químicas diferentes. Por otro lado, algunos metabolitos se encuentran presentes en cantidades muy pequeñas y otros justo lo contrario. Los metabolitos primarios como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, etc., que son esenciales para el crecimiento, desarrollo y funciones fisiológicas del organismo y que se generan de manera rutinaria en las diferentes rutas metabólicas, constituyen el denominado metaboloma endógeno, mientras que los metabolitos secundarios o los xenobióticos, que provienen de fuentes externas como la dieta o el entorno, constituyen el denominado metaboloma exógeno (Wishart, 2019; Villas-Bôas et al., 2007 cap. 1, p. 27).

### 1.2. Aplicaciones de los estudios metabolómicos

El alto grado de sensibilidad de los metabolitos a estímulos tanto internos como externos, tales como la edad, el género, la dieta, la ubicación geográfica, el entorno, el ambiente, el microbioma intestinal y la genética, les permite reflejar de manera precisa el estado fisiológico del organismo por lo que la metabolómica se ha consolidado como una herramienta indispensable en ámbitos como la investigación biomédica, el desarrollo y evaluación de fármacos, la nutrición y diversos estudios fisiológicos, entre otros (Wishart, 2019; Karczewski & Snyder, 2018).

Una de las principales aplicaciones de la metabolómica se encuentra en el campo de la salud donde ha demostrado ser una herramienta clave en el estudio de procesos fisiopatológicos y en el descubrimiento de biomarcadores. Por ejemplo, el análisis

metabólico mediante cribado neonatal dirigido en sangre ha permitido la detección temprana de numerosos errores innatos del metabolismo. Asimismo, la identificación de metabolitos específicos asociados a distintas enfermedades ha impulsado la búsqueda de biomarcadores útiles para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de patologías complejas como el cáncer (D. Wishart, 2022) Parkinson y Alzheimer (Wilkins & Trushina, 2018) Diabetes (Beger et al., 2016), hipertensión (Onuh & Aliani, 2020) y diversas enfermedades raras (Karczewski & Snyder, 2018).

Los estudios metabolómicos se aplican a otros campos, entre ellos para estudiar el impacto de contaminantes en ecosistemas marinos (H. Wu et al., 2016) o la búsqueda de nuevos principios activos relacionándolos con efectos beneficiosos como actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana o anticancerígena (Rinschen et al., 2019). También se considera una herramienta clave para caracterizar alimentos y analizar el impacto de la dieta en la salud, lo que se conoce como Foodomica (Beger et al., 2016).

### **1.3. Aplicación de los estudios metabolómicos a la caracterización de alimentos (Foodomica).**

Actualmente, el consumo de alimentos ha dejado de centrarse únicamente en satisfacer necesidades del organismo pues ahora también se valora su papel en el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades. En este contexto, la foodómica es una disciplina que cobra relevancia al estudiar cómo los alimentos y nutrientes además de influir en los procesos biológicos del cuerpo también abordan la seguridad alimentaria, la calidad, la trazabilidad y la bioactividad molecular permitiendo una comprensión más profunda de su función más allá de la nutrición básica. La foodomica también es crucial para comprender la salud individual ya que desempeña un papel fundamental en la promoción de dietas sostenibles descubriendo biomarcadores que proporcionan conocimientos sobre la malnutrición y los efectos bioquímicos, moleculares y celulares de las biomoléculas alimentarias, lo que ayuda a aclarar los resultados beneficiosos y perjudiciales para la salud. Todo ello es posible gracias a la aplicación e integración de tecnologías omicas avanzadas que permiten interpretar la complejidad del Foodome, que se define como la colección de todos los compuestos presentes en cualquier muestra de alimento o cualquier sistema biológico que interactúe con el alimento investigado en un momento dado (Mahato et al., 2024; Cifuentes, 2017).

## **1.4. Aplicación de la metabolómica a la caracterización de la leche**

### *1.4.1. ¿Qué es la leche?*

La leche es un fluido biológico que segregan las hembras de los mamíferos y constituye el alimento ideal y natural durante las primeras etapas de vida. Su composición nutricional junto con la presencia de hormonas, enzimas, prebióticos, inmunomoduladores protectores, etc, le convierte en una fuente esencial de nutrientes para el recién nacido. En los humanos, su importancia no se limita a la infancia, gracias a su alto valor nutricional y a su riqueza en nutrientes la leche sigue siendo un alimento fundamental en la dieta además de que su consumo se asocia con múltiples beneficios para la salud, como una menor incidencia de enfermedades respiratorias, diabetes, enfermedades gastrointestinales, diarrea y desnutrición (Ma et al., 2017; Wu et al., 2018).

### *1.4.2 Composición de la leche*

La composición de la leche varía a lo largo del periodo de lactancia, comenzando con el calostro, una secreción rica en energía, nutrientes y compuestos bioactivos esenciales como la inmunoglobulina A (IgA) (Silva et al., 2024). La composición de la leche difiere entre especies en función de los requerimientos del lactante, pero todas ellas contienen los mismos componentes.

La leche contiene principalmente proteínas de alta calidad, de las cuales aproximadamente un 75-80% son caseínas, alrededor de un 15% corresponden a proteínas del suero y el resto son fracciones traza de glucoproteínas. Estas proteínas no se obtienen en ningún otro alimento y son cruciales para el crecimiento muscular y fortalecimiento óseo. Los lípidos constituyen la principal fuente de energía en la leche aportando entre el 40-54% de la energía total según el estado de lactancia. Entre los carbohidratos, la lactosa es la que se presenta en mayor concentración y cumple funciones clave como efecto prebiótico, señalización celular, modulación del sistema inmunológico y posible contribución al desarrollo de funciones cognitivas. Por otro lado, existen micronutrientes que se encuentran en menores concentraciones como el glutatión, ácido ascórbico y ácido úrico, así como vitaminas liposolubles (A, D, E) e hidrosolubles (C, B12), y minerales esenciales para la función nerviosa, muscular y ósea. (Wu et al., 2018; Gigli, I. 2014)

### 1.4.3 *Leche UHT*

Como ya se ha comentado, la leche es una de las principales fuentes de nutrientes en la dieta humana, gracias a su alto valor nutricional y a su contenido en proteínas, grasas, vitaminas y minerales esenciales, sin embargo, estas mismas características favorecen el crecimiento de microorganismos, lo que puede comprometer su seguridad y calidad. Por ello, es fundamental aplicar tratamientos de control adecuados, entre ellos los tratamientos térmicos, para mejorar la vida útil de la leche (Krishna et al., 2021).

Uno de estos tratamientos es el procesamiento UHT (Ultra High Temperature) que consiste en calentar a temperaturas elevadas durante un periodo corto de tiempo, al menos 135°C, manteniéndola a esa temperatura durante unos segundos y luego enfriándola rápidamente a temperatura ambiente, de manera que asegura la destrucción total de los microorganismos presentes en la leche cruda dando lugar a una leche estable y con un largo periodo de conservación que permite que la leche pueda envasarse en briks y mantenerse a temperatura ambiente.

Diversos estudios han demostrado que este tratamiento no modifica significativamente la composición nutricional de la leche, preservando muchas de sus propiedades funcionales, lo que cobra particular importancia en el contexto de la foodomica, ya que favorece la conservación de compuestos funcionales de la leche que pueden tener un impacto positivo en la salud (Bai et al., 2023).

En la industria láctea la leche cruda se somete a las siguientes etapas para obtener leche UHT:

- a) La leche cruda que llega a la industria procedente de las explotaciones ganaderas es sometida a un proceso de termización. Este proceso consiste en centrifugar y calentar a una temperatura entre 67-70° durante 15-30 segundos con el fin de eliminar microorganismos, células y demás partículas en suspensión e inactivar enzimas.
- b) La leche termizada se almacena en silos a baja temperatura hasta ser procesada.
- c) Por último, esta leche se somete al tratamiento UHT.

#### *1.4.4. Importancia de los nucleósidos y los nucleótidos en la leche*

Los nucleósidos y nucleótidos son compuestos intracelulares precursores de ácidos nucleicos que están presentes en todos los seres vivos y son considerados los componentes menores de la fracción no proteica y nitrogenada de la leche que participan en diversas funciones reguladoras y metabólicas. Desde el punto de vista estructural, los nucleósidos están formados por una base nitrogenada unida a un azúcar (ribosa o desoxirribosa) mientras que los nucleótidos están formados por un nucleósido unido a uno o más grupos fosfato del azúcar y se caracterizan porque participan en diferentes rutas metabólicas, la transferencia de energía química, son componentes de algunas coenzimas y desempeñan un papel importante como reguladores biológicos.

La síntesis de los nucleósidos y nucleótidos puede llevarse a cabo o bien, de manera endógena a partir de aminoácidos precursores o por vías de recuperación en las que se utilizan los intermediarios generados durante la degradación del ADN y ARN o bien, de manera exógena a través de la dieta. Sin embargo, en ciertas condiciones como estados de enfermedad o ingesta limitada de nutrientes, la producción endógena puede ser insuficiente lo que provoca que estos metabolitos se vuelvan esenciales (Domínguez-Álvarez et al., 2017; Plakantara et al., 2010).

La leche contiene nucleósidos y nucleótidos libres. Diversos estudios comparativos entre especies han demostrado que el contenido de estos metabolitos varía según el origen de la leche y el cálculo de sus proporciones puede servir como herramienta analítica para distinguir, por ejemplo, la leche de vaca de la leche de otras especies. Además, tienen importantes beneficios nutricionales y funcionales beneficiando al crecimiento intestinal, microflora, crecimiento y reparación del hígado además de mejorar la respuesta inmunitaria. Los nucleótidos y nucleósidos en alimentos infantiles representan un campo de aplicación de alto interés, dado que el aporte exógeno de estos compuestos es especialmente relevante durante las etapas de rápido crecimiento, como en bebés y niños pequeños. En este contexto, el alto contenido de nucleótidos en la leche materna humana ha sido decisivo para el desarrollo de nuevas fórmulas infantiles enriquecidas con estos compuestos bioactivos. (Domínguez-Álvarez et al., 2017; Martin et al., 2016).

### 1.6.1 Adenosina, Inosina y Ácido Úrico

La adenosina es un nucleósido de purina compuesto de la base nitrogenada adenina unida a un azúcar ribosa a través de un enlace beta-N9 glucosídico (Figura 1) (Layland et al., 2014; Hallaj et al., 2021).

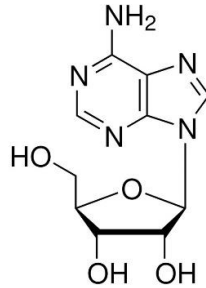


Figura 1. Estructura de la adenosina. Figura tomada de Sigma-Aldrich. (n.d.).

La adenosina es una molécula señalizadora (comunicación autocrina y paracrina). Este nucleósido, interaccionando con receptores específicos situados en la membrana plasmática de las células diana produce vasodilatación en la mayoría de los lechos vasculares. Además, esta molécula está implicada en la regulación de la actividad del sistema nervioso simpático y provoca reducción de la presión arterial y la frecuencia cardíaca (Layland et al., 2014). También se ha observado que tiene un efecto inmunosupresor al inhibir los linfocitos T y macrófagos (Yang et al., 2024) y que influye en enfermedades metabólicas como la diabetes, hipertensión y obesidad, al mejorar la homeostasis de la glucosa aumentando la sensibilidad a la insulina y mejorando su secreción y disminuyendo la producción de glucosa, entre otros muchos efectos (Koupenova & Ravid, 2013).

La inosina es un nucleósido de purina formado por la base nitrogenada hipoxantina unido por su N9 al carbono C1 del azúcar ribosa.

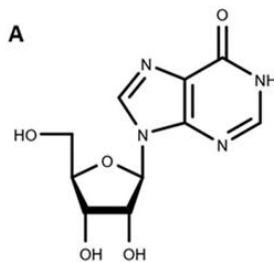


Figura 2. Estructura de la inosina. Figura tomada de (Srinivasan et al., 2021)

La inosina (Figura 2), al igual que la adenosina, es una molécula señalizadora (comunicación autocrina y paracrina) que ejerce su acción por interacción con los receptores de adenosina (Srinivasan et al., 2021). Esta molécula está implicada también en diferentes procesos como la activación de las células T efectoras, reducción del daño oxidativo asociado a enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson, reducción de la inflamación vascular mejora la sensibilidad a la leptina, entre otras. (Cipriani et al., 2014; Kim & Jo, 2022).

El ácido úrico (Figura 3) es una base nitrogenada obtenido de la dieta y del metabolismo endógeno de purinas (Maiuolo et al., 2016).

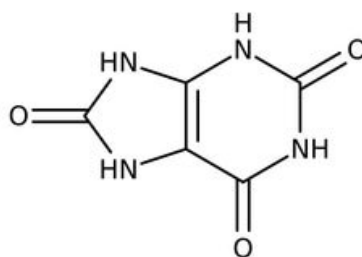


Figura 3. Estructura del ácido úrico. Figura tomada de Thermo Fisher Scientific. (n.d.)

El ácido úrico destaca porque tiene una función dual. En el interior de las células se comporta como prooxidante promoviendo el estrés oxidativo y el daño celular, mientras que fuera de las células se comporta ejerciendo un efecto antioxidante, pero solo en ciertos medio acuosos (Kang & Ha, 2014). También en altas concentraciones se relaciona con enfermedades cardiovasculares como hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca, daño endotelial o aterosclerosis (Cortese et al., 2019).

En relación con la leche, diversos estudios han comprobado que existe una relación inversa entre los niveles de ácido úrico y el consumo de leche, de manera que la leche contiene caseínas y lactoalbúminas que reducen la hiperuricemia a través de un efecto uricosúrico (Towiwat & Li, 2015).

## 1.5. Etapas en un estudio metabolómico

Las diferentes etapas de un estudio metabolómico se resumen en la Figura 4. El primer paso consiste en diseñar el experimento de acuerdo con el enfoque que se le dará al estudio, dirigido o no dirigido. La metabolómica dirigida se basa en detectar y/o cuantificar compuestos específicos, mientras que la metabolómica no dirigida se basa en buscar todos los metabolitos detectables, conocidos y desconocidos en una muestra.

Una vez definido el tipo de análisis a realizar, hay que prestar especial atención a la adecuada preparación de las muestras. En el caso de muestras sólidas, como tejidos, órganos o cultivos celulares, se recoge la muestra biológica y se congela inmediatamente por inmersión en nitrógeno líquido para detener toda actividad metabólica. A continuación, se procede a homogenizar la muestra para extraer los metabolitos a un medio líquido en el que sean estables y que provoque la desproteinización de la muestra. Normalmente se emplean ácidos fuertes como el ácido perclórico o el ácido tricloroacético. En el caso de muestras líquidas (sangre, leche, orina, etc) se someten en primer lugar a centrifugación y filtración con el fin de eliminar residuos sólidos, como células en suspensión, y en segundo lugar se procede a la desproteinización. (Villas-Bôas et al., 2007, cap. 3, pp.39-72).

Una vez que las muestras están preparadas, se procede al análisis de metabolitos para lo cual la herramienta analítica más utilizada es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a diferentes detectores como la espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía ultravioleta/visible, etc (Villas-Bôas et al., 2007, cap. 4, pp. 83-86).

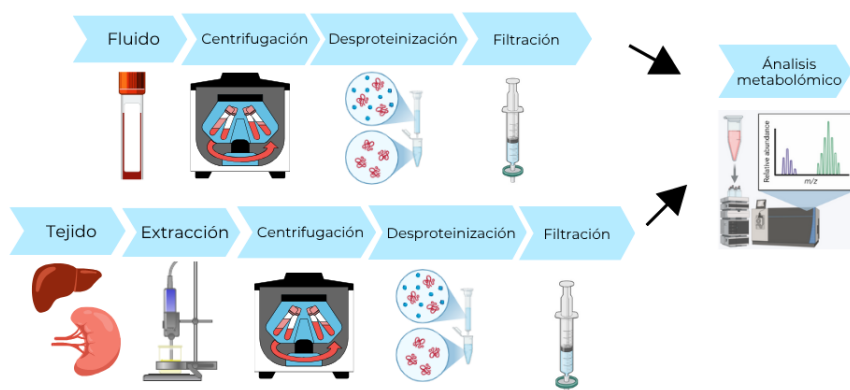


Figura 4. Representación del flujo de trabajo en un estudio metabolómico. Figurada elaborada con Canva

### 1.5.1. *Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*

La cromatografía, un método físico que permite separar los componentes de una mezcla en función de su diferente distribución entre dos fases: una fase móvil y una fase estacionaria. Si la fase estacionaria es un sólido empaquetado en el interior de la columna y la fase móvil un líquido que pasa a su través estamos hablando de una cromatografía líquido-sólido en columna (Polo Díez, L. M. 2015).

Si atendemos al tipo de interacción que se establece entre las moléculas a separar y ambas fases, las técnicas cromatográficas se clasifican en:

1. Cromatografía en fase normal. En este caso las moléculas se separan en base a la polaridad. La fase estacionaria es un sólido polar como pueden ser partículas de sílice y la fase móvil es apolar (Bhati et al., 2022).
2. Cromatografía en fase reversa. En este caso también las moléculas se separan en base a la polaridad. La fase móvil es polar y la fase estacionaria apolar formada por partículas de sílice que llevan unidas cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud (C4, C8, C18, C22), siendo el más frecuente el octadecilsilil (C18).
3. Cromatografía de intercambio iónico. En este caso las moléculas se separan en función de la carga eléctrica. La fase estacionaria (normalmente empaquetada en una columna) está constituida por un material inerte de tipo granular (celulosa, agarosa...) al cual se encuentran unidos de forma covalente grupos químicos cargados positiva o negativamente. La fase móvil suele ser una solución tampón de un determinado pH en la cual sean estables las moléculas a separar (Abdu Hussien, 2022; Polo Díez, L. M. 2015).
4. Cromatografía de exclusión por tamaño. Se basa en la separación por tamaño a través de la interacción de las moléculas con una fase estacionaria porosa que tiene un rango de tamaño que permite a las moléculas entrar y difundirse de manera que las moléculas más grandes no pueden entrar en los poros más pequeños y eluyen más rápidamente por la columna mientras que las pequeñas quedan atrapadas y eluyen más tarde.
5. Cromatografía de afinidad: consiste también en una cromatografía líquido-sólido en la que la resina de cromatografía (fase estacionaria) se empaqueta en una columna. En este caso, los gránulos de resina llevan unidos covalentemente un ligando de afinidad como puede ser un anticuerpo, inhibidores enzimáticos,

cofactores u otras moléculas un soporte sólido de manera reversible y selectiva a las moléculas de interés en la muestra (Polo Díez, L. M. 2015; Abdu Hussen, 2022).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una cromatografía líquido-sólido. El sistema funciona de la siguiente manera: la fase estacionaria está dentro de una columna mientras que la fase móvil se almacena en frascos conectados al equipo. La muestra, que contiene los analitos, se va a inyectar en el sistema y va a ser impulsada por la fase móvil hacia la columna donde interaccionara con la fase estacionaria y a medida que los analitos atraviesan la columna aquellos que tengan mayor afinidad por la fase móvil se desplazarán más rápidamente, mientras que los que presentan mayor afinidad por la fase estacionaria se moverán más lentamente. Para lograr una separación eficiente y de alta resolución, es necesario aplicar una presión muy elevada que permita forzar el paso de la fase móvil a través de la columna. Una vez separados los diferentes analitos en el sistema cromatográfico, y en función de dichas propiedades, estos pueden ser identificados o cuantificados empleando alguno de los múltiples sistemas de detección existentes (García de Marina Bayo, A. 2016; Abdu Hussen, 2022).

## 2.OBJETIVOS

1. El objetivo principal del trabajo de fin de grado (TFG) fue aprender a manejar un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) dada la utilidad de esta herramienta analítica en múltiples campos.
2. Aplicar los conocimientos adquiridos a la valoración del contenido de los nucleósidos Adenosina e Inosina y la base nitrogenada Ácido Úrico en muestras de leche producida en Galicia en las diferentes etapas de procesado hasta llegar a la leche UHT.

### 3.MATERIAL Y METODOS

#### 3.1. MATERIAL

##### 3.1.1. Muestras biológicas

Se utilizaron muestras de leche de las diferentes etapas de procesado (leche cruda, termizada, silo y UHT) recogidas los días 1 y 3 de octubre de 2024 en la Industria láctea Corporación Alimentaria Peña Santa (LARSA) (Outeiro de Rei, Lugo). Las muestras de leche cruda procedían de ganaderías situadas en la localidad de Parga (Lugo).

##### 3.1.2. Reactivos

Para la preparación de los patrones se utilizan como reactivos ácido úrico, inosina y adenosina de la casa comercial Sigma. Agua Milli-Q ultrapura obtenida del Centro de Apoyo Científico Tecnológico USC (CACTUS). Por otro lado, para la preparación de los tampones: Acetonitrilo (ACN) y Fosfato monopotásico ( $K_2PO_4$ ), ambos de la marca comercial Merck.

Para la preparación de las muestras se utiliza Acido perclórico (PCA) de la casa Sigma e Hidróxido potásico (KOH) de la casa comercial Merck para ajustar el pH de las muestras, los patrones y los tampones.

Para medir la concentración de las proteínas por el método de Bradford se emplea una disolución estándar de seroalbúmina (BSA) y azul de Coomassie, ambos de la casa comercial Sigma.

##### 3.1.3. Equipos

- a) Balanza analítica marca Sartorius 1409
- b) Balanza 1601
- c) Baño termostático Labolan
- d) pHmetro CRISON
- e) papel indicador de pH (0,5-5,5) de la casa comercial Macherey Nagel
- f) Centrifuga BECKMAN J2-21 con rotor JA-20
- g) Sistema de filtración a vacío Saskia HOCHVAKUUM
- h) Espectrofotómetro Lan Optics, modelo UV-11

- i) Vortex Heidolph reax 2000
- j) Centrifuga de tubos marca P-Selecta modelo 201116
- k) Filtros de tamaño de poro 0,22 y 0,45  $\mu\text{m}$ , ambos de la marca comercial MILLIPORE modelo millex-GV 13
- l) Liofilizador marca CHRIST



a) balanza                      b) balanza analítica                      c) baño termostaticado                      d) pHmetro



e) papel indicador pH                      f) centrifuga                      g) sistema de filtración al vacío                      h) espectrofotómetro



i)vortex                      j) centrifuga de tubos                      k) filtro de poro MILIPORE                      l) liofilizador

Figura 5. Materiales empleados

m) **HPLC** de la marca Agilent Technologies, modelo 1100.

El HPLC está formado por distintos componentes:

- 1) Depósito de la fase móvil
- 2) Desgasificador: tiene como objetivo eliminar las burbujas en la fase móvil
- 3) Sistema de bombeo. Se trata de una bomba cuaternaria que permite trabajar hasta con 4 solventes de manera simultánea.
- 4) Inyector automático con una bandeja de 100 pocillos
- 5) Columna rellena con la fase estacionaria (nucleosil C-18)
- 6) Sistema de detección. Detector UV (*diode array*)



Figura 6. Componentes del equipo cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): 1) depósito de fase móvil, 2) desgasificador, 3) sistema de bombeo, 4) inyector, 5) columna 6) detector

## 3.2.METODOS

### 3.2.1. Preparación de la fase móvil

La fase móvil está formada por dos tampones:

- Tampón A, que contiene fosfato monopotásico ( $K_2PO_4$ ) 25 mM ajustado a pH 5,5 con KOH 2M.
- Tampón B, que contiene fosfato monopotásico ( $K_2PO_4$ ) 125 mM más acetonitrilo (ACN) en proporción 3:1 (v/v), el cual actúa aumentando la apolaridad del tampón, cuyo pH también se ajustó a 5,5 con KOH 2M.

Ambos tampones ya preparados, se sometieron a un proceso de filtración al vacío.

### 3.2.2. Preparación de los patrones Adenosina, Inosina y Ácido Úrico.

Se preparon disoluciones patrón de Adenosina, Inosina y Ácido Úrico de concentración 10 mM y volumen 1 mL. A partir de las disoluciones madre, se prepara una mezcla patrón de concentración 100  $\mu$ M y a partir de esta, disoluciones de concentración: 50  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M que se utilizaran para obtener una recta patrón de cada uno de los metabolitos. En todos los casos se añadieron 5 uL de hidróxido de potasio (KOH) para asegurar la correcta disolución del ácido úrico.

### 3.2.3. Preparación de las muestras biológicas

Como se mencionó previamente, las muestras de leche fueron recogidas los días 1 y 3 de octubre de 2024 de la Industria láctea Corporación Alimentaria Peña Santa (CAPSA). Posteriormente, se realizaron alícuotas de cada una de las muestras e inmediatamente se conservaron mediante congelación para su posterior análisis. En primer lugar, después de la descongelación de las muestras, se sometieron a un proceso de centrifugación a 15.000 rpm durante 10 minutos para eliminar las células circulantes, microorganismos y lípidos que podía haber. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una gasa. Una vez que las muestras estaban centrifugadas, se llevó a cabo una desproteinización añadiendo ácido perclórico (PCA) 0,6 M en dos proporciones (v/v): 1:0,5 y 1:1. Después de añadir el PCA, se dejaron reposar las muestras. El siguiente paso fue una centrifugación a baja temperatura (4°C) durante 15 minutos a 15.000 revoluciones y se añadió hidróxido de potasio (KOH) 2M para aumentar el pH de las muestras hasta un valor entre 2,5 y 3. Por

último, se llevó a cabo una última centrifugación durante 10 minutos a 13.000 rpm y se filtró el sobrenadante a través de filtros de tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  acoplados a jeringa.

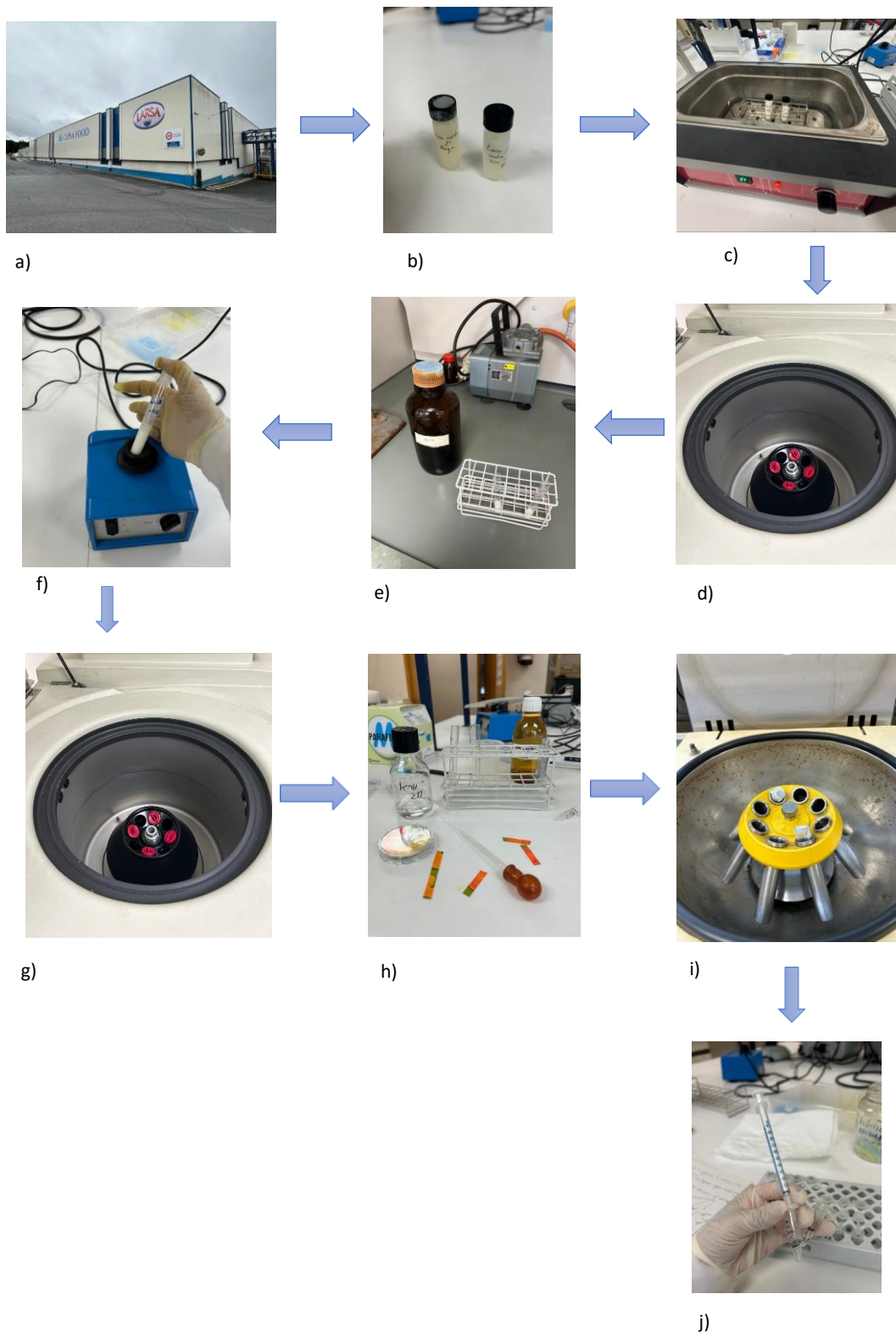


Figura 7. Esquema de preparación de muestras: a) recogida de muestra b) congelación c) descongelación d) centrifugación a 15.000 rpm e) desproteínización 1:0,5 f) agitación g) centrifugación a 15.000 rpm h) alcalinización i) centrifugación j) filtración a través de poro 0,22  $\mu\text{m}$

### 3.2.4. Método de Bradford

El método de Bradford es una técnica colorimétrica que se basa en utilizar el reactivo de Bradford, caracterizado por la presencia de azul de Coomassie, un colorante azul que se une a las proteínas presentes en una muestra, y una solución de seroalbúmina bovina de 0,2 mg/mL preparada a partir de BSA 1mg/mL que se utiliza como estándar para construir la recta de calibrado. El azul de Coomassie provoca un cambio en el color de la muestra dependiendo de la cantidad de proteína a la que se une. Inicialmente, el color del azul de Coomassie es marrón, pero a medida que se une a las proteínas de la muestra, el color se va transformando a un tono azul. Este cambio de color es directamente proporcional a la concentración de proteína en la muestra, permitiendo así su cuantificación mediante absorbancia.



Figura 8. Representación del método de Bradford: a la izquierda estándares para la recta de calibrado y a la derecha espectrofotómetro utilizado para medir la absorbancia

### 3.2.5. Método de separación del ácido úrico, adenosina e inosina.

Como método de separación de los metabolitos a analizar en las muestras de leche, se empleó una cromatografía en fase reversa con un método de elución en gradiente que ya había sido puesto a punto en un TFG previo. La fase estacionaria era apolar formada por sílice unido a cadenas hidrocarbonadas de 18 carbonos y la fase móvil era polar formada por la combinación de los tampones A y B.

Como se puede observar en la figura 9, durante los 2 primeros minutos, la fase móvil está compuesta exclusivamente por tampón A (100 %), sin presencia de tampón B. Es a partir

del minuto 2 y hasta el minuto 15 donde se incrementa de forma gradual la proporción de tampón B hasta alcanzar un 70 % y se mantiene constante durante los siguientes 10 minutos, es decir, desde el minuto 15 hasta el minuto 25. Posteriormente, se restablecen las condiciones iniciales, regresando al 100 % de tampón A en el minuto 27, y se mantienen estas condiciones durante 10 minutos adicionales para volver a las condiciones iniciales del método.

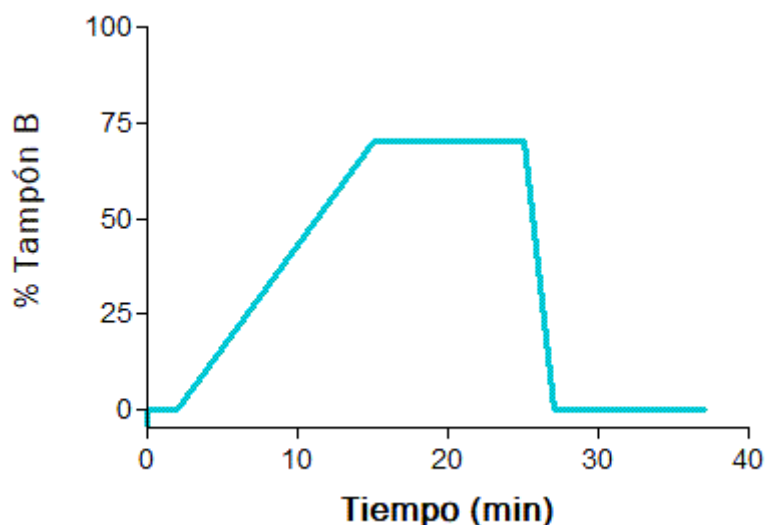


Figura 9. Representación gráfica del método de separación en gradiente empleado

### 3.2.6. Liofilización de las muestras biológicas

La liofilización consiste en congelar la muestra a una baja temperatura ( $-60^{\circ}\text{C}$ ) en una cámara de vacío donde el hielo se convierte directamente en vapor de agua aumentando la concentración de los componentes sólidos. La liofilización se realiza con el objetivo de concentrar las muestras de leche, de manera que se obtengan picos mejor definidos y más grandes.

Preparación de las muestras liofilizadas:

En primer lugar, se encendió el motor del liofilizador junto el sistema de vacío y refrigerador durante 15 minutos. Una vez preparado el liofilizador, las muestras congeladas (alícuotas de 5 mL) se introdujeron de inmediato en el liofilizador y se sometieron al proceso de liofilización durante toda la noche.

Finalizada la liofilización, las muestras se redisolieron en 1 mL de agua Milli-Q. A continuación, se realizó la desproteinización mediante la adición de ácido perclórico (PCA) en una proporción 1:1 (v/v). La mezcla se agitó en un agitador tipo vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se sometieron a un primer proceso de centrifugación y se ajustó el pH con hidróxido de potasio (KOH) hasta alcanzar un valor aproximado de pH 4.

Finalmente, se realizó una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones, y los sobrenadantes se filtraron utilizando filtros de membrana con poro de  $0,22\ \mu\text{M}$ , obteniéndose así muestras más estables para su posterior análisis.



Figura 10. Proceso de liofilización de muestras de leche congeladas

#### 4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, para empezar a manejar el equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se procedió inicialmente a la inyección individual de los estándares de adenosina, inosina y ácido úrico utilizando el método de separación en gradiente mencionado en el apartado 3.2.5 con el objetivo de identificar los 3 metabolitos. Con estas fases estacionaria y móvil, el tiempo de retención es mayor para las moléculas apolares mientras que las moléculas polares eluyen con mayor facilidad, pero existen otros trabajos que utilizan otras fases estacionarias como gel de sílice (Krawczyk et al., 2018) o partículas híbridas de sílice orgánica-inorgánica (Fekete et al., 2022).

El sistema HPLC funcionaba a una presión elevada, en torno a 110 bar que permitía forzar el paso de la fase móvil a través de la columna a un flujo de 0,7 ml/min. Durante este proceso, los componentes de la muestra se separaron en función de su afinidad relativa por la fase móvil (polar) y la fase estacionaria (apolar). Además, el detector UV (*diode array*) detectaba los analitos que fluían de la columna a lo largo del tiempo. Esto es algo fundamental e importante que nos permitirá más adelante detectar estos metabolitos en otras muestras más complejas como fue la leche en mi caso.

El objetivo del análisis cromatográfico mediante el HPLC es ser capaces de identificar los metabolitos: ácido úrico, inosina y adenosina en las distintas muestras de leches y para ello utilizamos 3 métodos:

- Tiempo de retención. Dado que sabemos que cada uno de estos compuestos tiene un tiempo de retención característico bajo condiciones experimentales específicas, comparamos el tiempo de retención de los picos en las muestras de leche con los que habíamos obtenido de los patrones.
- Espectros de absorción entre 220 y 320 nm recogidos con el detector *diode array*. Los 3 metabolitos absorben luz en el espectro UV, pero presentan distintos máximos de absorbancia en diferentes longitudes de onda, cada uno de ellos es característico por tener una longitud donde absorbe mejor. Como se puede observar en la figura 11, el ácido úrico presenta dos máximos de absorbancia uno a 235 nm y otro a 280 nm. La inosina (Figura 12) presenta un único máximo en torno a 250 nm, igual sucede con la adenosina (Figura 13) pero en este caso el máximo lo presenta a 254 nm.

- Sobrecarga del patrón: se realizan sobrecargas de las leches con distintas concentraciones de patrón.

Posteriormente, se inyectó una mezcla patrón de concentración 100  $\mu\text{M}$  de los 3 metabolitos y se observó en el equipo como el ácido úrico eluía a un tiempo de retención entorno a 4,8 minutos, la inosina a los 9,9 minutos y la adenosina a los 12,8 minutos como se puede apreciar en la figura 11. Con los tiempos de retención no se podía confirmar que las moléculas correspondían a nuestros metabolitos (ácido úrico, adenosina e inosina). Por este motivo, analizamos el espectro de absorción de los picos y como se muestra en las Figuras 12, 13 y 14, los espectros obtenidos coincidieron con los característicos de cada metabolito, lo que confirmó su correcta identificación.

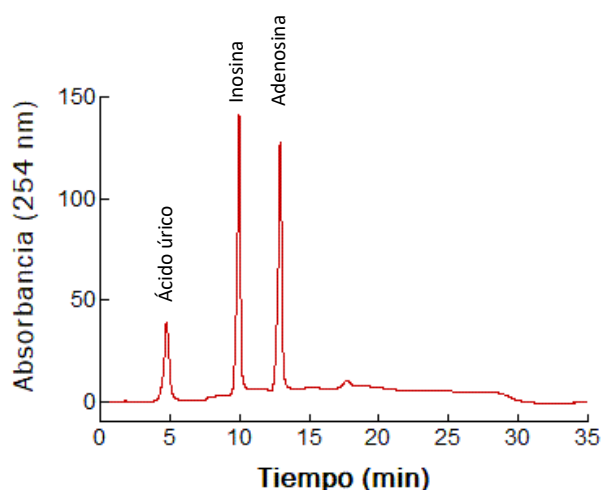


Figura 11. Cromatograma obtenido de la elución de una mezcla patrón de adenosina, inosina y ácido úrico de concentración 100  $\mu\text{M}$ .

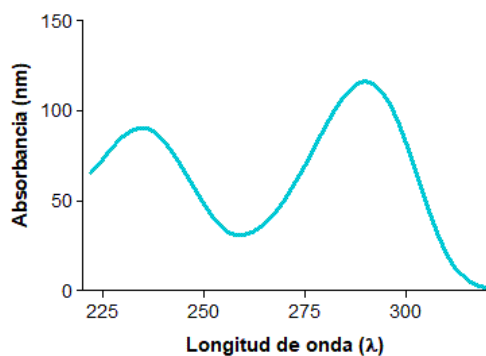


Figura 12. Espectro de absorción de ácido úrico entre 220 y 320 nm.

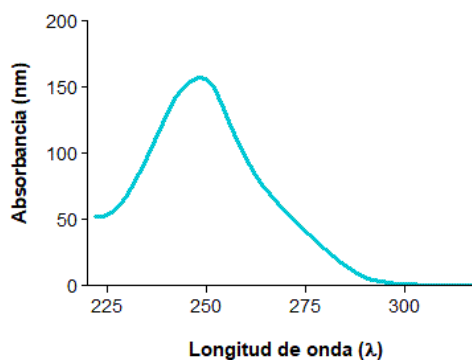


Figura 13. Espectro de absorción de inosina entre 220 y 320 nm.

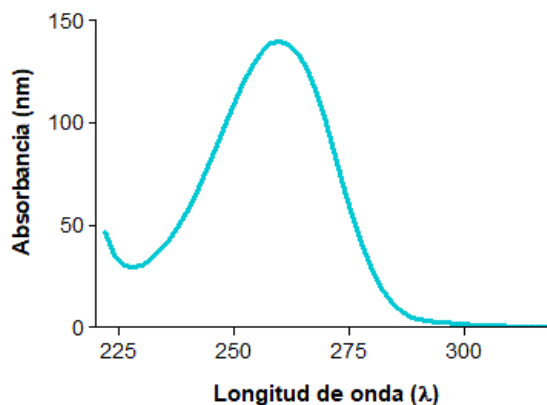


Figura 14. Espectro de absorción de adenosina entre 220 y 320 nm.

#### 4.1. Preparación de las muestras

En este trabajo utilizamos ácido perclórico (PCA) para desproteinizar las muestras. Aunque los medios ácidos como el perclórico o el ácido tricloroacético son los más utilizados, algunos autores utilizan también otros solventes como el metanol (Wu et al., 2016) o el acetonitrilo (ACN) (En Edict Yanibada et al., 2018)

En primer lugar, se procedió a analizar la proporción de PCA que permitiera una total desproteinización de las muestras y la valoración de los metabolitos de interés dado que estos se encuentran en concentraciones pequeñas en las muestras. Se trabajó con dos proporciones diferentes: 1:1 y 1:0,5 y para comprobar la desproteinización se utilizó el método de Bradford. Los resultados (Tabla 2) mostraron que la proporción 1:0,5 era suficiente ya que las muestras tratadas con esta proporción no contenían proteínas.

Adicionalmente, la aplicación del método de Bradford fue útil para cuantificar la concentración de proteínas en las diferentes etapas de procesado de la leche. Para ello, se prepararon distintos estándares de diferente concentración de la seroalbúmina bovina (BSA) y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. La representación de la absorbancia frente a la cantidad de proteína nos permitió obtener una recta de calibrado que se utilizó posteriormente para calcular las concentraciones de las distintas muestras de leche antes de ser tratadas con el PCA

Las muestras de leche se prepararon diluyendo 1:20 (50 uL de leche + 950 uL de agua mili-Q) y se midió la absorbancia en todas las leches.

MUESTRAS	Cubeta n°	Muestra (µL)	H2O (µl)	R.Bradford (mL)	[ ] g/100 mL	Abs
	B	0	100	1		
	1	10	90	1	0,002	0,141
<b>DISOLUCION</b>	2	20	80	1	0,004	0,27
<b>ESTANDAR</b>	3	35	65	1	0,007	0,469
<b>SEROALBUMINA</b>	4	50	50	1	0,01	0,604
<b>(0,2 mg/mL)</b>	5	75	100	1	0,015	0,781
	6	100	0	1	0,02	0,981

Tabla1. Datos de concentración y absorbancia de las disoluciones estándar para obtener la recta de calibrado

$$y = 45,608x + 0,100$$

Con esta recta patrón obteníamos las concentraciones de las muestras de leche sometidas a desproteinización 1:0,5 y 1:1 (Tabla 2) y las concentraciones de las muestras en las diferentes etapas de procesado de la leche (Tabla 3):

MUESTRAS	Cubeta n°	Muestra (µL)	H2O (µl)	R.Bradford (mL)	[ ] g/100 mL	Abs
<b>1:1 (día 01/10)</b>	Cruda	10	90	1	0	0,100
<b>1:0,5 (día 01/10)</b>	Cruda	10	90	1	0	0,125
<b>1:1 (día 03/10)</b>	Cruda	10	90	1	0	0,108
<b>1:0,5 (día 03/10)</b>	Cruda	10	90	1	0	0,120

Tabla. 2 Datos de las muestras de leche cruda tratadas con PCA en las dos proporciones.

MUESTRAS	Cubeta n°	Muestra (µL)	H2O (µl)	R.Bradford (mL)	[ ] g/100 mL	Abs
	Cruda	10	90	1	2,92	0,779
<b>muestra problema</b>	Silo	10	90	1	2,9	0,775
<b>leche diluida 1:20</b>	Termizada	10	90	1	2,98	0,793
	UHT	10	90	1	2,9	0,758

Tabla 3. Datos de las muestras de leche cruda, silo, termizada y UHT.

Con esto concluíamos que los distintos tratamientos a los que se sometían las leches no influían en la concentración de las proteínas, ya que todas ellas tienen valores iguales.

## 4.2. Identificación de los picos

Después de la inyección de la mezcla patrón de los metabolitos, se pasó a realizar las primeras inyecciones de 100  $\mu$ L de las muestras correspondientes a las distintas etapas de procesado de la leche: cruda, termizada, de Silo y UHT. Tal y como se observan en las Figuras 15, 16 y 17 el método de separación cromatográfica empleado a simple vista no permitió detectar diferencias significativas en la concentración de metabolitos ya que los cromatogramas eran similares entre sí. Esta similitud entre las diferentes leches podría sugerir que bajo las condiciones cromatográficas utilizadas los tratamientos a los que se sometieron las leches no generaron variaciones cuantificables en los analitos detectados.

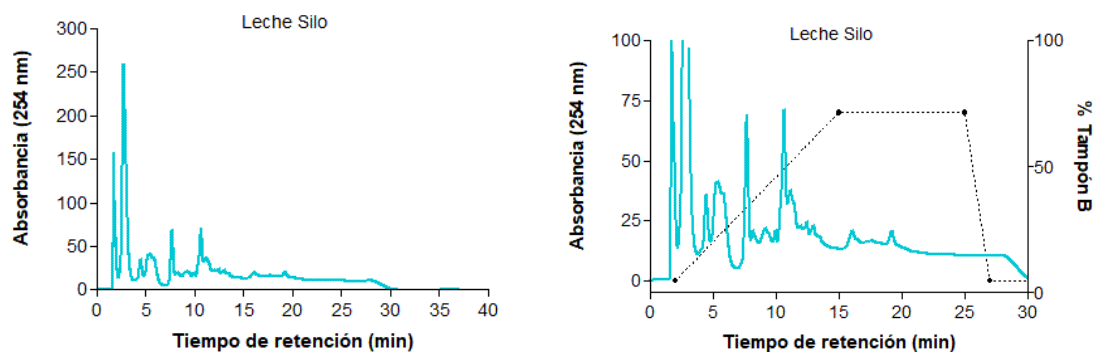


Figura 15. A la izquierda, separación de los componentes de una muestra de leche de Silo utilizando un gradiente en fase reversa y a la derecha, ampliación de la separación con la representación gráfica del gradiente utilizado.

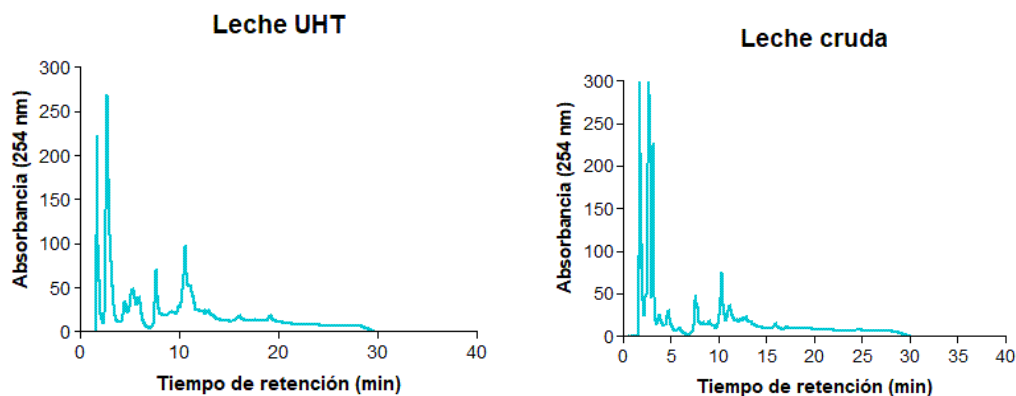


Figura 16. A la izquierda, separación de los componentes de una muestra de leche de UHT utilizando un gradiente en fase reversa y a la derecha separación de los componentes de una muestra de leche cruda.

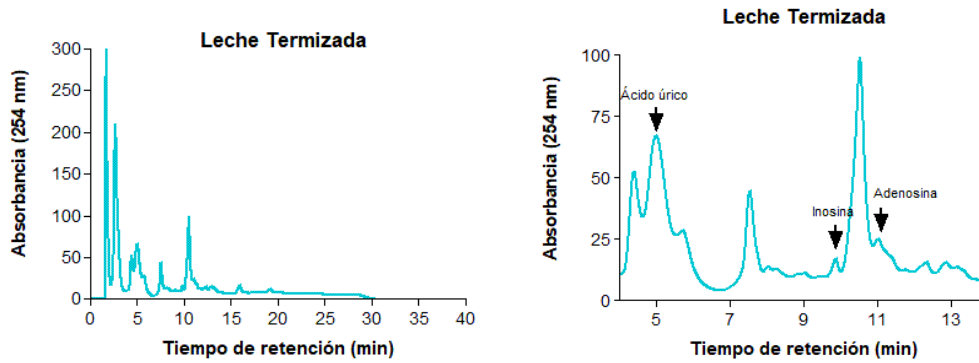


Figura 17. Separación de los componentes de una muestra de leche termizada, realizada mediante cromatografía en fase reversa, aplicando un método de separación en gradiente. La imagen a la derecha muestra una visión ampliada del cromatograma con la señalización de los picos de los metabolitos ácido úrico, inosina y adenosina.

Por otro lado, aunque los tiempos de retención y los espectros de absorción obtenidos mostraron similitud con los patrones de adenosina, inosina y ácido úrico, la resolución de los picos no era suficientemente clara como para poder confirmar que las moléculas se correspondían con adenosina, inosina y ácido úrico. Debido a que la identificación por los picos era compleja, se realizaron sobrecargas. Esta técnica consiste en añadir a cada muestra de leche un volumen pequeño de la mezcla patrón de los 3 metabolitos de manera que así el pico sea más grande y se pueda detectar mejor. Para ello, como podemos observar en la Figura 18 se añadió un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de una mezcla patrón de los 3 metabolitos de concentración 10  $\mu\text{M}$  pero esta sobrecarga era demasiado grande lo que impedía una visualización clara de los picos.

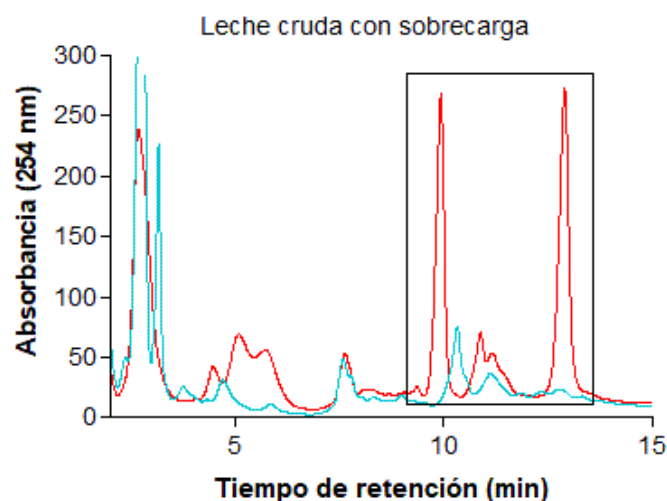


Figura 18. Separación de los componentes de una muestra de leche cruda, realizada mediante cromatografía en fase reversa, aplicando un método de separación en gradiente. La imagen a muestra la leche cruda sin sobrecarga (azul) y la leche con sobrecarga de concentración 10  $\mu\text{M}$  (línea roja) donde se observa la gran sobrecarga que impide una visualización clara de los picos.

Por este motivo, se repitió el proceso, pero utilizando una concentración menor. Como se observa en la Figura 19, la adición de 10  $\mu\text{L}$  de una mezcla patrón de concentración 5  $\mu\text{M}$  permitió obtener una sobrecarga más adecuada. Con esta concentración, se logró un aumento en la señal lo suficientemente notable como para mejorar la resolución de los picos permitiendo una identificación más eficaz de los metabolitos en las distintas muestras de leche

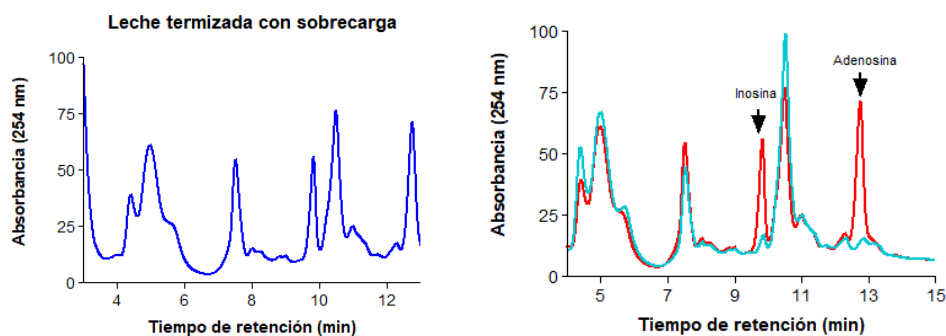


Figura 19. A la izquierda separación de los componentes de una muestra de leche termizada con sobrecarga 5  $\mu\text{M}$ , realizada mediante cromatografía en fase reversa, aplicando un método de separación en gradiente. La imagen a la derecha muestra una superposición de una muestra de leche termizada sin sobrecarga (línea azul) con la muestra de leche termizada con sobrecarga 5  $\mu\text{M}$  (línea roja)

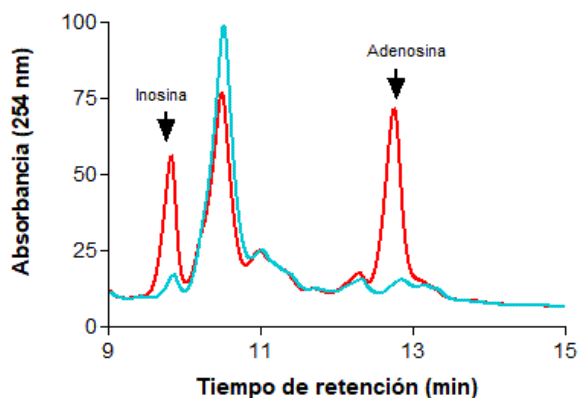


Figura 20. Ampliación de la sobrecarga de leche termizada donde se observa como la identificación de la inosina y la adenosina es más clara

En los cromatogramas presentados, se observa que en la Figura 20 la adenosina y la inosina presentan una sobrecarga óptima tras la adición del patrón. En cambio, en la Figura 19, el ácido úrico no muestra una diferencia apreciable respecto a la muestra de leche termizada, lo que indica que la sobrecarga no fue tan efectiva en este caso. Esta diferencia se debe a la distinta solubilidad de los compuestos en función del pH. Tanto la adenosina como la inosina, al ser nucleósidos, presentan una buena solubilidad en medios neutros ( $\text{pH} \sim 7$ ) mientras que el ácido úrico tiene solubilidad mucho más limitada a dicho pH. Por ello, al preparar la disolución patrón a 5  $\mu\text{M}$  es probable que el ácido úrico no se

disolviera completamente y precipitara, lo que explicaría la ausencia de un pico claramente visible tras la sobrecarga. La adición de hidróxido de potasio (KOH) hubiera impedido que el ácido úrico precipitase

La sobrecarga con patrones no fue el único método al que se recurrió para conseguir una mejor identificación y resolución de los picos cromatográficos. Tal y como se puede observar en la figura 21, se realizó la inyección en el equipo de una muestra de leche UHT previamente liofilizada. Al compararla con la leche UHT sin concentrar (Figura 22), se observa una mejora notable en la resolución y el tamaño del pico, lo que permite concluir que el proceso de concentración de las muestras mediante liofilización contribuye de forma significativa a mejorar la resolución cromatográfica.

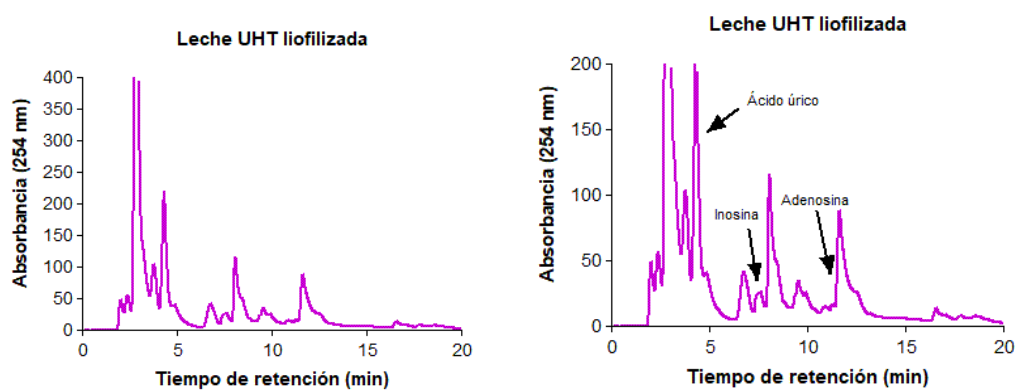


Figura 21. A la izquierda separación de los componentes de una muestra de leche UHT liofilizada realizada mediante cromatografía en fase reversa, aplicando un método de separación en gradiente. La imagen a la derecha muestra una ampliación del cromatograma con la identificación de los picos de ácido úrico, inosina y adenosina.

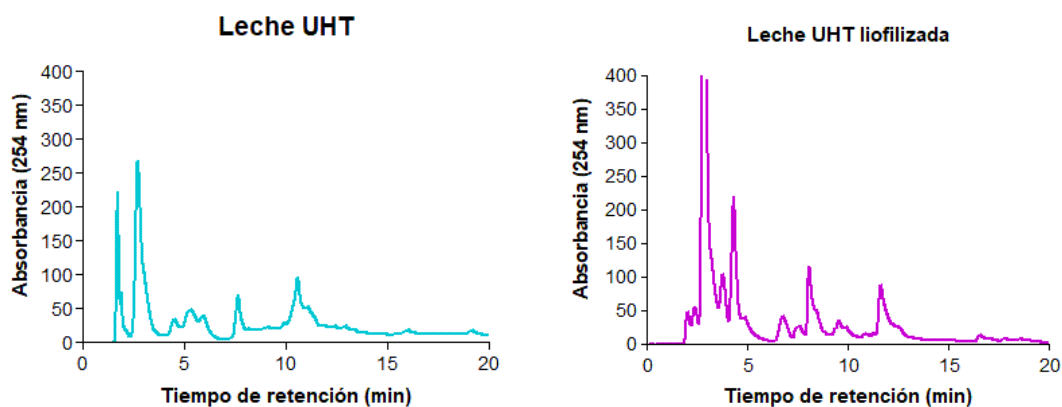


Figura 22. A la izquierda separación de los componentes de una muestra de leche UHT y a la derecha la misma muestra UHT mediante un método de separación en gradiente donde se observa que la liofilización nos da una mejor resolución, con picos mas grandes y mejor definidos.

### 4.3. Cuantificación de adenosina, inosina y ácido úrico en las leches.

A partir de las distintas diluciones preparadas con los patrones descritos en el apartado 3.2.2, se establecieron tres rectas de calibrado individuales representadas en las figuras 22, 23 y 24 una para cada metabolito: adenosina, inosina y ácido úrico todas ellas recogidas en una longitud de onda de 254 nm. En estas rectas, se relacionaba el área del pico cromatográfico (eje Y) con las concentraciones conocidas de los estándares (eje X) que estaban en un rango comprendido entre 250 y 10.000 picomoles inyectados.

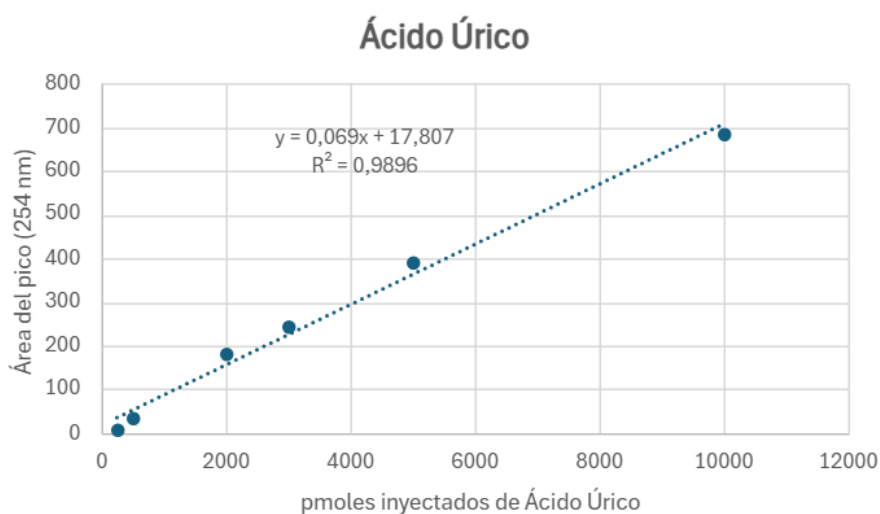


Figura 22. Recta de calibrado para el ácido úrico, calculado entre 250 y 10.000 picomoles.

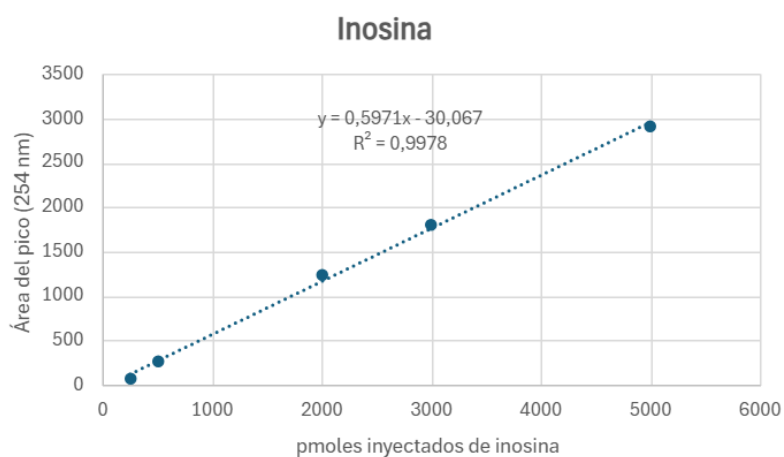


Figura 23. Recta de calibrado para la inosina, calculado entre 250 y 10.000 picomoles.

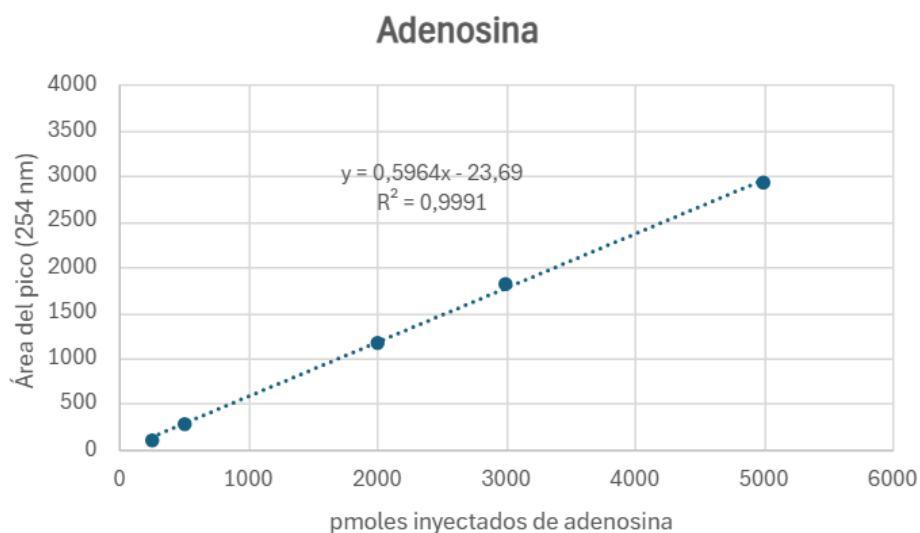


Figura 24. Recta de calibrado para la adenosina, calculado entre 250 y 10.000 picomoles.

De esta manera, con las 3 rectas patrón, a partir del área del pico de las muestras inyectadas de las distintas etapas de la leche podemos saber cuántos micromoles inyectamos de cada uno de los 3 compuestos y por lo tanto la concentración:

ÁCIDO ÚRICO	Área del pico	Picomoles	Concentración ( $\mu\text{mol/L}$ )
<b>Cruda</b>	531,071	7438,81	74,17 $\mu\text{M}$
<b>Termizada</b>	508,59	7112,80	71,12 $\mu\text{M}$
<b>Silo</b>	529,601	7417,30	74,17 $\mu\text{M}$
<b>UHT</b>	531,3	7441,93	74,41 $\mu\text{M}$

Tabla 4. Valores de ácido úrico para las leches cruda, termizada, silo y UHT

INOSINA	Área del pico	Picomoles	Concentración ( $\mu\text{mol/L}$ )
<b>Cruda</b>	29,7	100	1 $\mu\text{M}$
<b>Termizada</b>	28,48	98	0,98 $\mu\text{M}$
<b>Silo</b>	28,54	98	0,98 $\mu\text{M}$
<b>UHT</b>	35,64	110	1,1 $\mu\text{M}$

Tabla 5. Valores de inosina para las leches cruda, termizada, silo y UHT

ADENOSINA	Área del pico	Picomoles	Concentración ( $\mu\text{mol/L}$ )
<b>Cruda</b>	37,45	102	1,02 $\mu\text{M}$
<b>Termizada</b>	33,071	96	0,96 $\mu\text{M}$
<b>Silo</b>	35,46	99	0,99 $\mu\text{M}$
<b>UHT</b>	36,4	100,75	1 $\mu\text{M}$

Tabla 6. Valores de adenosina para las leches cruda, termizada, silo y UHT

Con esto podemos confirmar que, con las rectas de calibrado, la concentración de los 3 metabolitos en las distintas etapas de la leche no varía y que por lo tanto no afecta a la concentración de metabolitos el procesado de las diferentes etapas.

Por otra parte, las bajas concentraciones de los nucleósidos adenosina e inosina, su alta solubilidad en medios acuosos y la interferencia de otras moléculas presentes en la leche, hace que la cuantificación de nucleósidos sea limitada. A pesar de estas limitaciones, existen varios estudios que han logrado detectar y cuantificar estos metabolitos con precisión. Por ejemplo, se ha demostrado que la concentración de adenosina en leche de cabra es significativamente superior a la leche de oveja alcanzando valores de hasta tres veces mayor, lo que sugiere diferencias metabólicas entre especies y posibles implicaciones en la función neonatal. En cuanto la inosina, se observó que a diferencia de la mayoría de los nucleósidos que presentan concentraciones más altas en el calostro y leche de transición, en leche de oveja no tiene esta tendencia y presenta valores constantes o incluso menores lo que sugiere que puede deberse a diferencias metabólicas. (Plakantara et al., 2010). Respecto al ácido úrico, aunque sus niveles en la leche son más altos que los de adenosina e inosina, no es en la leche de vaca donde se encuentran en mayor concentración. De hecho, la leche de cabra presenta los niveles más altos de ácido úrico seguido de la leche de oveja. Esto podría deberse a diferencias en la actividad de enzimas o por mecanismos específicos de secreción en glándula mamaria entre las especies. (Fan et al., 2023).

## 5.CONCLUSIONES

1. He logrado el objetivo principal del TFG, que consistía en aprender a manejar un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), comprendiendo su funcionamiento y aplicación en diversidad de campos, fundamentalmente en la caracterización de alimentos.
2. Se identificaron los metabolitos ácido úrico, adenosina e inosina en todas las muestras de leche mediante un método de elución en gradiente en fase reserva mediante los tiempos de retención, los espectros de absorción, sobrecargas y liofilización.
3. No se observaron diferencias significativas en la concentración de los metabolitos en las diferentes muestras de leche, lo que sugiere que las diferentes etapas a las que se sometieron las leches no afectan a la concentración de sus metabolitos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdu Hussen, A. (2022). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Annals of Advances in Chemistry*, 6(1), 010–020.  
<https://doi.org/10.29328/journal.aac.1001026>
- Bai, G., Cheng, L., Peng, L., Wu, B., Zhen, Y., Qin, G., Zhang, X., Aschalew, N. D., Sun, Z., & Wang, T. (2023). Effects of ultra-high-temperature processes on metabolite changes in milk. *Food Science and Nutrition*, 11(6), 3601–3615.  
<https://doi.org/10.1002/fsn3.3350>
- Beger, R. D., Dunn, W., Schmidt, M. A., Gross, S. S., Kirwan, J. A., Cascante, M., Brennan, L., Wishart, D. S., Oresic, M., Hankemeier, T., Broadhurst, D. I., Lane, A. N., Suhre, K., Kastenmüller, G., Sumner, S. J., Thiele, I., Fiehn, O., Kaddurah-Daouk, R., & for “Precision Medicine. (2016). Metabolomics enables precision medicine: “A White Paper, Community Perspective.” *Metabolomics*, 12(10).  
<https://doi.org/10.1007/s11306-016-1094-6>
- Bhati, C., Minocha, N., Purohit, D., Kumar, S., Makhija, M., Saini, S., Kaushik, D., & Pandey, P. (2022). High Performance Liquid Chromatography: Recent Patents and Advancement. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 15(2), 729–746.  
<https://doi.org/10.13005/bpj/2411>
- Cortese, F., Giordano, P., Scicchitano, P., Faienza, M. F., De Pergola, G., Calculli, G., Meliota, G., & Ciccone, M. M. (2019). Uric acid: from a biological advantage to a potential danger. A focus on cardiovascular effects. *Vascular Pharmacology*, 120, 106565. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2019.106565>
- Cifuentes, A. (2017). Foodómica, foodoma y análisis alimentario moderno. In *Tendencias En Química Analítica* (Vol. 96).  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.001>
- Cipriani, S., Bakshi, R., & Schwarzschild, M. A. (2014). Protection by inosine in a cellular model of Parkinson’s disease. *Neuroscience*, 274, 242–249.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.038>
- Domínguez-Álvarez, J., Mateos-Vivas, M., Rodríguez-Gonzalo, E., García-Gómez, D., Bustamante-Rangel, M., Delgado Zamarreño, M. M., & Carabias-Martínez, R. (2017). Determination of nucleosides and nucleotides in food samples by using liquid chromatography and capillary electrophoresis. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 92, pp. 12–31). Elsevier B.V.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.04.005>
- En Edict Yanibada, B., Boudra, H., Debrauwer, L., Martin, E., Morgavi, D. P., Canlet, E., & Boudra, H. (2018). Evaluation of sample preparation methods for NMR-

- based metabolomics of cow milk. *Heliyon*, 4, 856.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018>
- Fan, R., Xie, S., Wang, S., Yu, Z., Sun, X., Du, Q., Yang, Y., & Han, R. (2023). Identification markers of goat milk adulterated with bovine milk based on proteomics and metabolomics. *Food Chemistry X*, 17, 100601.  
<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100601>
- Fekete, S., Delano, M., Harrison, A. B., Shiner, S. J., Belanger, J. L., Wyndham, K. D., & Lauber, M. A. (2022). Size Exclusion and Ion Exchange Chromatographic Hardware Modified with a Hydrophilic Hybrid Surface. *Analytical Chemistry*, 94(7), 3360–3367. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c05466>
- García de Marina Bayo, A. (2016). *HPLC instrumental: (ed.)*. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia.  
<https://elibronet.ezbusc.usc.gal/es/lc/busc/titulos/57402>.
- Gigli, I. (2014). *La buena leche : aspectos biológicos y su industrialización*. Editorial Maipue.
- Hallaj, S., Mirza-Aghazadeh-Attari, M., Arasteh, A., Ghorbani, A., Lee, D., & Jadidi-Niaragh, F. (2021). Adenosine: The common target between cancer immunotherapy and glaucoma in the eye. In *Life Sciences* (Vol. 282). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119796>
- Karczewski, K. J., & Snyder, M. P. (2018). Integrative omics for health and disease. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 19, Issue 5, pp. 299–310). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2018.4>
- Khan, I. T., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M., & Jaspal, M. H. (2019). Antioxidant properties of Milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge. In *Lipids in Health and Disease* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0969-8>
- Kim, I. S., & Jo, E. K. (2022). Inosine: A bioactive metabolite with multimodal actions in human diseases. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1043970>
- Koupenova, M., & Ravid, K. (2013). Adenosine, Adenosine Receptors and Their Role in Glucose Homeostasis and Lipid Metabolism. *Journal of Cellular Physiology*, 228(8), 1703–1712. <https://doi.org/10.1002/jcp.24352>
- Krawczyk, T., Zalewski, M., Janeta, A., & Hodurek, P. (2018). SEC Separation of Polysaccharides Using Macroporous Spherical Silica Gel as a Stationary Phase. *Chromatographia*, 81(10), 1365–1372. <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3582-5>
- Krishna, T. C., Najda, A., Bains, A., Tosif, M. M., Papliński, R., Kapłan, M., & Chawla, P. (2021). Influence of ultra-heat treatment on properties of milk proteins. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 18). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym13183164>

- Layland, J., Carrick, D., Lee, M., Oldroyd, K., & Berry, C. (2014a). Adenosine Physiology, Pharmacology, and Clinical Applications. In *J Am Coll Cardiol Intv* (Vol. 7).
- Layland, J., Carrick, D., Lee, M., Oldroyd, K., & Berry, C. (2014b). Adenosine: Physiology, pharmacology, and clinical applications. In *JACC: Cardiovascular Interventions* (Vol. 7, Issue 6, pp. 581–591). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2014.02.009>
- Ma, L., Shi, H., Lian, K., Diao, Y., Chen, Y., Ma, C., & Kang, W. (2017). Highly selective and sensitive determination of several antioxidants in human breast milk using high-performance liquid chromatography based on Ag(III) complex chemiluminescence detection. *Food Chemistry*, 218, 422–426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.025>
- Mahato, D. K., Kamle, M., Pandhi, S., Pandey, S., Gupta, A., Paul, V., Kalsi, R., Agrawal, S., Islam, D., Khare, S., Singh, A., Kumar, P., Rab, S. O., & Saeed, M. (2024). Foodomics: A sustainable approach for the specific nutrition and diets for human health. In *Food Chemistry: X* (Vol. 24). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101872>
- Maiuolo, J., Oppedisano, F., Gratteri, S., Muscoli, C., & Mollace, V. (2016). Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology*, 213, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.08.109>
- Martin, D., Walte, H. G., & Lorenzen, P. C. (2016). Ribonucleosides in raw milk and heat-treated milk samples from cows, sheep, goats and camels and their potential biotechnological application. *Small Ruminant Research*, 137, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.03.021>
- Onuh, J. O., & Aliani, M. (2020). Metabolomics profiling in hypertension and blood pressure regulation: a review. In *Clinical Hypertension* (Vol. 26, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40885-020-00157-9>
- Plakantara, S., Michaelidou, A. M., Polychroniadou, A., Menexes, G., & Alichanidis, E. (2010a). Nucleotides and nucleosides in ovine and caprine milk during lactation. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2330–2337. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2836>.
- Polo Díez, L. M. (2015). *Fundamentos de cromatografía*. Dextra Editorial.
- Rinschen, M. M., Ivanisevic, J., Giera, M., & Siuzdak, G. (2019). Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 20, Issue 6, pp. 353–367). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0108-4>
- Silva, F. G., Silva, S. R., Pereira, A. M. F., Cerqueira, J. L., & Conceição, C. (2024). A Comprehensive Review of Bovine Colostrum Components and Selected Aspects Regarding Their Impact on Neonatal Calf Physiology. In *Animals* (Vol. 14, Issue

- 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).  
<https://doi.org/10.3390/ani14071130>
- Srinivasan, S., Torres, A. G., & Ribas de Pouplana, L. (2021). Inosine in biology and disease. In *Genes* (Vol. 12, Issue 4). MDPI AG.  
<https://doi.org/10.3390/genes12040600>
- Towiwat, P., & Li, Z.-G. (2015). *The association of vitamin C, alcohol, coffee, tea, milk and yogurt with uric acid and gout*.
- Villas-Bôas, S. G., Roessner, U., Hansen, M. A. E., Smedsgaard, J., & Nielsen, J. (2007). *Metabolome analysis: An introduction*.
- Wilkins, J. M., & Trushina, E. (2018). Application of metabolomics in Alzheimer's disease. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 8, Issue JAN). Frontiers Media S.A.  
<https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00719>
- Wishart, D. (2022). Metabolomics and the Multi-Omics View of Cancer. *Metabolites*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/metabo12020154>
- Wishart, D. S. (2019). Metabolomics for investigating physiological and pathophysiological processes. *Physiological Reviews*, 99(4), 1819–1875.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2018>
- Wu, H., Xu, L., Ji, C., & Yu, D. (2016). Proteomic and metabolomic responses in D-shape larval mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium and arsenic. *Fish and Shellfish Immunology*, 58, 514–520.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.064>
- Wu, X., Jackson, R. T., Khan, S. A., Ahuja, J., & Pehrsson, P. R. (2018). Human milk nutrient composition in the United States: Current knowledge, challenges, and research needs. In *Current Developments in Nutrition* (Vol. 2, Issue 7). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzy025>
- Yang, H., Zhang, Z., Zhao, K., Zhang, Y., Yin, X., Zhu, G., Wang, Z., Yan, X., Li, X., He, T., & Wang, K. (2024). Targeting the adenosine signaling pathway in macrophages for cancer immunotherapy. In *Human Immunology* (Vol. 85, Issue 3). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2024.110774>