

CÁLCULO DE LA EFICIENCIA DE LA EXTRACCIÓN DE METABOLITOS  
DERIVADOS DEL INDOL EMPLEANDO UN SISTEMA  
METANOL/AGUA/CLOROFORMO

ELOISA SOLEDAD PINILLA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2014

CÁLCULO DE LA EFICIENCIA DE LA EXTRACCIÓN DE METABOLITOS  
DERIVADOS DEL INDOL EMPLEANDO UN SISTEMA  
METANOL/AGUA/CLOROFORMO

ELOISA SOLEDAD PINILLA

Trabajo de Grado para optar al título de  
Ingeniera Química

DIRECTOR

Viviana Sánchez Torres  
Ingeniera Química, PhD.

Arul Jayaraman

Ingeniero Químico, PhD.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2014

A Dios, que me guió en estos años universitarios que estuvieron llenos de muchos cambios y retos.

A mis padres, Gerardo y María Eugenia, por todo el apoyo incondicional y la confianza puesta en mí, en mis sueños y metas trazadas.

A mi hermana, por estar a mi lado, representar una gran compañía y ser básicamente ella.

A Sebastián, por su incondicional apoyo y amor, por ser una motivación más para seguir adelante y alcanzar nuestros sueños juntos.

A mis primíparos, por brindarme su amistad y por ser el mejor grupo de amigos con el que pude soñar alguna vez, gracias por hacer de mi vida universitaria la mejor de las experiencias hasta el momento. Gracias a Erika, Genny, Silvia, Richard, William, Saily, Stephanie, David, Nathalie, Fredy, Orlando.

## Agradecimientos

A la Universidad Industrial de Santander y a la Universidad de Texas A&M porque gracias al convenio de cooperación fue posible tener esta excelente experiencia académica y cultural en Estados Unidos.

Al Dr. Arul Jayaraman y a la Dr. KyungOh Choi, por su buena disposición para entrenarme en todos los ámbitos necesarios para llevar a cabo esta investigación, de igual manera a mis compañeras de oficina en A&M por hacer amenos mis días allá.

A la Dr. Viviana Sánchez Torres por apoyarme desde Colombia con la realización del proyecto y ser una guía en todo momento.

A mi familia, en especial mis papás y mi hermana, por su apoyo, su cariño, su paciencia, sus consejos y su compañía en todos los momentos de mi vida.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN .....	13
OBJETIVOS .....	14
1. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	15
1.1. IMPORTANCIA DE LA METABOLÓMICA .....	15
1.2. PROCESO DE EXTRACCIÓN .....	15
1.2.1. Extracción líquido-líquido <sup>1</sup> .....	15
1.2.2. Coeficiente de reparto .....	16
1.2.3. Coeficiente de distribución. ....	17
1.3. PROTOCOLOS COMUNES DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS .....	17
1.4. METABOLITOS ESTUDIADOS .....	19
1.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	22
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	23
2.1. PASOS PRELIMINARES .....	24
2.2. EXTRACCIÓN DE METABOLITOS .....	25
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	29
4. CONCLUSIONES .....	35
5. RECOMENDACIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Características y propiedades de los metabolitos estudiados .....	21
<b>Tabla 2.</b> Ventajas y desventajas de usar NMR, GC/MS y LC/MS .....	22
<b>Tabla 3.</b> Resultados del coeficiente de reparto de los metabolitos estudiados .....	24
<b>Tabla 4.</b> Tiempo de almacenamiento de las soluciones patrón .....	27
<b>Tabla 5.</b> Concentración de cada metabolito determinada por espectrometría de masas de las muestras de concentración inicial 100 $\mu\text{M}$ .....	29
<b>Tabla 6.</b> Concentración de cada metabolito determinada por espectrometría de masas de las muestras de concentración inicial 10 $\mu\text{M}$ .....	29
<b>Tabla 7.</b> Coeficiente de distribución de los metabolitos estudiados en base a una concentración inicial de ellos de 100 $\mu\text{M}$ .....	33
<b>Tabla 8.</b> Coeficiente de distribución de los metabolitos estudiados en base a una concentración inicial de ellos de 10 $\mu\text{M}$ .....	33

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Metodología experimental.....	23
<b>Figura 2.</b> Descripción del protocolo de extracción de metabolitos .....	26
<b>Figura 3.</b> Eficiencia promedio de la extracción de los metabolitos cuando la concentración inicial es 100 $\mu\text{M}$ .....	30
<b>Figura 4.</b> Eficiencia promedio de la extracción de los metabolitos cuando la concentración inicial es 10 $\mu\text{M}$ .....	31

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
ANEXO A. Termodinámica del reparto .....	39
ANEXO B. Valores estándar de cada metabolito .....	41

## RESUMEN

**TÍTULO:** CÁLCULO DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS DERIVADOS DEL INDOL EMPLEANDO UN SISTEMA METANOL/AGUA/CLOROFORMO\*

**AUTOR:** Eloísa Soledad Pinilla\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Indol, hidrofobicidad, extracción, sistema metanol-agua-cloroformo.

La metabolómica es en la actualidad un área de investigación con grandes ventajas, entre las cuales sobre salen la alta conectividad entre los metabolitos y que su número es menor respecto a los genes y proteínas, por lo cual la complejidad de la muestra se ve reducida, además los cambios en las expresiones genéticas y proteicas se ven amplificadas a nivel metabólico; pero es un campo que necesita optimizar los pasos fundamentales en él. La extracción de metabolitos en diferentes muestras biológicas es probablemente el proceso más importante, ya que afecta tanto el número de metabolitos recuperados como la reproducibilidad y la confianza en los datos obtenidos. Teniendo en cuenta las diferentes características físico-químicas que presentan los metabolitos; la escogencia de los solventes adecuados, sus cantidades y proporciones, representan un importante reto para los investigadores.

En este trabajo se evaluó la eficiencia del proceso de extracción de 5 metabolitos, indol, indol-3-acetato, indol-3-acetamida, triptamina e hidrox-indol, empleando metanol, agua y cloroformo como solventes, para obtener un sistema de 2 fases, polar y orgánica. Una vez analizadas las muestras presentes en la fase polar empleando un espectrómetro de masas, se determinó que el protocolo de extracción empleado es adecuado para la triptamina, el indol-3-acetato y el indol-3-acetamida, gracias a sus valores de eficiencia; se evidencia que las condiciones de almacenamiento de las muestras previas a su análisis y la cantidad de solvente empleado afectan en mayor medida a los metabolitos más hidrofóbicos (Indol e hidrox-indol) y son éstos mismos los que presentan una menor eficiencia. Finalmente se calculó el coeficiente de distribución de los metabolitos, que es propio de los solventes y condiciones empleadas y al ser comparado con el coeficiente de reparto de los mismos se observan grandes similitudes cualitativas.

---

\* Proyecto de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ph.D. Viviana Sánchez Torres. Ph.D. Arul Jayaraman.

## ABSTRACT

**TÍTULO:** EFFICIENCY CALCULATION OF THE EXTRACTION OF METABOLITES DERIVED FROM INDOLE USING A METHANOL / WATER / CHLOROFORM SYSTEM\*

**AUTHOR:** Eloísa Soledad Pinilla\*\*

**KEY WORDS:** Indole, hydrophobicity, extraction, methanol-water-chloroform system

Metabolomics is currently an area of research with many advantages, such as a high connectivity between metabolites and total number of metabolites is lower than the total number of genes and proteins, so the sample complexity is reduced, also changes in the expression of the gene and protein are amplified at the metabolic level; but it is a field that needs to optimize the fundamental steps in it. Extraction of metabolites in different biological samples is probably the most important process because it affects both the number of different metabolites available for analysis as well as the reproducibility and reliability of the data obtained. Given the different physicochemical characteristics exhibited in metabolites; the choice of suitable solvents, their quantities and proportions, represents an important challenge for researchers.

In this work, the efficiency of the extraction process of 5 metabolites, indole, indole-3-acetic acid, indole-3-acetamide, hydroxyindole and tryptamine was determined using methanol, water and chloroform as solvents, to obtain a set of 2 phases, polar and organic. Once the samples present in the polar phase are analyzed using a mass spectrometer, it is determined that the extraction protocol used is suitable for tryptamine, indole-3-acetate and indole-3-acetamide; it is evidence that the storage conditions prior to analysis and the amount of solvent used, affect the most hydrophobic metabolites (Indole and hydroxy-indole) and it is these same people who have a lower efficiency. Finally the distribution coefficient of metabolites, which is typical of the solvents and the conditions used is calculated; when it is compared to the partition coefficient, qualitative similarities are observed.

---

\* Research project

\*\* Faculty of physical-chemical engineering. Chemical Engineering Department. Advisors: Ph.D. Viviana Sánchez Torres. PhD. Arul Jayaraman

## INTRODUCCIÓN

El estudio de metabolitos ha sido ampliamente utilizado en la interpretación de las respuestas de diferentes microorganismos, plantas y sistemas eucarióticos a estímulos externos. Sin embargo su estudio en mamíferos es un área poco desarrollada que está empezando a ser un tema de interés. Este es el caso particular de los proyectos llevados a cabo por el Dr. Jayaraman y su equipo, quienes emplean metabolitos secretados por bacterias presentes en el tracto gastrointestinal para mejorar sus funciones, ya que no sólo es un órgano encargado de la absorción y digestión de nutrientes sino que es el órgano inmune más grande e importante del cuerpo.<sup>[4]</sup>

En el laboratorio del Dr. Jayaraman los metabolitos se obtienen mediante una extracción polar/apolar que emplea como solventes metanol, agua (Fase polar) y cloroformo (Fase orgánica). El método utilizado nunca se ha puesto a prueba en el laboratorio para saber qué tan acertado es y cuál es su eficacia; ya que la extracción es el primer paso para llevar a cabo experimentos posteriores. es necesario optimizar los protocolos empleados en esta etapa.

Aunque la importancia del estudio metabólico está enfocada en áreas médicas y farmacéuticas principalmente, el paso de extracción emplea principios termodinámicos y de transporte que son vitales para comprender el porqué de la forma en la que se reparten y distribuyen los metabolitos en los solventes. De esta forma se evidencia como la ingeniería química es un campo amplio que brinda el conocimiento necesario para incursionar no sólo en áreas de procesos industriales, sino también en trabajos de ingeniería biotecnológica a nivel de laboratorio.

## OBJETIVOS

### Objetivos Generales

- ✓ Determinar la eficiencia del método de extracción polar/apolar que emplea como solventes metanol, agua y cloroformo, en la extracción de ciertos metabolitos (Indol, indol-3-acetato, triptamina, índole-3-acetamida y hidroxindol)
- ✓ Calcular experimentalmente el coeficiente de distribución de los metabolitos mencionados anteriormente en los solventes metanol/agua (Fase polar) y cloroformo (Fase orgánica) empleados para su extracción.

### Objetivos Específicos

- ✓ Adquirir experiencia en el laboratorio respecto a los diferentes protocolos empleados para el estudio de metabolitos, desde su extracción hasta el suministro de ellos en muestras celulares.
- ✓ Desarrollar una actitud de investigación frente a la información previa necesaria para el diseño y la realización de los experimentos.
- ✓ Incorporar a la investigación conceptos termodinámicos y de transporte para entender las causas de los fenómenos ocurridos.
- ✓ Conocer la naturaleza de los metabolitos estudiados para realizar un análisis correcto de los resultados finales y posteriores conclusiones.
- ✓ Buscar nuevas alternativas para mejorar el método de extracción empleado, en caso de no tener resultados favorables.

## 1. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 1.1. IMPORTANCIA DE LA METABOLÓMICA

La metabolómica es el estudio cuantitativo y cualitativo de las moléculas con bajo peso molecular (metabolitos) presentes en un célula, que participan en reacciones metabólicas en general y que son requeridas para el mantenimiento, crecimiento y función normal de una célula.

El uso de la metabolómica está creciendo rápidamente en la determinación de los cambios en los seres vivos a nivel metabólico causados por dietas, factores estresantes y enfermedades.<sup>[13]</sup> Hoy en día diferentes aplicaciones han sido desarrolladas, como el uso de biomarcadores metabólicos que funcionan como un indicador de la presencia de una enfermedad o en respuesta a algún medicamento suministrado, la determinación del efecto de estrés bioquímico o ambiental en plantas y microorganismos, la caracterización bacteriana e ingeniería metabólica entre otras.<sup>[14]</sup>

### 1.2. PROCESO DE EXTRACCIÓN

La extracción con solventes es una técnica empleada para la separación de diferentes compuestos a partir de una mezcla sólida o líquida, aprovechando la diferencia de solubilidad de los componentes de interés. Es una de las técnicas de separación más utilizada en laboratorios químicos..<sup>[2]</sup>

**1.2.1. Extracción líquido-líquido** Uno de los métodos de extracción más común es la extracción líquido-líquido, la cual aprovecha la diferencia de solubilidad de los solventes y su inmiscibilidad. Las soluciones polares acuosas son usualmente combinadas con solventes orgánicos no polares, como el cloroformo para formar

un sistema de dos fases para la extracción líquido-líquido. Esto permite la separación de las sustancias polares y no polares para la subsecuente separación cromatográfica y análisis. <sup>[12]</sup>

Alcoholes, tales como metanol, etanol e isopropanol son miscibles con agua y pueden ser usados como co-solventes para mejorar la solubilidad de los compuestos menos polares durante el proceso de extracción. La extracción líquido-líquido de metabolitos es típicamente llevada a cabo a un pH neutro. Sin embargo, la extracción de diferentes clases de metabolitos puede ser mejorada significativamente variando el pH del solvente. <sup>[12]</sup>

**1.2.2. Coeficiente de reparto** El coeficiente de reparto mide la afinidad relativa de algún compuesto por dos líquidos inmiscibles; por ejemplo, el agua y un solvente orgánico lipofílico. El comportamiento de soluciones diluidas puede ser asumido como soluciones ideales. A temperatura y presión fijas, la concentración de un compuesto en las dos fases puede ser usada para calcular el coeficiente de reparto, (P) <sup>[10]</sup>:

$$P = C_o/C_w \quad (1)$$

Donde,  $C_o$  es la concentración del compuesto en la fase lipofílica u orgánica y  $C_w$  es la concentración en la fase acuosa. El reparto de un compuesto entre dos solvente inmiscibles puede ser comprendido en términos del potencial químico del soluto. (Ver Anexo A)

$$\frac{\mu_{S(1)}^\theta - \mu_{S(2)}^\theta}{RT} = \ln P \quad (2)$$

Donde  $\mu_{S(1)}^\theta$  es el potencial químico del soluto en el líquido 1,  $\mu_{S(2)}^\theta$  es el potencial químico del soluto en el líquido 2, R es la constante de los gases y T la temperatura, en grados absolutos.

**1.2.3. Coeficiente de distribución** El coeficiente de reparto describe la afinidad relativa de un compuesto respecto a una fase acuosa y una orgánica a una temperatura y presión particular bajo condiciones ideales. El coeficiente de reparto permanece constante para un sistema dado y permanecerá invariante con cambios en el pH de la solución acuosa <sup>[10]</sup>. La determinación de P es sencilla cuando se consideran a las moléculas de los compuestos no ionizables, como si una única forma del compuesto existiera en la solución diluida. Sin embargo, una gran variedad de compuestos con carácter ácido o básico se encuentra tanto en forma ionizada como no ionizada en la solución acuosa. <sup>[10]</sup> Por esta razón es conveniente definir un coeficiente de distribución, (D).

$$D = \frac{C_{HAo}}{C_{HAw} + C_{Aw^-}} \quad (3)$$

Donde  $C_{HAo}$  es la concentración de la forma no ionizada del compuesto en la fase orgánica,  $C_{HAw}$  es la concentración de la forma no ionizada del compuesto en la fase acuosa y  $C_{Aw^-}$  es la concentración de la forma ionizada del compuesto en la fase acuosa. A diferencia del coeficiente de reparto, D varía con el pH y usualmente se reporta forma logarítmica  $\log D$ .<sup>[10]</sup>

### 1.3. PROTOCOLOS COMUNES DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS

La extracción de metabolitos es un paso clave en el estudio metabólico y su efectividad afecta directamente la calidad de los datos finales. Idealmente, la extracción tiene como objetivos:<sup>[1]</sup>

- i. La liberación eficiente de los metabolitos de la muestra.
- ii. Remoción de compuestos que interfieran y hagan difícil el análisis (Por ejemplo, sales y proteínas).
- iii. Hacer el extracto compatible con la técnica analítica usada para el análisis final.

El proceso de extracción presenta de manera general los mismos pasos, entre los cuales se pueden mencionar ciclos de temperatura, agitación y centrifugación, como los más importantes. Los solventes utilizados son los que determinan la verdadera diferencia entre los protocolos a emplear, ya que debido a la amplia gama de características fisicoquímicas de los metabolitos, se deben escoger solventes que garanticen la extracción del mayor número de los compuestos deseados y buena reproducibilidad.

La extracción puede ser llevada a cabo con solventes orgánicos a altas o bajas temperaturas, puros (etanol o metanol) o en mezcla (metanol-cloroformo) o con soluciones ácidas o básicas. La eficiencia de la extracción con solventes puros es limitada por la solubilidad de los metabolitos en el solvente orgánico, la posibilidad de reacciones colaterales o la degradación de los metabolitos. Sin embargo, estos métodos pueden ser de interés para la extracción de compuestos particulares. Con estas premisas, los alcoholes son los solventes más adecuados para la extracción, ya que ellos precipitan las proteínas, permean efectivamente las células, son fáciles de evaporar-concentrar y no añaden sales indeseables en los análisis con espectrómetro de masas.<sup>[1]</sup>

De la literatura se pueden mencionar los siguientes protocolos, que son adaptados de su versión original para cada estudio en particular:

- Ácido perclórico → Ryll and Wagner <sup>[11]</sup>

- Metanol 80%(v/v) caliente → Shryock et al. <sup>[11]</sup>
- Etanol 100%(v/v) caliente → González et al. <sup>[11]</sup>
- Agua caliente → Bhattacharya <sup>[11]</sup>
- Ácido fórmico → Goulard <sup>[11]</sup>
- Acetonitrilo frío → Grob o Vogt <sup>[11]</sup>
- Etanol frío 100%(v/v) → Grob o Vogt <sup>[11]</sup>
- Metanol frío 100%(v/v) → Grob o Vogt <sup>[11]</sup>
- Metanol/Cloroformo → La Belle<sup>[14]</sup> o Koning & Van Dam <sup>[7]</sup>
- Metanol frío 50%(v/v) → Maharjan et al. <sup>[3]</sup>
- Hidróxido de potasio (KOH) → Imamura et al. <sup>[3]</sup>

#### 1.4. METABOLITOS ESTUDIADOS

La capacidad metabólica del cuerpo humano es un producto de las comunidades microbianas residentes integradas con las células humanas. Este punto de vista ha generado un creciente interés en ampliar la comprensión de la relación huésped-microbio residente y así unir las estructuras de la comunidad microbiana con las funciones que puedan tener un impacto en la salud humana. Los metabolitos al ser originados a partir de una compleja red de vías bioquímicas ofrecen una huella química del estado funcional de la microbiota y permite conocer los mensajeros químicos que median en la interacción microbio-microbio y microbio-huésped. <sup>[8]</sup>

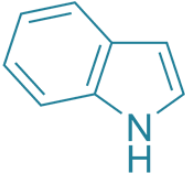
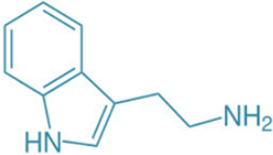
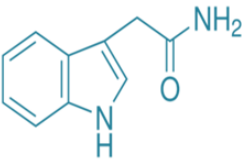
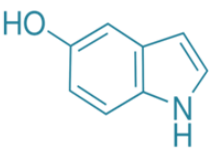
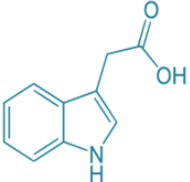
La unidad de indol es ampliamente distribuida en la naturaleza. Más de mil alcaloides de indol han sido descritos, muchos de ellos de gran importancia farmacológica. La mayoría de estos alcaloides son de estructura compleja, pero tienen su origen biosintético en el aminoácido triptófano, el cual es un importante constituyente celular. La mayoría de los alcaloides de indol ocurren naturalmente y abarcan una amplia diversidad de estructuras complejas y actividad farmacológica. La mayoría son producidos por plantas, pero otros son producto de una acción

microbiana. Los indoles han sido usados en la medicina por siglos, usualmente en forma de extractos herbales crudos; ellos constituyen el principio activo de muchos remedios caseros de diferentes regiones geográficas. <sup>[4]</sup>

Los metabolitos empleados en este trabajo son indol, hidroxindol, triptamina, indol-3-acetamida e indol-3-acetato, todos ellos de origen microbiano y endógeno. La manipulación de su producción en el cuerpo humano, con alteraciones en la dieta o tratamientos probióticos tiene repercusiones importantes en la salud humana de acuerdo a diferentes investigaciones. Aumentar la cantidad de estos metabolitos ha demostrado que mejora varias funciones del tracto gastrointestinal y la forma en la que el cuerpo humano reacciona frente a infecciones e inflamaciones <sup>[Comunicación personal]</sup>

La tabla 1 señala ciertas características de los metabolitos previamente mencionados.

**Tabla 1.** Características y propiedades de los metabolitos estudiados

METABOLITO	CARACTERÍSTICAS	PROPIEDADES
<p>Indol</p> 	<p>Compuesto orgánico, heterocíclico y aromático. Producido por bacterias como producto de la degradación triptofano. A bajas concentraciones tiene un olor floral. Es de gran importancia farmacológica.</p>	<p><b>Fórmula:</b> C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N  <b>Masa molar:</b> 117,15 g/mol  <b>Densidad:</b> 1,17 g/mL  <b>Punto de ebullición:</b> 254°C</p>
<p>Triptamina</p> 	<p>Monoamina precursora de hormonas y neurotransmisores. Se encuentra en plantas, hongos y animales. Sustituciones en la molécula dan origen a un grupo de triptaminas. Las más conocidas son las serotoninas.</p>	<p><b>Fórmula:</b> C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>  <b>Masa molar:</b> 160,22 g/mol  <b>Densidad:</b> 1,157 g/mL  <b>Punto de ebullición:</b> 137°C</p>
<p>Indol-3-acetamida</p> 	<p>Encontrado comúnmente en los guisantes. Son compuestos que contienen como columna vertebral la triptamina.</p>	<p><b>Fórmula:</b> C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O  <b>Masa molar:</b> 174,2 g/mol  <b>Densidad:</b> 1,29 g/mL  <b>Punto de ebullición:</b> 469,67°C (Predicho)</p>
<p>Hidroxi-indol</p> 	<p>Pertenece a la familia de los indoles y sus derivados. Estos son compuestos que contienen una molécula de indol.</p>	<p><b>Fórmula:</b> C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>NO  <b>Masa molar:</b> 133,15 g/mol  <b>Densidad:</b> -  <b>Punto de ebullición:</b> -</p>
<p>Indol-3-acetato</p> 	<p>Usualmente producido por la acción de bacterias en el intestino de mamíferos. Se encuentra en bajas concentraciones en la orina. Específicamente es miembro de un grupo de fitohormonas llamadas auxinas.</p>	<p><b>Fórmula:</b> C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>  <b>Masa molar:</b> 175,184 g/mol  <b>Densidad:</b> 1,183 g/mL  <b>Punto de ebullición:</b> 249°C</p>

Fuente: Human Metabolome Database HMDB [6]

## 1.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Entre las diversas técnicas empleadas para los estudios metabólicos se destacan, la resonancia magnética nuclear (NMR), la espectrometría de masas combinada con cromatografía líquida (LC/MS) y la espectrometría de masas combinada con cromatografía de gases (GC/MS). Los solventes que se usan para la extracción deben ser compatibles con el instrumento analítico empleado; por ejemplo, para el análisis de muestras con LC/MS solventes como el acetato de etilo o el cloroformo no son aconsejables, ya que estos no se disuelven en la fase móvil usada para la cromatografía o no producen un spray eficiente en el caso de un análisis con inyección de flujo.<sup>[9]</sup> En la tabla 2 se resumen algunas de sus características más importantes, las cuales sirven de referencia a la hora de escoger la técnica más adecuada para un determinado experimento.

**Tabla 2.** Ventajas y desventajas de usar NMR, GC/MS y LC/MS

	LC/MS	GC/MS	NMR
<b>Preparación de la muestra</b>	Extracción	Extracción y modificación química	Típicamente ninguna
<b>Separación cromatográfica</b>	Separación media-resolución	Separación alta-resolución	Sin separación
<b>Sensibilidad</b>	milimolar-nanomolar	milimolar-nanomolar	milimolar-micromolar
<b>Rango dinámico</b>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup>
<b>Velocidad</b>	Lenta (5-90min)	Lenta (~30min)	Rápida (1-5min)
<b>Precisión</b>	±10%	±10%	±10%
<b>Ventajas</b>	Ionización suave; amplio rango de masa	Alta resolución; biblioteca EI-MS disponible	No preparación de la muestra
<b>Desventajas</b>	Velocidad del análisis	Preparación significativa de la muestra con modificación química; análisis lento; robusta ionización; un número limitado de moléculas puede ser analizado	Pobre sensibilidad y rango dinámico; algunas clases químicas no son detectadas.

Fuente: ChemBioChem 2005, 6, 1941 – 1951 <sup>[9]</sup>

## 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En la figura 1 se muestra la metodología global empleada en el desarrollo del proyecto

**Figura 1.** Metodología experimental



## 2.1. PASOS PRELIMINARES

### Hidrofobicidad de los metabolitos a estudiar

Para conocer la hidrofobicidad de cada uno de los metabolitos a estudiar, se determinó el coeficiente de reparto en su forma logarítmica empleando agua, como solvente polar y octanol, como solvente apolar. De la literatura se obtuvieron datos calculados experimentalmente por Hansch et al.<sup>[5]</sup> en 1995 (Tabla 3, experimental) y otros predichos para cada metabolito con softwares desarrollados por diversas compañías (Tabla 3, ChemAxon, ALOGPS, ACD/Labs, NCBI), finalmente se realizó un promedio de esos valores y se clasificaron los compuestos del más hidrofóbico al menos.

**Tabla 3.** Resultados del coeficiente de reparto de los metabolitos estudiados

<i>Metabolito</i>	<i>LogP</i>					
	<i>Experimental</i>	<i>ChemAxon</i>	<i>ALOGPS</i>	<i>ACD/Labs</i>	<i>NCBI</i>	<i>Promedio</i>
<i>Indol</i>	2.14	2.07	2.29	ND	ND	2.167
<i>Indole-3-acetato</i>	1.41	1.71	1.87	ND	ND	1.66
<i>Indole-3-acetamida</i>	1.2	0.7	1.09	1.088	ND	1.02
<i>Triptamina</i>	1.55	1.49	1.21	ND	ND	1.42
<i>Hidroxi-indol</i>	ND	1.77	1.53	ND	2	1.77

Fuente: Human Metabolome Database HMDB <sup>[6]</sup>

De la tabla 3, se ve que el metabolito más hidrofóbico es el indol, seguido del hidroxindol, indol-3-acetato, triptamina e indol-3-acetamida respectivamente. Esto teniendo en cuenta los valores promedio del coeficiente de reparto de cada compuesto. Tomando como base esta clasificación jerárquica, se esperó obtener resultados cualitativamente similares en cuanto a la distribución de los metabolitos en los solventes empleados.

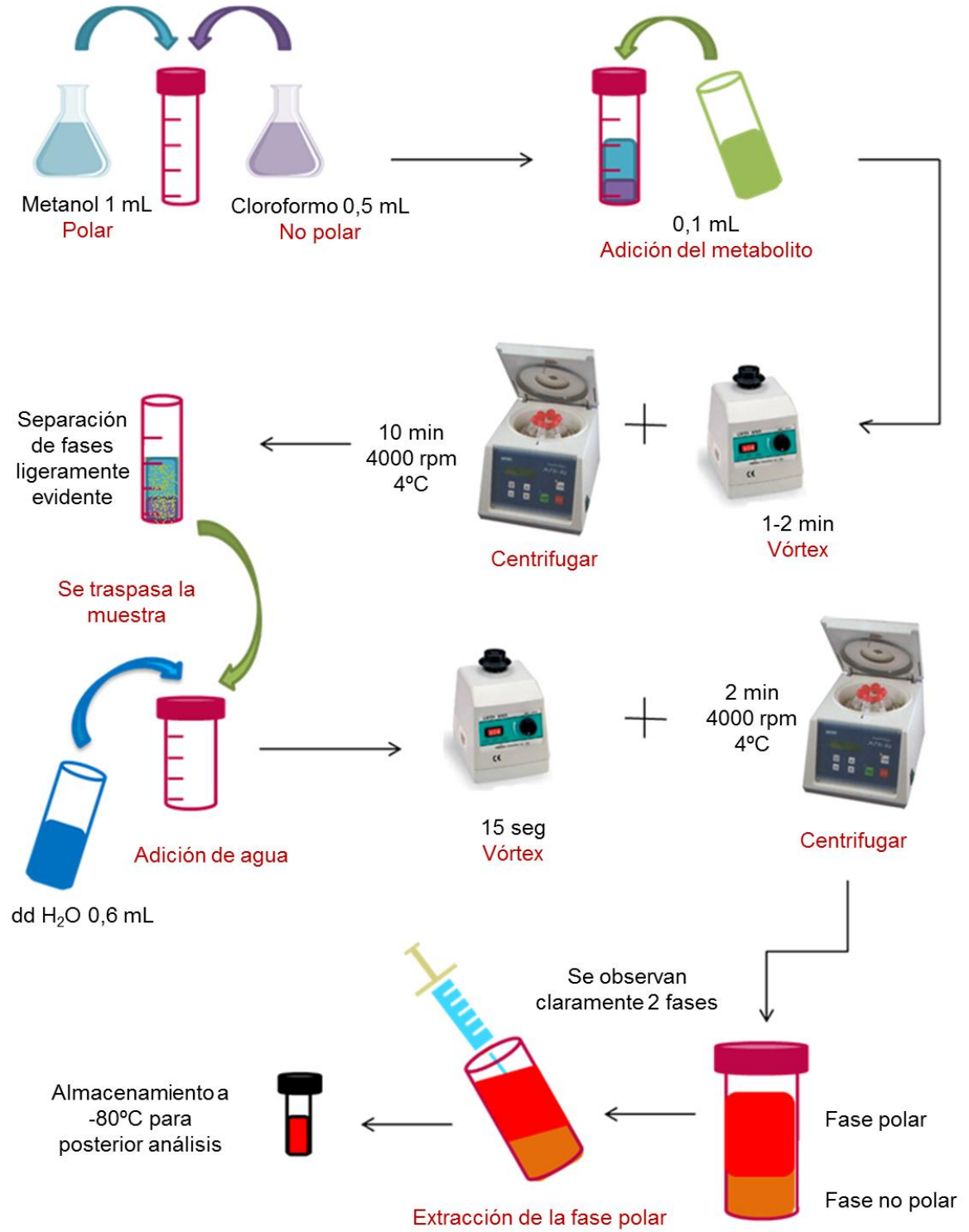
### Preparación de soluciones patrón

Se decidió que para las extracciones se trabajaría con concentraciones iniciales de 100  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de cada metabolito adicionando 0,1 mL de solución patrón en un volumen total 2,2 mL. Por lo tanto se prepararon soluciones patrón de 22 mM y 2,2 mM de concentración de cada metabolito empleando DMF como solvente. Éstas fueron almacenadas a una temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso. Las soluciones patrón solo se prepararon una vez a lo largo de todo el proyecto.

## **2.2. EXTRACCIÓN DE METABOLITOS**

En la figura 2 se muestra detalladamente cada paso del protocolo de extracción.

**Figura 2.** Descripción del protocolo de extracción de metabolitos



La extracción se realizó por triplicado para cada una de las soluciones patrón preparadas en el numeral anterior [2.1] y posteriormente se realizaron 2 veces más también por triplicado usando siempre las muestras patrón iniciales. En la tabla 4 se muestra el diseño experimental.

**Tabla 4.** Tiempo de almacenamiento de las soluciones patrón

METABOLITOS	Tiempo de almacenamiento de las soluciones patrón [días]		
	Muestras 1,2,3	Muestras 4,5,6	Muestras 7,8,9
INDOL	0	66	73
TRIPTAMINA	0	57	72
HIDROXI-INDOL	0	55	62
INDOL-3-ACETATO	0	49	62
INDOL-3-ACETAMIDA	0	53	68

Los metabolitos objetivo presentes en la fase polar de las muestras fueron detectados y cuantificados en un espectrómetro de triple cuadrúpulo lineal de masas de trampa de iones (3200 QTRAP, AB Sciex, Foster City, CA) acoplado a una bomba binaria de HPLC (serie 1200, de Agilent, Santa Clara, CA). La identificación e integración del pico se realizó utilizando el software Analyst (version 5, Agilent, Foster City, CA). La separación cromatográfica fue lograda en una columna de interacción hidrofílica (Luna 5  $\mu\text{m}$  NH<sub>2</sub> 100 Å 250 mm  $\times$  2 mm, Phenomenex, Torrance, CA) usando un método de gradiente de solvente. El solvente A fue una solución acuosa de acetato de amonio (20 mM) con 5 % (v/v) de acetonitrilo. El pH del solvente A fue ajustado a 9.5 inmediatamente antes del análisis empleando hidróxido de amonio. El solvente B fue acetonitrilo puro. El volumen de la inyección fue 10  $\mu\text{L}$ .

Las curvas de calibración de cada metabolito fueron previamente construidas por el personal del laboratorio, (Ver anexo B). Luego de determinar la concentración

de los metabolitos extraídos en la fase polar se estimó la eficiencia de extracción utilizando la fórmula:

$$Eficiencia = \frac{\text{moles en la fase polar}}{\text{moles totales}} = \frac{C_{polar} * V_{polar}}{C_{inicial} * V_{inicial}} \quad (4)$$

Donde  $C_{polar}$  indica la concentración de metabolitos en la fase polar,  $V_{polar}$  es el volumen de la fase polar (1,6 mL),  $C_{inicial}$  es la concentración inicial de los metabolitos previamente establecida (100  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) y  $V_{inicial}$  es el volumen total de la muestra incluyendo ambas fases (2,2 mL).

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En las tablas 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos de los análisis realizados por el espectrómetro de masas

**Tabla 5.** Concentración de cada metabolito determinada por espectrometría de masas de las muestras de concentración inicial 100  $\mu$ M

Muestra	Indol		Hidroxi-indol		Triptamina		Indol-3-acetamida		Indol-3-acetato	
	TR (min)	Cp ( $\mu$ M)	TR	Cp	TR	Cp	TR	Cp	TR	Cp
100-1	2,40	24,73	3,16	1,21	3,23	52,04	3,18	56,83	17,02	51,58
100-2	2,40	24,04	3,15	1,42	3,23	60,05	3,14	50,57	17,01	48,12
100-3	2,42	18,53	2,91	2,10	3,19	65,72	3,15	55,54	17,08	65,09
100-4	2,41	5,70	3,18	0,95	3,16	48,17	3,11	14,03	15,54	12,45
100-5	2,41	5,43	3,14	0,85	3,19	41,90	3,08	23,06	15,44	13,99
100-6	2,40	5,16	3,20	0,59	3,24	52,51	3,11	23,95	15,42	14,89
100-7	2,48	9,64	2,96	0,64	3,13	31,22	3,12	26,82	15,57	10,48
100-8	2,49	8,69	2,92	0,66	3,17	33,05	3,11	25,90	15,62	11,77
100-9	2,48	6,36	2,96	0,65	3,14	34,58	3,11	24,73	15,57	12,11

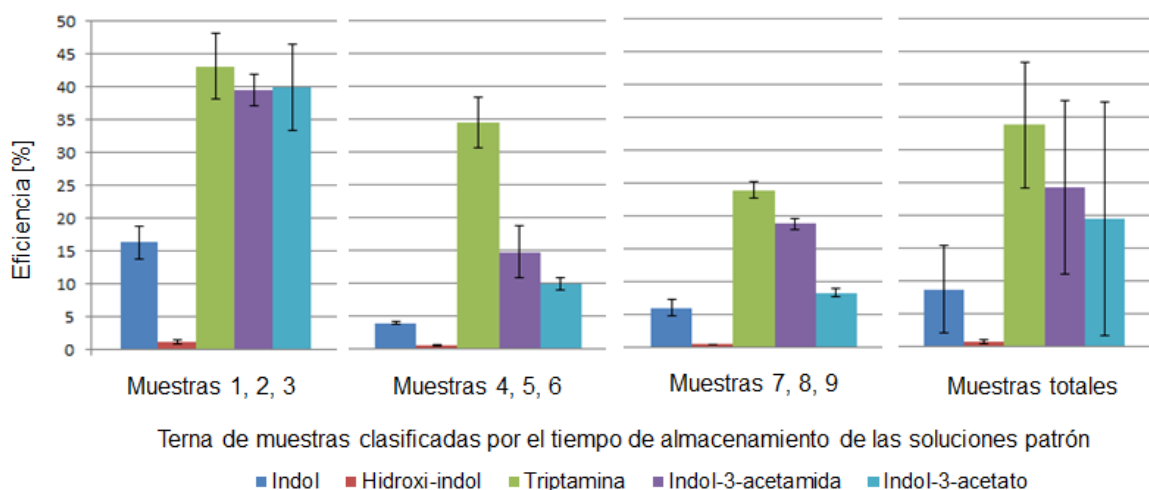
\* TR: Tiempo de retención en minutos. Cp: Concentración de la fase polar

**Tabla 6.** Concentración de cada metabolito determinada por espectrometría de masas de las muestras de concentración inicial 10  $\mu$ M

Muestra	Indol		Hidroxi-indol		Triptamina		Indol-3-acetamida		Indol-3-acetato	
	TR (min)	Cp ( $\mu$ M)	TR	Cp	TR	Cp	TR	Cp	TR	Cp
10-1	2,42	2,27	2,64	0,49	3,28	4,69	3,13	7,35	16,94	4,90
10-2	2,40	4,65	2,56	0,49	3,30	4,12	3,22	8,24	16,94	4,77
10-3	2,43	2,94	2,56	0,42	3,19	4,43	3,25	8,67	16,97	5,78
10-4	2,49	1,19	2,73	0,28	3,23	3,15	3,20	4,02	15,44	0,98
10-5	2,50	1,11	2,85	0,15	3,21	3,22	3,18	3,98	15,43	0,90
10-6	2,49	0,75	3,01	0,27	3,24	3,44	3,17	3,74	15,39	0,89
10-7	2,45	1,32	2,67	0,17	3,05	4,63	3,18	6,85	17,41	1,50
10-8	2,48	1,07	2,83	0,24	3,06	4,38	3,16	6,68	17,55	1,59
10-9	2,47	0,93	2,61	0,22	3,06	5,43	3,17	7,28	17,38	1,45

En las figuras 3 y 4 se observa la eficiencia promedio de las extracciones realizadas con su respectivo error, agrupadas cada 3 muestras, ya que se realizaron en fechas diferentes, aunque los experimentos fueron llevados a cabo bajo las mismas condiciones, la diferencia entre cada terna de muestras, es que las soluciones patrón permanecieron más tiempo almacenadas antes de ser utilizadas, siendo ésta la causa probable de la disminución de la eficiencia en las muestras 4 - 9. El último grupo de barras presentan un promedio y error de todas las muestras.

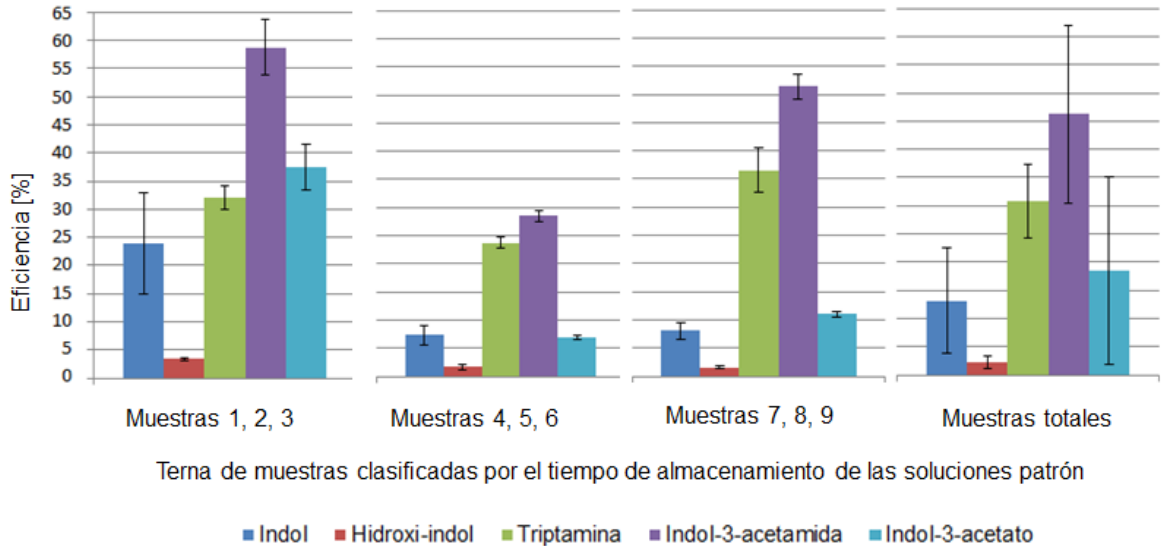
**Figura 3.** Eficiencia promedio de la extracción de los metabolitos cuando la concentración inicial es 100  $\mu\text{M}$



De la figura 3 se observa que el metabolito más hidrofóbico es el hidroxi-indol, con eficiencias por debajo del 5% en todas las ternas de muestras presentadas; en las muestras 1, 2 y 3, los metabolitos de mayor eficiencia son la triptamina, indol-3-acetato y indol-3-acetamida, que muestran valores similares entre 40% y 45%.

Finalmente, en todos los metabolitos se ve una gran disminución de la eficiencia en la segunda y tercer terna comparada con la primera.

**Figura 4.** Eficiencia promedio de la extracción de los metabolitos cuando la concentración inicial es 10  $\mu\text{M}$



De la figura 4 se observa que los valores de todas las eficiencias son mayores comparadas con las presentadas en la figura 3. Cualitativamente también se ve que ordenando los metabolitos de acuerdo a su eficiencia mantienen el mismo lugar que en la figura 3, excepto por el indol-3-acetamida, que presentó un comportamiento considerablemente mejor cuando la concentración inicial fue de 10  $\mu\text{M}$ . Nuevamente se observa que la eficiencia del hidroxindol no sobrepasa el 5%.

De manera general se ve que las eficiencias en ambas figuras oscilan entre valores de 1% y 59%. También, por cada triplicado se observa que el error es pequeño y se tienen valores cercanos entre ellos. Finalmente es notable que la

segunda y tercera terna presentan datos similares y que la eficiencia de la extracción para todos los metabolitos disminuyó en promedio a la mitad.

La disminución de la eficiencia en las muestras 4 a la 9 de los metabolitos, se debe en gran medida al largo tiempo de almacenamiento de las soluciones patrón antes de ser empleadas y que no se tuvieron las condiciones térmicas apropiadas. Para el almacenamiento por máximo 10 días, mantener las soluciones patrón a  $-20^{\circ}\text{C}$  es adecuado, pero, para un tiempo mayor a ese, es mejor disminuir la temperatura, y así asegurar una menor degradación química de los metabolitos al estar en contacto con el disolvente DMF.

En las tablas 7 y 8 se ve el valor de la concentración promedio en cada fase (polar y no polar) para cada uno de los metabolitos estudiados (tomando para el promedio los valores de la primera terna de muestras analizadas), junto con el valor del coeficiente de distribución calculado empleando la ecuación 1 y finalmente el valor logarítmico de dicho coeficiente.

Se calculó el coeficiente de distribución, ya que este tiene en cuenta la forma ionizada y no ionizada de los metabolitos, y debido a la naturaleza de los mismos (ácida o básica), éstos se presentarán de ambas formas en las soluciones a analizar por el espectrómetro.

**Tabla 7.** Coeficiente de distribución de los metabolitos estudiados en base a una concentración inicial de ellos de 100  $\mu\text{M}$

	[ ] Polar $\mu\text{M}$	[ ] Orgánica $\mu\text{M}$	D	LogD
<i>Indol</i>	22,43	368,21	16,41	1,22
<i>Hidroxi-indol</i>	1,58	434,96	276,13	2,44
<i>Triptamina</i>	59,27	250,33	4,22	0,63
<i>Indol-3-acetamida</i>	54,31	266,20	4,90	0,69
<i>Indol-3-acetato</i>	54,93	264,23	4,81	0,68

**Tabla 8.** Coeficiente de distribución de los metabolitos estudiados en base a una concentración inicial de ellos de 10  $\mu\text{M}$

	[ ] Polar $\mu\text{M}$	[ ] Orgánica $\mu\text{M}$	D	LogD
<i>Indol</i>	3,29	33,48	10,18	1,01
<i>Hidroxi-indol</i>	0,47	42,50	90,94	1,96
<i>Triptamina</i>	4,41	29,88	6,77	0,83
<i>Indol-3-acetamida</i>	8,08	18,14	2,24	0,35
<i>Indol-3-acetato</i>	5,15	27,52	5,34	0,73

En las dos tablas anteriores se observa como se ve afectado el coeficiente de distribución por la concentración inicial de los metabolitos. En ambos casos, los compuestos más hidrofóbicos son el hidroxindol y el indol respectivamente, pero para las demás sustancias ese orden varía. En la tabla 7, el valor del coeficiente es muy similar (Aprox. 0,7) para el indol-3-acetamida e indol-3-acetato y el metabolito que presenta una menor hidrofobicidad en los solventes es la triptamina. En la tabla 8 son la triptamina y el indol-3-acetato los que presentan valores similares y mayores a los de la tabla anterior. Se observa también que la variación en los coeficientes de distribución es más representativa en los metabolitos más hidrofóbicos y en el indol-3-acetamida. De forma cualitativa los

valores de las 2 tablas anteriores reflejan la forma en la que se esperaba que se distribuyeran los metabolitos en las fases polar y apolar, ya que jerárquicamente el coeficiente de distribución hallado los ordena de manera similar de acuerdo a su hidrofobicidad como en la tabla 3.

#### 4. CONCLUSIONES

El protocolo de extracción empleado es adecuado para tres de los metabolitos estudiados – Indol-3-acetamida, indol-3-acetato y triptamina – pero debe ser reformulado para el indol e hidroxindol ya que la eficiencia de extracción es muy baja.

Existe un aumento de la eficiencia de extracción cuando la concentración inicial es menor, que en otras palabras, puede significar que se logra una mejor extracción al emplear una mayor cantidad de solvente.

Se concluye también que las condiciones de almacenamiento deben ser más estrictas, bien sea teniendo una temperatura de almacenamiento menor o tener un tiempo límite de 10 días o 2 semanas para su almacenamiento previo al uso. Ya que se evidencia en el transcurso del trabajo, que las incorrectas condiciones de almacenamiento ocasionaron una degradación de los metabolitos disueltos en el DMF, y se notó en la disminución de la eficiencia.

Los valores de eficiencia encontrados a lo largo de este estudio permiten establecer un acercamiento a la cantidad real de metabolitos presentes en muestras reales al momento de realizar su extracción. Ya que teniendo los valores de la eficiencia se establece que porcentaje de los metabolitos logran ser extraídos y no se asume un 100% de estos, como ocurría anteriormente.

## 5. RECOMENDACIONES

En el desarrollo de los experimentos anteriores se presentaron contratiempos que permiten ver como las condiciones de almacenamiento de las muestras afectan considerablemente los resultados y como el trabajar con diferentes solventes también afecta el estado químico de las sustancias de interés.

- Los metabolitos disueltos se almacenaron en una nevera a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que se realizaba su extracción, la temperatura es adecuada si se mantienen allí por un periodo menor a una semana, de lo contrario es conveniente que la temperatura sea al menos  $10^{\circ}\text{C}$  menor.
- Al momento del análisis en el espectrómetro de masas (LC/MS) es importante verificar el tiempo de retención, aunque se tienen valores estándar para esos tipos de mediciones, a veces los tiempos se desplazan y esto representa una medida totalmente errónea de la concentración de la muestra.
- Es importante procurar una mezcla homogénea de los metabolitos dentro de los solventes, por lo cual es recomendable que en el intermedio de varios pasos, desde la preparación de disoluciones hasta antes del análisis en el LC/MS se utilice un vórtex para mantener la homogeneidad de la muestra en todo momento.

## BIBLIOGRAFÍA

[1] Álvarez B, Priego F, Luque de Castro M. Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. Trends in analytical chemistry, Vol. 29, No. 2, 2010

[2] Angurell I, Casamitjana N, Caubet A, Dinarès I, Muñoz-Torrero D. Operaciones básicas en el laboratorio de química. Extracción [En línea]. [Fecha de consulta: 05 marzo 2014]. Disponible en: [www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio\\_fona](http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_fona)

[3] Brown E.G. Ring Nitrogen and Key Biomolecules: The biochemistry of N-heterocycles. Springer science business media BV. Capítulo 9: Indoles. (192-204), 1998

[4] Dietmair S, Timmins N, Gray P, Nielsen L, Krömer J. Towards quantitative metabolomics of mammalian cells: Development of a metabolite extraction protocol. Analytical Biochemistry 404 (155–164), 2010.

[5] Huang Y, Li N, Liboni K, Neu J. Glutamine decreases lipopolysaccharide-induced IL-8 production in Caco-2 cells through a non NF- $\kappa$ B p50 mechanism. Cytokine 22 (77–83), 2003

[6] Maharjan R, Ferenci T. Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. Analytical Biochemistry 313 (145–154), 2003.

[7] Marcobal A, Kashyap PC, Nelson TA. A metabolomic view of how the human gut microbiota impacts the host metabolome using humanized and gnotobiotic mice. The ISME Journal 7, (1933–1943), 2013.

**[8]** Moco S, Bino RJ, Ric C.H. De Vos, Vervoort J. Metabolomics technologies and metabolite identification. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 26, No. 9, 2007.

**[9]** Philip Denton & Chris Rostron. *Pharmaceutics, the science of medicine design*. Oxford University Press. Capítulo 8 hydrophobicity and partitioning. (127-146), 2003.

**[10]** Ritter J, Genzel Y, Reichl U. Simultaneous extraction of several metabolites of energy metabolism and related substances in mammalian cells: Optimization using experimental design. *Analytical Biochemistry* 373 (349–369), 2008.

**[11]** Sana T, Fischer S. *Maximizing Metabolite Extraction for Comprehensive Metabolomics Studies of Erythrocytes*. Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, USA 2007.

**[12]** Tambellini N, Zarembeg V, Turner R, Weljie A. Evaluation of Extraction Protocols for Simultaneous Polar and Non-Polar Yeast Metabolite Analysis Using Multivariate Projection Methods. *Metabolites* 3 (592-605) 2013.

**[13]** Warwick B. Dunn, David. I. Ellis. *Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies*. *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 24, Nº 4, (285–294), 2005.

**[14]** Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, et al. HMDB 3.0 — The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013. Jan 1;41(D1):D801-7.

## ANEXOS

### ANEXO A. Termodinámica del reparto

El reparto de un compuesto entre dos solvente inmiscibles puede ser comprendido en términos del potencial químico del soluto. Para una sustancia pura, el potencial químico es equivalente a la energía libre de Gibbs por mol. La energía libre total de una sustancia pura puede ser calculada si el número de moles de la sustancia y el potencial químico son conocidos. Para mezclas, la definición de potencial químico es más compleja, pero la energía libre total de una mezcla poder ser calculada si el número de moles de cada componente y sus respectivos potenciales químicos son conocidos.

El cálculo del potencial químico de cada componente en una mezcla es complicado y depende de la temperatura, presión y composición. De consideraciones del potencial químico, la concentración del soluto y la aplicación de la ley de Raoult, se puede demostrar como el potencial químico del agua en una solución acuosa ideal  $\mu_{H_2O(l)}$  está dada por:

$$\mu_{H_2O(l)} = \mu_{H_2O(l)}^{\theta} + RT \ln x_{H_2O} \quad (D.1)$$

Donde  $\mu_{H_2O(l)}^{\theta}$  es el potencial químico estándar del agua, R es la constante de los gases, T la temperatura y  $x_{H_2O}$  es la fracción molar del agua en solución. Lo que sugiere que el potencial químico de un soluto en un líquido que se identificaría como solvente 1, está dado por:

$$\mu_{S(1)} = \mu_{S(1)}^{\theta} + RT \ln x_{S(1)} \quad (D.2)$$

Donde  $x_{S(1)}$  es la fracción molar del soluto en el solvente 1. De igual forma se puede determinar el potencial químico en el solvente 2. El soluto se distribuirá hasta que su concentración en cada fase permanezca constante. La condición para el equilibrio es que  $\Delta G=0$  es decir, que no exista ninguna diferencia entre la energía libre de Gibbs del soluto en cada fase  $\mu_{S(1)} = \mu_{S(2)}$ . Por lo que se puede reescribir:

$$\mu_{S(1)}^{\theta} + RT \ln x_{S(1)} = \mu_{S(2)}^{\theta} + RT \ln x_{S(2)} \quad (\text{D.3}) \quad \text{ó} \quad \frac{\mu_{S(1)}^{\theta} - \mu_{S(2)}^{\theta}}{RT} = \ln \left( \frac{x_{S(2)}}{x_{S(1)}} \right) \quad (\text{D.4})$$

A temperatura constante, todos los términos del lado izquierdo de la ecuación (D.4) son constantes. Por lo tanto todos los términos del lado derecho deben ser constantes también y se puede reconocer que la relación de las fracciones molares del soluto en el líquido 2 y el líquido 1 es el coeficiente de reparto de un soluto:

$$\frac{\mu_{S(1)}^{\theta} - \mu_{S(2)}^{\theta}}{RT} = \ln P \quad (\text{D.5})$$

Cuando el comportamiento ideal de la solución no puede ser asumido, es porque usualmente se trata de soluciones concentradas, y la actividad debe ser usada en lugar de la fracción molar del soluto.

## ANEXO B. Valores estándar de cada metabolito

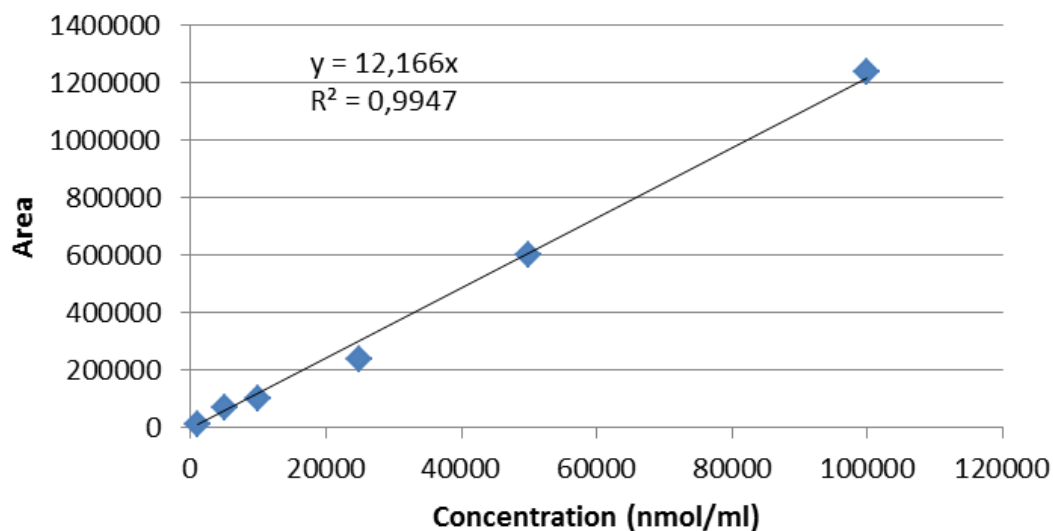
### Indol

**Tabla A.1.** Valores estándar de características importantes del indol para su medición en el LC/MS

Sample Type	Component Name	Actual Concentration	Area	Height	Retention Time	Width at 50%	Used	Calculated Concentration	Accuracy
Standard	Indole	1000	9632,991959	375,6476893	2,40960147	0,447410941	TRUE	2497,812168	249,781217
Standard	Indole	5000	68943,0826	2211,370042	2,513437382	0,519416555	TRUE	7251,786885	145,035738
Standard	Indole	10000	100306,675	3399,150613	2,501885438	0,4845151	TRUE	9765,722095	97,6572209
Standard	Indole	25000	234988,6	7584,634573	2,512568208	0,502116946	TRUE	20561,09367	82,2443747
Standard	Indole	50000	600219,2221	20956,54735	2,489629841	0,472373628	TRUE	49835,99656	99,6719931
Standard	Indole	100000	1239628,717	43673,98551	2,496076057	0,468030588	TRUE	101087,5886	101,087589

Fuente: Grupo de investigación del Dr. Jayaraman

**Fig A.1.** Relación lineal entre la concentración y el área del pico del indol para los valores estándar



Fuente: Grupo de investigación del Dr. Jayaraman

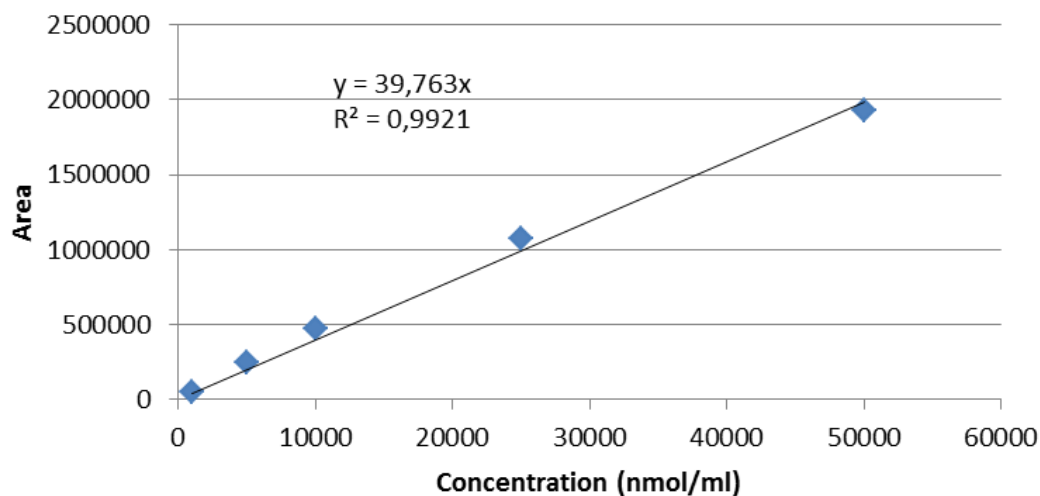
## Hidroxi-indol

**Tabla A.2.** Valores estándar de características importantes del hidroxi-indol para su medición en el LC/MS

Sample Type	Component Name	Actual Concentration	Area	Height	Retention Time	Width at 50%	Used	Calculated Concentration	Accuracy
Standard	5hydroxyindole	1000	49075,13226	1366,415665	2,803072801	0,665183161	TRUE	1234,199316	123,419932
Standard	5hydroxyindole	5000	248930,0648	6099,515202	2,78293609	0,663715888	TRUE	6260,386914	125,207738
Standard	5hydroxyindole	10000	469908,3203	11938,91995	2,778375127	0,638250674	TRUE	11817,80876	118,178088
Standard	5hydroxyindole	25000	1076256,77	27290,50717	2,776051107	0,616711506	TRUE	27066,97483	108,267899
Standard	5hydroxyindole	50000	1927388,045	48790,61381	2,776553852	0,619122093	TRUE	48472,22816	96,9444563

Fuente: Grupo de investigación del Dr. Jayaraman

**Fig A.2.** Relación lineal entre la concentración y el área del pico del hidroxi-indol para los valores estándar



Fuente: Grupo de investigación del Dr. Jayaraman

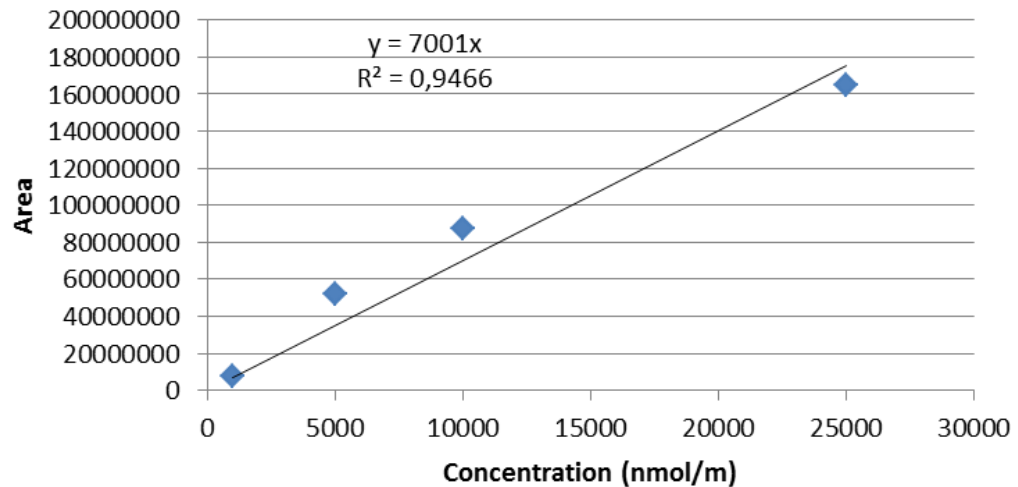
## Triptamina

**Tabla A.3.** Valores estándar de características importantes de la triptamina para su medición en el LC/MS

Sample Type	Component Name	Actual Concentration	Area	Height	Retention Time	Width at 50%	Used	Calculated Concentration	Accuracy
Standard	Tryptamine	1000	7981193,085	99703,08218	3,068507174	1,300905899	TRUE	1140,010821	114,001082
Standard	Tryptamine	5000	52004785,05	975412,1163	3,176190676	0,878795282	TRUE	7428,214941	148,564299
Standard	Tryptamine	10000	87466934,06	1634381,17	3,166418796	0,879044221	TRUE	12493,527	124,93527
Standard	Tryptamine	25000	164602464,1	3044632,118	3,156948109	0,88397324	TRUE	23511,34578	94,0453831

Fuente: Grupo de investigación del Dr. Jayaraman

**Fig A.3.** Relación lineal entre la concentración y el área del pico de la triptamina para los valores estándar



Fuente: Grupo de investigación del Dr. Jayaraman

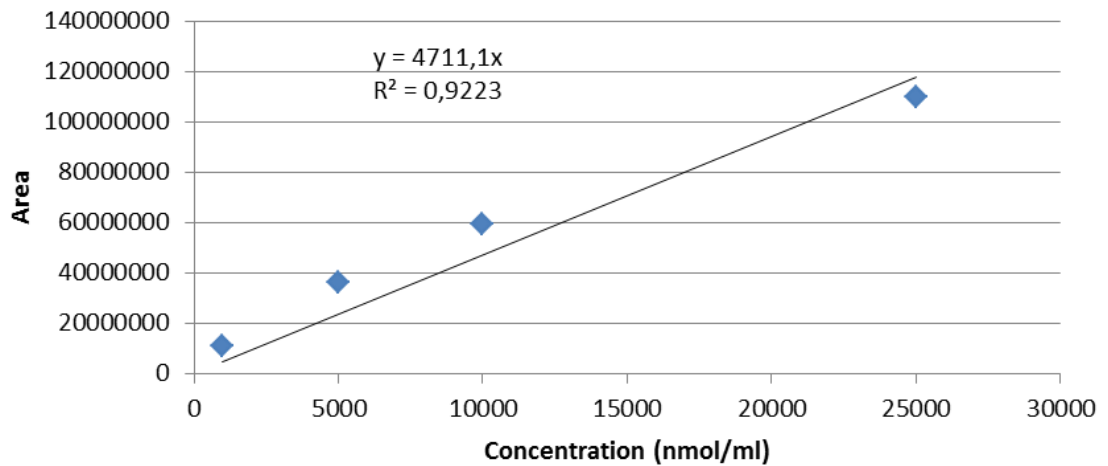
## Indol-3-acetamida

**Tabla A.4.** Valores estándar de características importantes del indol-3-acetamida para su medición en el LC/MS

Sample Type	Component Name	Actual Concentration	Area	Height	Retention Time	Width at 50%	Used	Calculated Concentration	Accuracy
Standard	Indole3acetamide	1000	11082476,13	317785,4775	3,313686223	0,442060527	TRUE	2352,400824	235,240082
Standard	Indole3acetamide	5000	36387174,06	915067,634	3,290803365	0,51131172	TRUE	7723,654644	154,473093
Standard	Indole3acetamide	10000	59318469,93	1383057,807	3,278376712	0,596295261	TRUE	12591,12277	125,911228
Standard	Indole3acetamide	25000	110074351,5	2269713,121	3,186554459	0,921295722	TRUE	23364,72393	93,4588957

Fuente: Grupo de investigación del Dr. Jayaraman

**Fig A.4.** Relación lineal entre la concentración y el área del pico del indol-3-acetamida para los valores estándar



Fuente: Grupo de investigación del Dr. Jayaraman

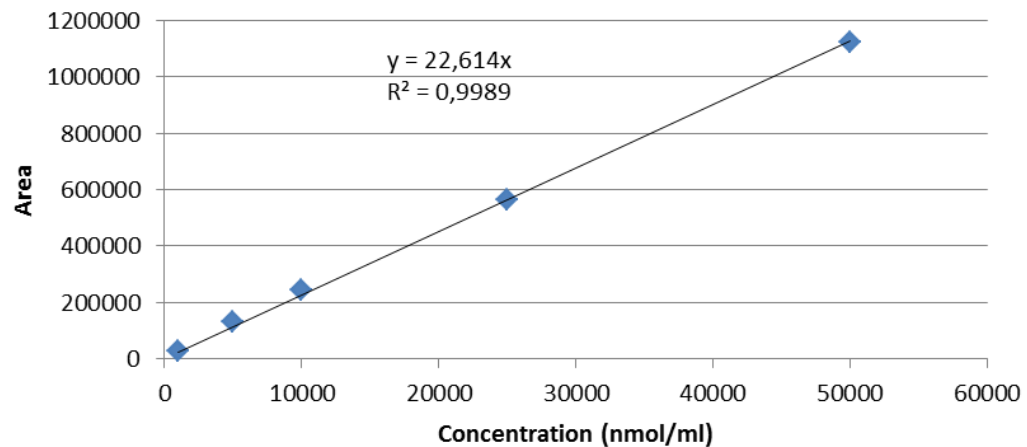
## Indol-3-acetato

**Tabla A.5.** Valores estándar de características importantes del indol-3-acetato para su medición en el LC/MS

Sample Type	Component Name	Actual Concentration	Area	Height	Retention Time	Width at 50%	Used	Calculated Concentration	Accuracy
Standard	Indole3acetate	1000	27553,43512	1439,125913	17,60865532	0,268496749	TRUE	1247,759056	124,775906
Standard	Indole3acetate	5000	132890,3934	7273,250295	17,61109398	0,263189508	TRUE	6017,949889	120,358998
Standard	Indole3acetate	10000	245632,7247	13033,32712	17,59744413	0,267427085	TRUE	11123,49351	111,234935
Standard	Indole3acetate	25000	564726,2986	26811,12597	17,57694609	0,288398866	TRUE	25573,66623	102,294665
Standard	Indole3acetate	50000	1125038,52	49763,79919	17,58512759	0,312134942	TRUE	50947,44067	101,894881
Standard	Indole3acetate	100000	2190946,225	82850,05668	17,55987016	0,39227473	TRUE	99217,13867	99,2171387

Fuente: Grupo de investigación del Dr. Jayaraman

**Fig A.5.** Relación lineal entre la concentración y el área del pico del indol-3-acetato para los valores estándar



Fuente: Grupo de investigación del Dr. Jayaraman