
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA
DE POLIAMINAS”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE
T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

P R E S E N T A

JORGE IVÁN DELGADO SAUCEDO

Las Agujas, Zapopan, Jal., Diciembre de 2003



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. JORGE IVÁN DELGADO SAUCEDO
PRESENTE.**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORMES opción Tesis con el título "VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE POLIAMINAS", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la M.C. RAMÓN REYNOSO OROZCO y como Asesor el/la DRA. ANNE SANTERRE LUCAS.

**A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"**

"2002, Año Constanza Hernández Alvirde"
Las Agujas, Zapopan, Jal., 25 de noviembre del 2002


DRA. MÓNICA ELIZABETH ROJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA


M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. M.C. RAMÓN REYNOSO OROZCO.-Director del Trabajo.
c.c.p. DRA. ANNE SANTERRE LUCAS.-Asesor del Trabajo.
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

Forma C

**C. DRA. MONICA ELIZABETH RIOJAS LOPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACION
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.**

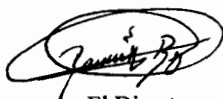
Por medio de la presente, nos permitimos informarle a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis

Que realizó el **Pasante de Biología JORGE IVÁN DELGADO SAUCEDO** con el título: **"VALIDACION DE UN MÉTODO DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE POLIAMINAS"**, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Las Agujas, Zapopan, Jal., 30 de Septiembre 2003



El Director
M. en C. RAMON REYNOSO
OROZCO



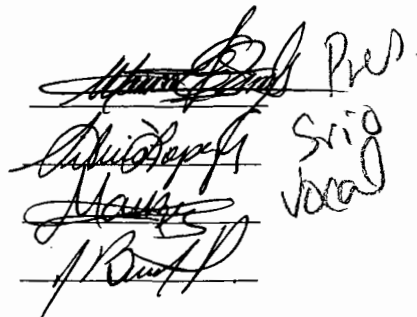
COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA



El Asesor
Dra. ANNE SANTERRE
LUCAS

SINODALES

- 1.- M. C. MÓNICA E. UREÑA GUERRERO
- 2.- M. C. SILVIA J. LÓPEZ PÉREZ
- 3.- DR. MARIO A. RUIZ LÓPEZ
- 4.- DR. JACINTO BAÑUELOS PINEDA



Pres.
Srta. vocal

La presente tesis fue dirigida por el M. C. Ramón Reynoso Orozco y como asesor la Dra. Anne Santerre L. en el Laboratorio de Cromatografía del Departamento de Biología Celular y Molecular de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al M. C. Ramón Reynoso Orozco y a la Dra. Anne Santerre L. por todo el apoyo que me han brindado en mi formación profesional y transmitirme cualidades como el siempre estar dispuesto a ayudar, responsabilidad, disciplina y humildad, porque cualquiera puede criticar pero pocos autocriticarse y enmendar.

Por incrementar mi conocimiento y proporcionarme herramientas para explorar mi fascinación por la ciencia y sobre todo por esa gran calidad de ser humanos que poseen.

A mis sinodales por su tiempo y dedicación a orientarme.

Mis compañeros del laboratorio que siempre me brindaron apoyo.

*A mi familia por su apoyo y motivación a siempre seguir adelante, fijar metas y alcanzarlas ...*Gracias.**

ABREVIATURAS

ABC	área bajo la curva
AdoMet	Adenosilmetionina
AOAC	Asociación de comunidades analíticas
Arg	Arginina
C.V.	coeficiente de variación
DAH	1-7, Diaminoheptano
DAO	Diaminoxidasa
D.E.	desviación estándar
DFMO	Difluorometilornitina
FDA	Administración de drogas y alimentos
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
ICH	Conferencia Internacional sobre la Armonización
LOQ	Límite de cuantificación
LOD	Límite de detección
ODC	Ornitinadescarboxilasa
OPA	<i>o</i> -phthalaldehído
Om	Ornitina
PAO	Poliaminaoxidasa
PAs	Poliaminas
Pu	Putrescina
RSD	desviación estándar relativa
S/N	señal/ruido
Spd	Espermidina
Spm	Espermina
TR	tiempo de retención
USP	Farmacopea de los Estados Unidos

RESUMEN

La cromatografía es el método físico-químico más utilizado para separar y analizar los componentes de una muestra debido principalmente a la existencia de varios principios físico-químicos aplicables al análisis cromatográfico, así como a la existencia de varias modalidades de separación cromatográfica (líquido-líquido, líquido-sólido, gas-líquido y gas-sólido) y al desarrollo de sistemas de detección cada vez más sensibles. La cromatografía líquida en particular, debe su importancia en el campo del análisis a su rapidez, simplicidad, su costo relativamente bajo y su gran aplicabilidad como herramienta de separación, además de proporcionar información cuantitativa valiosa acerca de las especies químicas separadas. El principio físico-químico del intercambio iónico consiste en la separación de las moléculas solubles en la fase móvil de acuerdo con pequeñas diferencias de carga, por lo cual es una técnica con alta resolución. Debido a que la mayoría de las moléculas biológicas son polares y pueden llevar cargas, es un principio ampliamente usado en cromatografía. En la cromatografía por intercambio iónico existe una competencia entre la fase móvil y el analito por los puntos activos de la resina (fase estacionaria), la cual posee cargas iónicas opuestas a las del analito, que se separa del resto de la mezcla al interactuar con la resina para posteriormente ser eluido, al pasar una solución con carga iónica igual a la del analito. La cromatografía como método analítico requiere un buen control en cada uno de los elementos que conforman el sistema y el proceso total del diseño se lleva a cabo con formatos o normas existentes ya establecidas que dirigen el desarrollo, optimización y validación del método para proporcionar un intervalo de seguridad para el analito o molécula que se quieran analizar. Los parámetros del método de validación son: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, reproducibilidad y robustez. La cromatografía de intercambio iónico es muy utilizada para el análisis de las poliaminas (PAs) las más estudiadas son la putrescina (Pu), la espermidina (Spd) y la espermina (Spm), que son importantes para la proliferación de células normales y cancerosas. Las aplicaciones que tienen estas moléculas en el desarrollo, seguimiento y posible alternativa terapéutica son muy extensas y han sido propuestas como biomarcadores tumorales dado que muchos tipos de células y tejidos neoplásicos se caracterizan por presentar niveles elevados de las mismas. Así, el presente trabajo tuvo como objetivo validar la técnica de cromatografía por intercambio iónico a baja presión para aplicarla al análisis de las poliaminas Pu, Spd y Spm presentes en muestras de orina provenientes de ratones de la cepa BALB/c con el linfoma L5178Y. Se logró mantener estable el sistema analítico, además de la separación de las moléculas de interés a partir de una mezcla de estándares y se realizó la validación de la técnica satisfactoriamente. Enseguida, se aplicó con éxito al análisis de muestras biológicas. Los resultados obtenidos nos permitieron determinar los distintos niveles de putrescina, espermidina y espermina en ratones sanos y con linfoma, permitiendo así, la aplicación de la técnica validada, con confiabilidad para estudios de investigación básica o aplicada.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	iv
Resumen.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
1. Cromatografía.....	3
1.1 Introducción de la cromatografía.....	3
1.2 Descripción general de la cromatografía.....	3
2. Principios cromatográficos.....	4
2.1 Adsorción.....	4
2.2 Partición.....	5
2.3 Intercambio iónico.....	7
2.4 Exclusión.....	8
2.5 Afinidad.....	10
3. Cromatografía en columna.....	12
4. Cromatografía plana.....	15
4.1 Cromatografía en capa fina.....	16
4.2 Cromatografía en papel.....	16
4.3 Electroforesis y electrocromatografía.....	17
5. Teorías cromatográficas.....	17
5.1 Teoría de los platos.....	17
5.2 Teoría cinética de la cromatografía.....	18
6. Análisis por cromatografía.....	20
6.1 Análisis cualitativo.....	20
6.2 Análisis cuantitativo.....	20
6.2.1 Análisis basado en la altura de los picos.....	20
7. Calibración con estándares.....	21
7.1 El método del estándar interno.....	21
8. La validación.....	23
8.1 Exactitud.....	24
8.2 Precisión.....	27

8.3 Especificidad.....	29
8.4 Sensibilidad.....	32
8.5 Linealidad.....	34
8.6 Robustez.....	36
9. Las poliaminas (PAs).....	39
9.1 Biosíntesis de Poliaminas.....	40
9.2 Las poliaminas como bioindicadoras de crecimiento tumoral.....	44
III. JUSTIFICACIÓN.....	48
IV. HIPÓTESIS.....	49
V. OBJETIVO.....	50
VI. METODOLOGÍA.....	51
1. Sistema cromatográfico de intercambio iónico.....	51
2. Validación.....	53
3. Preparación de la muestra.....	54
VII. RESULTADOS.....	55
VIII. DISCUSIÓN.....	71
IX. CONCLUSIONES.....	73
X. PERSPECTIVAS.....	74
XI. LITERATURA CITADA.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Clasificación de las técnicas cromatográficas.....	4
2. Mecanismo principal de la cromatografía de adsorción.....	5
3. Separación por intercambio iónico.....	8
4. Representación de la separación cromatográfica por exclusión.....	10
5. Separación por afinidad.....	11
6. Esquema de elución.....	12
7. Representación esquemática de los elementos de una cromatografía en columna.....	13
8. Ejemplo de cromatograma del análisis de poliaminas.....	14
9. Instrumentación general para cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC).....	15
10. Difusión por remolino, transferencia de masa.....	19
11. Representación de exactitud y precisión.....	29
12. Comparación de la separación de un analito en cromatograma.....	31
13. Componentes principales de un cromatógrafo.....	39
14. Metabolismo de las poliaminas.....	40
15. Algunas funciones celulares de las poliaminas.....	41
16. Vía metabólica de las poliaminas en células de mamíferos.....	42
17. Sistema cromatográfico de intercambio iónico utilizado.....	51
18 a. Gráfica de regresión para putrescina, en linealidad.....	59
18 b. Gráfica de regresión para espermidina, en linealidad.....	60
18 c. Gráfica de regresión para espermina, en linealidad.....	60
19. Cromatograma de estándares de poliaminas.....	64
20 a. Cromatograma de orina de ratón BALB/c.....	65
20 b. Cromatograma de orina de ratón BALB/c más estándares.....	65
21. Cromatograma de orina de ratón sano.....	69
22. Cromatograma de orina de ratón con Linfoma L5178Y.....	69
23 a. Gráfica de los niveles detectados de putrescina en orina de ratón BALB/c.....	70
23 b. Gráfica de los niveles detectados de espermidina en orina de ratón BALB/c.....	70

ÍNDICE DE CUADROS

1. Ejemplo de una determinación de exactitud.....	25
2. Criterios de aceptación para precisión.....	29
3. Ejemplo de concentraciones para determinar la sensibilidad.....	32
4. Ejemplo de linealidad.....	35
5. Diseño experimental: cuadro de Placket y Burman.....	37
6. Cálculo de las diferencias para cada parámetro.....	37
7. Ejemplo de robustez.....	38
8. Componentes de los amortiguadores (fase móvil).....	52
9. Ciclo programado al sistema cromatográfico.....	53
10. Resultados de linealidad para putrescina.....	55
11. Variabilidad en la linealidad para putrescina.....	56
12. Resultados de linealidad para espermidina.....	56
13. Variabilidad en la linealidad para espermidina.....	57
14. Resultados de linealidad para espermina.....	58
15. Variabilidad en la linealidad para espermina.....	59
16. Área de los picos (estándares).....	61
17. Relación de áreas (área PAs / área DAH).....	61
18. Reproducibilidad en precisión del sistema.....	62
19. Precisión del método para putrescina.....	63
20. Precisión del método para espermidina.....	63
21. Resultados de exactitud para putrescina.....	66
22. Resultados de exactitud para espermidina.....	66
23. Resultados de exactitud para espermina.....	67
24. Resultados de exactitud para 1,7-diaminoheptano.....	67
25. Concentraciones encontradas para del límite de detección.....	68
26. Concentraciones encontradas para límite de cuantificación.....	68

I. INTRODUCCIÓN

La cromatografía es el método analítico más utilizado para separar, identificar y cuantificar rápidamente moléculas dentro de una muestra. El desarrollo de un método cromatográfico confiable requiere del mejor control en cada uno de los aspectos de un sistema de análisis, por lo que es imprescindible que sea validado (Krull y Swartz, 1997). Todo método analítico debe ser validado para proveer seguridad e integridad durante su aplicación. La validación de un método comprende el control de una serie de parámetros que son: exactitud, precisión, especificidad, sensibilidad (límite de detección y cuantificación), linealidad, reproducibilidad y robustez (Krull y Swartz, 1997; Waters, 2002), que utilizan los laboratorios para acreditar un método analítico con un intervalo de seguridad para un analito determinado. La exactitud se define como la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el resultado al analizar muestras a las que se les ha adicionado el analito de interés (estándar) en concentraciones conocidas; y se expresa como el porcentaje de recuperación del analito. La precisión depende de la reproducibilidad o repetibilidad del método analítico. La especificidad, según la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) (Krull y Swartz, 1997), es la habilidad para “medir” el analito de interés exacta y específicamente en presencia de otros componentes presentes en la muestra. El límite de detección por sus siglas en inglés LOD, es la concentración más baja del analito que puede ser detectada, pero no cuantificada, en una muestra. El límite de cuantificación, por sus siglas en inglés LOQ, es la concentración más baja del analito que puede ser determinada en una muestra con precisión y exactitud aceptables. Del mismo modo que el límite de detección, el límite de cuantificación es expresado como una concentración, con la precisión y exactitud de la medida también reportada. La linealidad es la habilidad del método para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado. La reproducibilidad es la capacidad de repetir un resultado obtenido bajo las mismas condiciones. La robustez es la capacidad de un método para medir variaciones pequeñas, en parámetros tales como: el porcentaje de solventes orgánicos, pH, fuerza iónica y temperatura (Krull y Swartz, 1997).

En el área de la cromatografía instrumental, la cromatografía líquida es el método más popular, tanto por su amplio espectro de aplicaciones (líquido/líquido: partición; líquida/sólida: adsorción, exclusión, intercambio iónico), como por su sensibilidad y rapidez. El principio de intercambio iónico resulta ser muy útil en una gran cantidad de técnicas cromatográficas donde los analitos de interés se encuentran en muestras que tengan altas concentraciones de otras sustancias. Una de sus aplicaciones importantes es en el análisis de las poliaminas (PAs) que son bases nitrogenadas alifáticas, catiónicas, de bajo peso molecular con ubicuidad y múltiples funciones en el desarrollo celular, tanto en células normales como tumorales. Reciben su nombre por poseer dos o más grupos amino en la cadena hidrocarbonada, así su naturaleza química las hace fáciles de estudiar por cromatografía de intercambio iónico (Khuhawar y Qureshi, 2001) dada su carga eléctrica.

En nuestro laboratorio se pretende establecer la relación entre los niveles de PAs en distintos tejidos y fluidos del organismo con el desarrollo neoplásico en el modelo de linfoma murino L5178Y que es de importancia en el estudio del cáncer; así como el efecto de sustancias naturales sobre el metabolismo de estas moléculas.

II. ANTECEDENTES

1. Cromatografía

1.1 Introducción a la Cromatografía

El método más general para analizar una mezcla de biomoléculas, consiste en la separación física de las moléculas de interés. Entre los métodos bien conocidos para llevar a cabo estas separaciones se incluyen la destilación, la cristalización, la extracción con solventes y la precipitación química o electrolítica (Skoog y West, 1982). El método más utilizado hoy en día para determinar analitos de interés dentro de una mezcla es la cromatografía, un procedimiento de separación con aplicaciones en todas las ramas de la ciencia (Nathan, 1975; Katime *et al.*, 1998).

La cromatografía, palabra de origen griego que significa *khromos*, color y *grafos*, escritura = descripción / escritura en color, fue desarrollada en 1906 por el botánico ruso Mijáil Tsuet, quien separó diferentes pigmentos vegetales (clorofila y xantofila) en solución, utilizando carbonato de calcio finamente pulverizado, empacado en una columna de vidrio. El nombre de esta técnica describe las bandas coloreadas que aparecían en la columna, debido a la separación de los componentes vegetales (Muñoz, 1981).

1.2 Descripción general de la cromatografía

Por cromatografía es posible separar, aislar e identificar componentes presentes en mezclas complejas, a veces imposible de separar por otros medios. Empleando una fase estacionaria que suele retener moléculas y una fase móvil (generalmente un líquido o un gas) que transporta los componentes de la mezcla a separar; las separaciones se basan en las diferencias de retención entre los componentes de la muestra (Figura 1) (Skoog y West, 1987). Los componentes que se desean separar deben ser solubles en la fase móvil y capaces de interactuar con la fase estacionaria ya sea al disolverse, adsorberse o al reaccionar químicamente con ella (Flaschka *et al.*, 1980). Existen diferentes tipos de fases estacionarias, generalmente es un sólido finamente dividido, sostenido en un estrecho tubo de vidrio o de metal; este tipo de método se denomina cromatografía en columna (Muñoz, 1981).

La fase móvil puede ser un líquido o un gas que pasa a través de la columna, lo cual divide en dos grupos a la cromatografía (Figura 1), según el tipo de fase móvil y fase estacionaria:

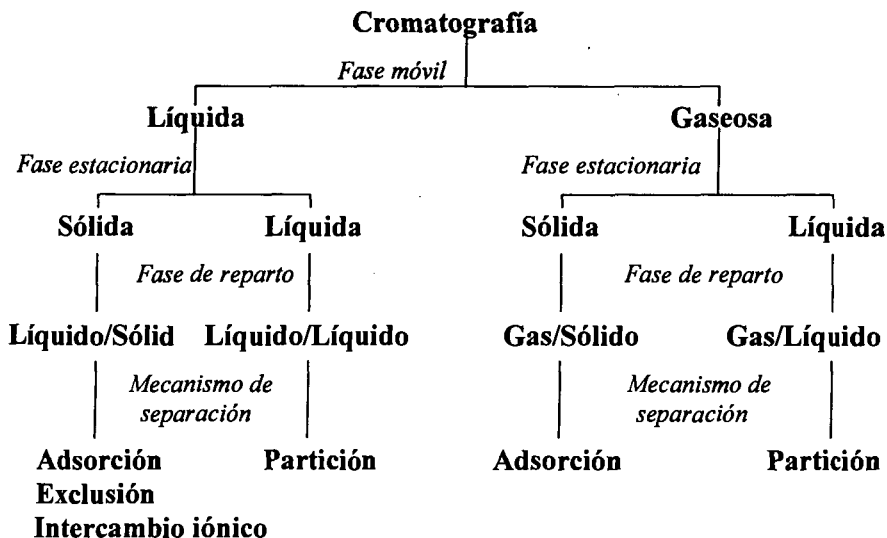


Figura 1. Clasificación de las técnicas cromatográficas (Prieto *et al.*, 1993).

2. Principios cromatográficos

Los principios cromatográficos más utilizados son la adsorción, la partición, la exclusión, el intercambio iónico y la afinidad (Skoog y West, 1987).

2.1 Adsorción

Los primeros trabajos realizados en cromatografía correspondían al tipo denominado de adsorción, en el cual la fase estacionaria es la superficie de un sólido finamente dividido de tal manera que el soluto compite por los sitios de interacción sobre la superficie de la fase estacionaria con las fuerzas de adsorción del disolvente utilizado (Figura 2). Existen grandes diferencias en la tendencia de los compuestos a adsorberse y estas diferencias constituyen el fundamento de la cromatografía de

adsorción. Fase estacionaria: el gel de sílice, es sin duda el adsorbente más empleado, aunque también se utiliza mucho la alúmina. Se disponen de materiales de empaque de diámetro de partícula de 10 μm que se obtienen a través de diferentes fuentes comerciales. Los compuestos que contienen ciertos grupos funcionales son retenidos más fuertemente que otros; la tendencia a ser adsorbidos por el sílice disminuye en el siguiente orden: ácido > alcohol > carbonilo > éster > hidrocarburo. La naturaleza del adsorbente influye en la determinación del orden de adsorción (Willard *et al* 1991; Skoog y West, 1987).

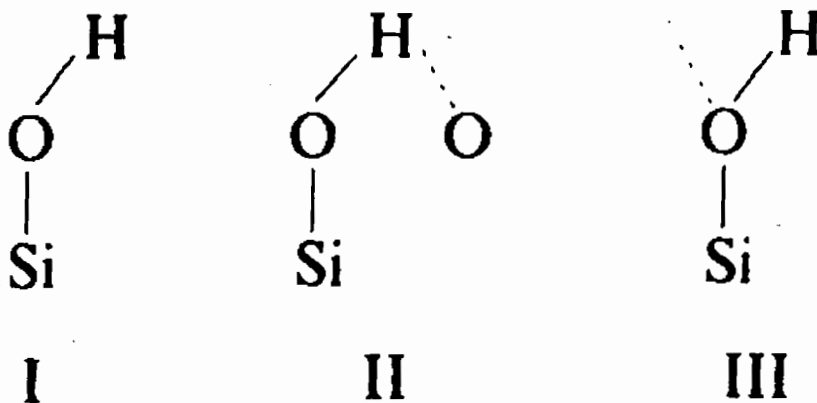


Figura 2. El mecanismo principal de la cromatografía de adsorción es la interacción de los grupos hidroxilo del gel de sílice con el grupo funcional polar de una molécula. Los grupos silanol (Si-OH) se encuentran en la superficie, el número y arreglo de los tipos de grupos hidroxilo determinan la actividad del adsorbente y se clasifican en tres tipos: I. hidróxilo libre; II. hidróxilo enlazado; y III. hidróxilo reactivo (Waters, 2002; Willard *et al.*, 1991).

2.2 Partición

La cromatografía de partición o cromatografía líquido-líquido se originó en 1941 a partir del trabajo de los ganadores del premio Nóbel, Martín y Synge, quienes demostraron que una columna bien preparada puede tener una altura de plato tan

reducida como 0.002 cm y puede contener 5000 platos teóricos, lográndose eficiencias de separación importantes aún con columnas relativamente cortas. El soporte sólido de más uso para la cromatografía de partición ha sido el ácido silícico o gel sílice, otros soportes comunes son tierra de infusorios, almidón, celulosa, vidrio en polvo, se ha usado agua y una variedad de líquidos orgánicos para recubrir estos sólidos (líquidos estacionarios). La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes, la polaridad puede ser notablemente diferente a la del líquido estacionario de modo que ambos sean inmiscibles. Por lo general, el más polar de los disolventes está incorporado sobre el soporte sólido y funciona como fase estacionaria; en la cromatografía de fase inversa, se utiliza una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar. Se utiliza con frecuencia la elusión en gradiente para mejorar la eficiencia de la separación. Empaque con fase ligada. Un tipo de empaque cuyo uso tiende a generalizarse para la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC o CLAR), consiste en partículas de gel de sílice puro sobre las cuales se ha unido a un grupo orgánico por ejemplo, se puede formar una superficie de hidrocarburo haciendo reaccionar el cloroctadecil silano con los grupos OH de la superficie del gel de sílice. Entre los grupos que han sido unidos al gel de sílice pueden mencionarse aminas alifáticas, ésteres, los nitratos y los hidrocarburos aromáticos. El comportamiento de la superficie de sílice unidas químicamente, resulta intermedio entre el de la superficie sólida en la cual se produce la adsorción y el de un líquido inmovilizado en el que existe un equilibrio líquido-líquido. Las superficies de este tipo ofrecen una considerable ventaja con respecto a los líquidos sostenidos sobre sólidos ya que la fase estacionaria no puede perder su líquido por la acción de la fase móvil. Por otra parte, las superficies tratadas químicamente tienen el defecto de una limitada capacidad de carga (Skoog y West, 1987).

Aplicaciones. La cromatografía de partición ha resultado un poderoso instrumento para la separación de sustancias estrechamente relacionadas. Ejemplos típicos son la resolución de los numerosos aminoácidos formados en la hidrólisis de una proteína, la separación y análisis de alcoholes alifáticos estrechamente relacionados y la separación de derivados de azúcares (Skoog y West, 1987).

2.3 Intercambio iónico

La resina de intercambio iónico se encuentran entre los empaques más utilizados para cromatografía en columna (Figura 3). El disolvente o fase móvil es por lo general una solución acuosa y las especies o analitos a separar son iones. Por tanto la cromatografía de intercambio iónico se aplica ampliamente para la separación de aminoácidos y otros ácidos y bases orgánicas. El intercambio iónico es un proceso en el cual ocurre un intercambio de iones de signo igual entre una solución y un sólido esencialmente insoluble en contacto con la solución. Muchas sustancias tanto naturales como sintéticas actúan como intercambiadores de iones. Entre las primeras se encuentran las arcillas y las zeolitas, las propiedades de intercambio de iones de estos materiales han sido reconocidas y estudiadas durante un siglo. Las resinas sintéticas de intercambio iónico fueron producidas por primera vez en 1935 y desde entonces han encontrado una gran aplicación en el laboratorio y la industria para ablandamiento de aguas (desionización del agua), purificación de soluciones y separación de iones. Las resinas sintéticas de intercambio iónico son polímeros de alto peso molecular que contienen gran número de grupos funcionales iónicos por molécula. Para el intercambio de cationes se puede escoger entre resinas ácidas fuertes que contienen grupos de ácido sulfónico ($\text{RSO}_3^- \text{H}^+$) y resinas ácidas débiles que contienen grupos de ácido carboxílico (RCOOH). Las primeras tienen aplicación más amplia. Las resinas de intercambio de aniones contienen grupos funcionales básicos adheridos a la molécula de polímero. Estos son generalmente aminas; los intercambiadores fuertes contienen aminas cuaternarias ($\text{RN}(\text{CH}_3)_3^+ \text{OH}^-$); y los básicos débiles contienen aminas secundarias o terciarias. Las resinas sintéticas de intercambio iónico han sido utilizadas exitosamente como fase estacionaria en la cromatografía de elución. Por ejemplo, Beukenkamp y Reiman citado por Skoog y West, 1987, separaron los iones sodio y potasio en una columna empacada con una resina sulfónica en su forma ácida. La cromatografía de intercambio iónico encuentra muchos usos en los analizadores automáticos para aminoácidos (Skoog y West, 1987).

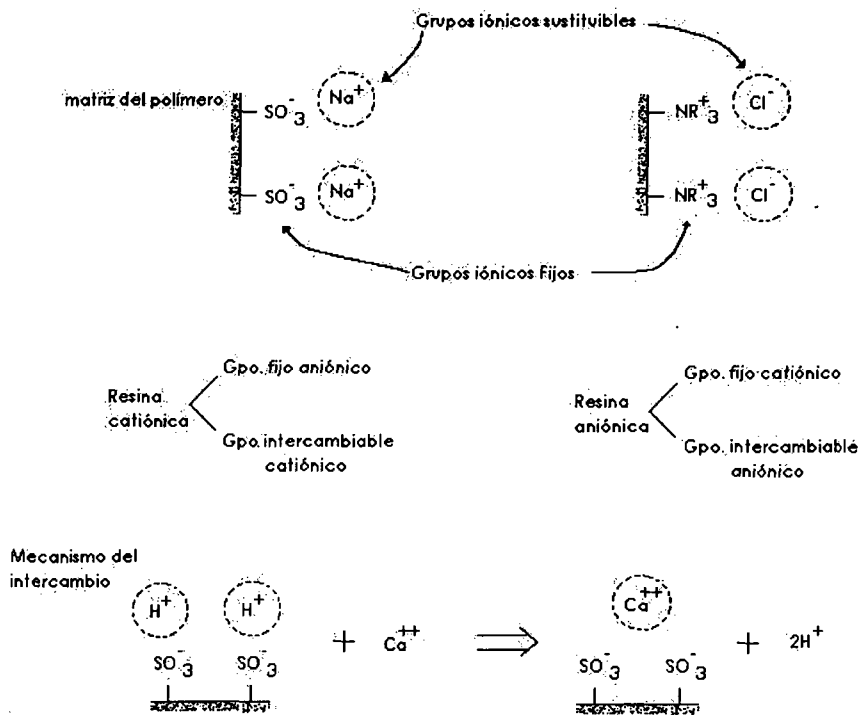


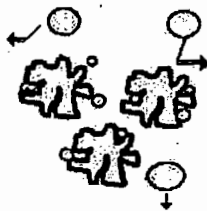
Figura 3. Algunos empaques de resina de intercambio iónico tienen grupos cargados negativamente y se utilizan para el intercambio con analitos catiónicos. Otros, diseñados para intercambiar analitos aniónicos, están provistos de grupos cargados positivamente (comúnmente son usados los grupos de tipo sulfonato) (Muñoz, 1981; Willard *et al.*, 1991).

2.4 Exclusión

La cromatografía de exclusión es una técnica en la que el fraccionamiento se basa, en el tamaño y la forma molecular de las especies de la muestra; se han dado varios nombres a este procedimiento, entre ellos cromatografía de permeación en gel, cromatografía de exclusión y cromatografía de tamizado molecular. En este caso, el retardo depende del grado con que las moléculas o iones de soluto puedan penetrar dentro de los poros del material de empaque, que es un gel muy poroso. Las moléculas o

iones mayores que los poros del gel son completamente excluidos, mientras que las especies menores pueden penetrar en estas regiones. Así, las moléculas mayores pasan rápidamente por la columna, mientras que las menores se retrasan en mayor o menor grado, según su tamaño, su forma y, a veces, su tendencia a ser absorbidas por el gel (Figura 4). Ordinariamente, la cromatografía en gel se efectúa en una columna y la fase estacionaria consiste en partículas esféricas de un polímero poroso que absorbe fácilmente agua (y en ciertos casos otros disolventes) y se expande a consecuencia de ello. El sólido resultante contiene un gran volumen de disolvente fijo en los intersticios de la red polimérica. El tamaño medio de los poros o intersticios resultantes se relaciona directamente con la cantidad de disolvente adsorbido; ésta, a su vez, es determinada por la cantidad de enlaces cruzados existentes en las moléculas de polímero. Uno de los polímeros más usados se prepara por entrecruzamiento de los polisacáridos dextrano y epíclorhidrina. Haciendo variar la cantidad de esta última, se obtiene una serie de resinas con diferentes tamaños de poro. Estos geles se venden con el nombre comercial de Sephadex. Otro grupo de resinas comerciales consiste en poli(acrilamida) entrecruzada con metilén-bis(acrilamida) (Skoog y West, 1987; Willard *et al.*, 1991).

Los geles muy entrecruzados con tamaño de poro pequeño, como el Sephadex G-25 y G-50, han encontrado amplia aplicación a la eliminación de moléculas de bajo peso molecular, de las moléculas de productos naturales de alto peso molecular, han resultado útiles también para el fraccionamiento de péptidos que tienen un tamaño intermedio y especies de bajo peso molecular. Los geles más porosos han encontrado una gran aplicación en el fraccionamiento y la purificación de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos. Por ejemplo, el Sephadex G-75 permite la separación de ribonucleasa, tripsina, peptina y citocromo o de proteínas de peso molecular más alto como algunas séricas, hemoglobina y fibrinógeno debe hacerse constar que la cromatografía en gel es usada para la estimación de pesos moleculares de moléculas grandes (Skoog y West, 1987).



EXCLUSIÓN

Figura 4. Representación de la separación cromatográfica por exclusión en donde se da una separación basada en el tamaño molecular en donde los analitos grandes no son retenidos y los analitos pequeños son retenidos por su difusión dentro de los poros de la fase estacionaria de tamaño adecuado (Peña, 2003).

2.5 Afinidad

La cromatografía de afinidad involucra la unión covalente de un compuesto bioquímico inmovilizado (llamado ligando de afinidad) a un soporte sólido. Cuando a través de la columna pasa una muestra, sólo se retienen aquellos solutos que selectivamente se unen al ligante complementario (Figura 5), los otros componentes de la muestra eluyen sin retención. Las separaciones explotan la unión de “cerradura y llave” que se presenta en los sistemas biológicos. Los analitos retenidos pueden eluirse de la columna cambiando las condiciones de la fase móvil, la fase estacionaria debe ser suficientemente hidrofílica para evitar uniones no específicas de los analitos, una matriz porosa permite un grado alto de sustitución de ligante y es más accesible a las moléculas más grandes, generalmente se emplean geles orgánicos como la agarosa en perlas, celulosa, dextrano, poliacrilamida y cuentas de vidrio microporosas. Los ligantes de afinidad pueden ser anticuerpos, inhibidores enzimáticos u otras moléculas que se unen reversible y selectivamente al analito de interés, los analitos retenidos pueden eluirse añadiendo exceso de ligante a la fase móvil o un compuesto que interfiera con las interacciones soluto (analito)-ligante. En la elución bioespecífica el modificador de la fase móvil (llamado inhibidor) es un ligante libre similar o idéntico al ligante de afinidad inmovilizado o al soluto. La elución no específica involucra la desnaturalización del ligante o del analito por medio del pH, los agentes caotrópicos

(tales como el KCN o urea), disolventes orgánicos o cambiando la fuerza iónica de la fase móvil (Willard *et al.*, 1991).

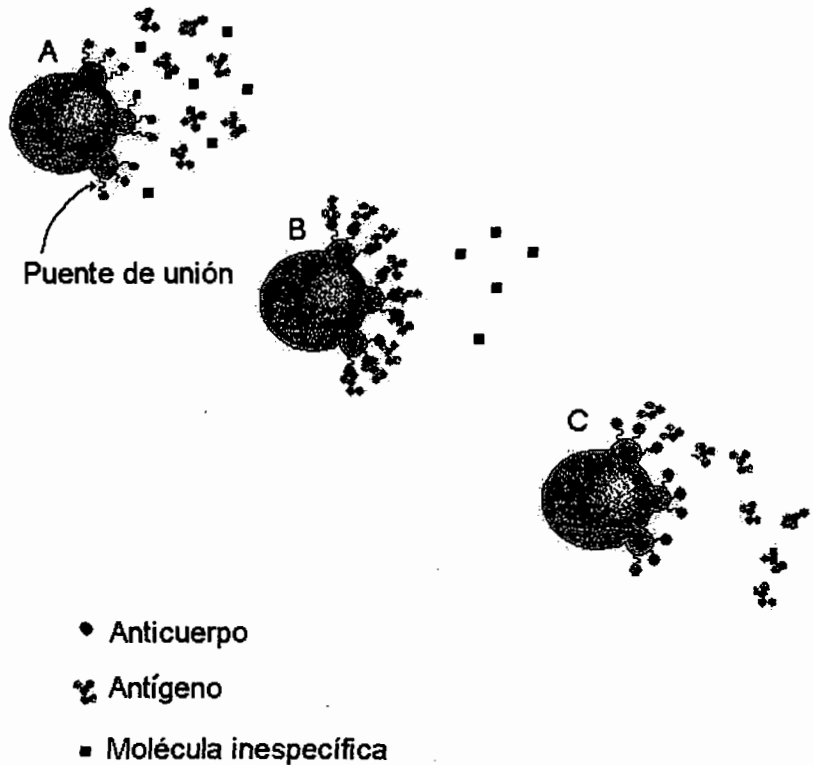


Figura 5. A) La cromatografía de afinidad involucra la unión covalente de un compuesto bioquímico inmovilizado llamado ligando de afinidad, a un soporte sólido. B) Cuando la muestra esta en contacto con la fase estacionaria, solo se retienen aquellos solutos que selectivamente se unen al ligante complementario “cerradura y llave” como en los sistemas biológicos, los otros componentes de la muestra migran sin retención. C) Los solutos retenidos pueden eluirse cambiando las condiciones de la fase móvil.(www.Biotech.Pharmacia.se; Willard *et al.*, 1991).

3. Cromatografía en columna

En la cromatografía, una porción de la muestra disuelta en la fase móvil se introduce en la parte superior de una columna después de lo cual los componentes de la muestra se distribuyen entre ambas fases. El proceso por el cual el soluto es lavado o separado de la columna añadiéndole nuevo disolvente se llama elución (Figura 6). La fase móvil (el eluyente) hace avanzar hacia la parte baja de la columna al disolvente que contiene una parte de la muestra, donde se produce un nuevo proceso de partición entre la fase móvil y las porciones que va encontrando en la fase estacionaria. Simultáneamente, sucede una separación mientras el disolvente desplaza a las moléculas del soluto a lo largo de la columna, mediante una serie de transiciones que se dan entre las fases móvil y estacionaria. Debido a que el movimiento del soluto o analito puede tener lugar sólo en la fase móvil, la velocidad media a la que migra el soluto, depende de la fracción de tiempo en el que permanece en esta fase. Por otro lado, dependiendo del grado de partición de un soluto; a mayor retención en la fase estacionaria, menor la velocidad de migración y elución; y a menor retención en la misma fase, mayor velocidad de migración y elución. En condiciones de una mezcla los solutos se separan en bandas localizadas a lo largo de la columna (Figura 7; Freiferlder, 1991; Fischer y Peters, 1970).

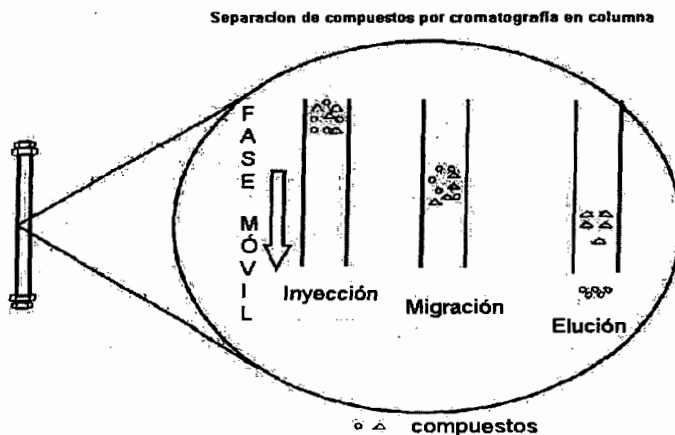


Figura 6. Elución. En esta figura se representan dos compuestos diferentes los cuales se inyectan a la columna y por medio de la adición de la fase móvil se da la migración y se da el proceso de elución: proceso por el cual el soluto es lavado en la columna añadiendo nuevo disolvente (Waters, 2002).

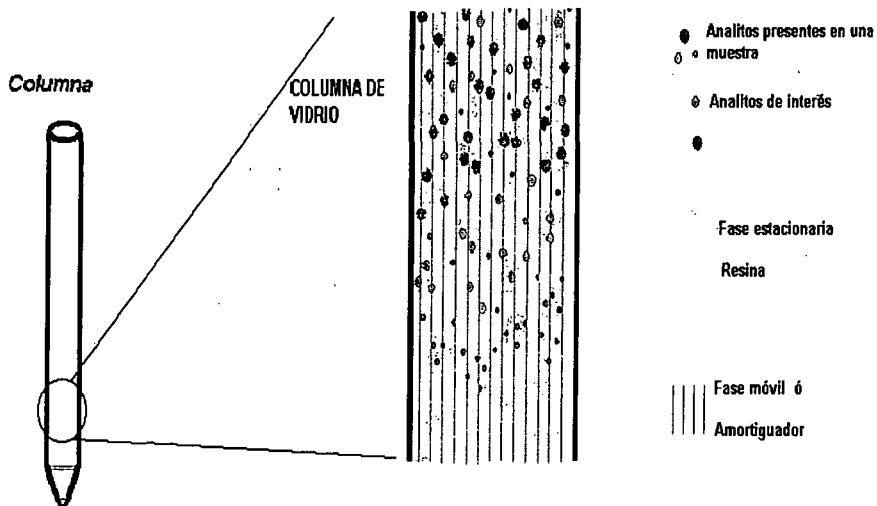


Figura 7. Representación esquemática de los elementos de una cromatografía en columna, donde se ilustra la muestra interaccionando con los componentes de la fase estacionaria por medio de la fase móvil. Nótese el equilibrio que alcanzan los componentes de la muestra con las esferas de la resina (de intercambio iónico).

Si se coloca a la salida de la columna un detector que permita identificar a los solutos como una función de tiempo se representa gráficamente su señal mediante un integrador obteniendo una serie de picos, dicha representación se llama cromatograma y permite el análisis cualitativo y cuantitativo de los componentes de la muestra. La posición de los picos, con respecto al tiempo (Figura 8), sirve para identificar los componentes de la

muestra y las áreas de los picos pueden relacionarse con la concentración (Skoog y West, 1982).

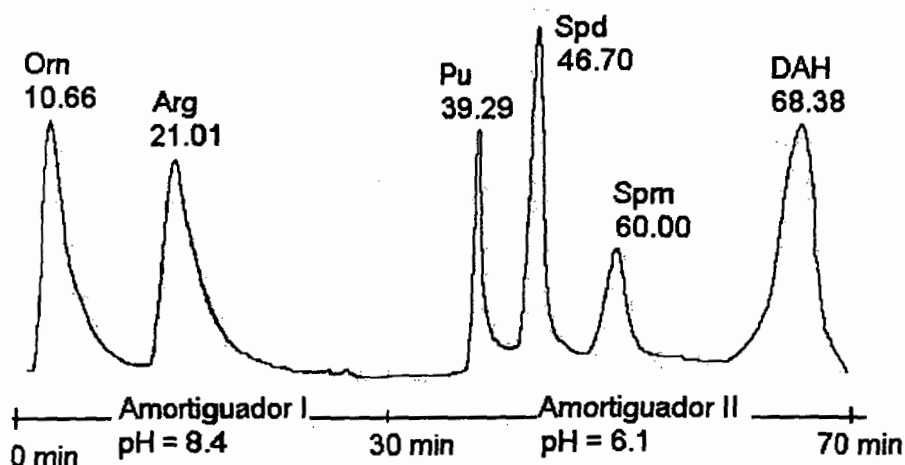


Figura 8. Ejemplo de cromatograma del análisis de las PAs y sus aminoácidos precursores ornitina y arginina, así como el pico correspondiente al estándar interno (DAH*). Se anotaron las soluciones amortiguadoras empleadas y pH, respectivamente; y su tiempo de retención para cada molécula.

*1-7, Diaminoheptano.

La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC o CLAR; Figura 9), no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra, es capaz de separar macro-moléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de grupos polifuncionales de alto peso molecular. Con una fase móvil líquida interactiva, otro parámetro se encuentra disponible para la selectividad, en adición a una fase estacionaria activa. La separación cromatográfica tipo HPLC es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra con ambas fases, móvil y estacionaria, ofreciendo una gran variedad de fases estacionarias lo que permite una mayor gama de estas interacciones selectivas y más posibilidades para la separación del analito de interés en un tiempo relativamente corto (Willard *et al.*, 1991).

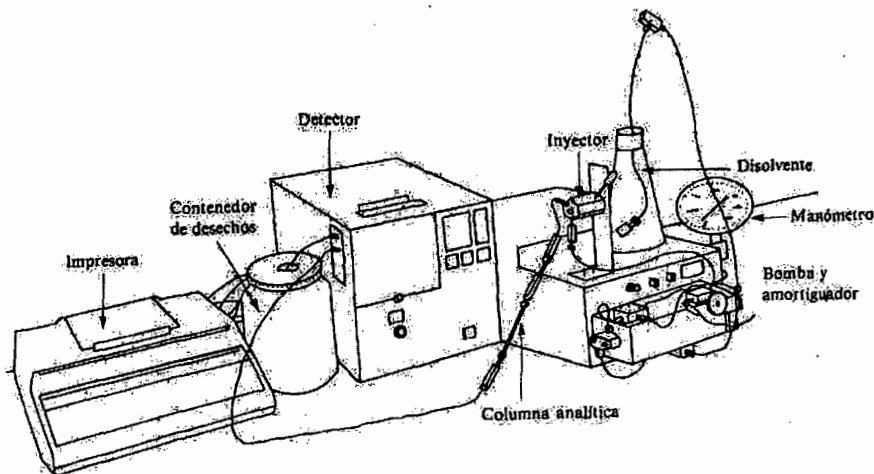


Figura 9. Instrumentación general para HPLC (Willard *et al.*, 1991).

4. Cromatografía plana

Por otro lado en la cromatografía plana, la separación se produce sobre una película de un sólido finamente dividido que se ha fijado sobre una superficie plana. Una hoja o tira de papel de filtro grueso sirve como medio de separación en la cromatografía en papel. La cromatografía en capa fina fue desarrollada al final de 1950 y se ha transformado en el más importante de los métodos de cromatografía plana. El método de cromatografía de capa fina, permite una cuantificación razonable aunque “no con gran precisión” de la concentración de los componentes de una mezcla. El equilibrio en el cual se basa la cromatografía plana es en la mayoría de los casos del tipo líquido-líquido, aunque también existen interacciones de tipo líquido-sólido y de intercambio iónico. Los principios generales desarrollados inicialmente para la cromatografía en columna, resultan aplicables por igual al papel y a los soportes en capa delgada. Dentro de estos medios existe una transferencia repetida de soluto entre la fase estacionaria y la fase móvil (Skoog y West, 1987).

4.1 Cromatografía en capa fina.

La fase estacionaria son absorbentes sólidos (o en algunos casos adsorbentes) en la cromatografía de capa fina, desde el punto de vista de su composición química y del tamaño de la partícula, son semejantes a los de cromatografía en columna. La fase estacionaria que más se utiliza es el gel de sílice, que funciona como soporte para el agua u otros disolventes polares en las separaciones líquido-líquido. Sin embargo, si se seca en un horno la capa de gel de sílice después de preparada, ésta pierde la mayor parte de la humedad y su superficie resulta predominantemente sólida de modo que sirve como adsorbente para separaciones sólido-líquido. En esta última modalidad se debe evitar exponer la superficie a la atmósfera, ya que la adsorción de agua a partir de la humedad del aire se produce en unos pocos minutos; en este caso, la superficie vuelve a ser un soporte para un líquido. También se han utilizado como fase estacionaria en la cromatografía de capa fina, resinas de intercambio iónico y geles de Sephadex. Se puede lograr una estimación semicuantitativa de la cantidad presente de un componente comparando el área de una mancha con la de un estándar. Se puede obtener mejores datos rascando la mancha de la placa, extrayendo el analito (la muestra) de la fase sólida y midiendo su concentración por medio de un método químico o físico adecuado. Finalmente, es posible utilizar un densitómetro de barrido para medir la radiación emitida por una mancha, ya sea por fluorescencia o reflexión (Flaschka *et al.*, 1980).

4.2 Cromatografía en papel.

Las separaciones por cromatografía en papel se realizan de la misma forma que las separaciones en capa fina. Por lo general, se utilizan papeles especiales de elevada pureza y con características reproducibles en cuanto a porosidad y grosor. Estos papeles contienen suficiente agua adsorbida, de modo que la cromatografía en papel se puede clasificar como una cromatografía de tipo líquido-líquido. Sin embargo, es posible hacer que otros líquidos desplacen el agua, proporcionando un tipo diferente de fase estacionaria. Por ejemplo, el papel tratado con silicona o vaselina permite realizar la cromatografía en papel de fase inversa, en la cual la fase móvil es un disolvente polar, existiendo también papeles con un adsorbente o una resina de intercambio iónico y de

esta forma permiten realizar la cromatografía en papel de adsorción o de intercambio iónico (Skoog y West, 1987).

4.3 Electroforesis y electrocromatografía.

Se define la electroforesis como la migración de partículas por una solución bajo la influencia de un campo eléctrico. Históricamente, las partículas comprendidas en esta definición eran coloidales y debían su carga a iones adsorbidos. El término electroforesis se aplica actualmente a la migración de iones individuales y de agregados coloidales, proporcionando un poderoso medio de fraccionamiento de los componentes de una mezcla, sean agregados o monodispersados (Dabrio *et al.*, 2000). Los métodos electroforéticos se dividen en dos categorías, que dependen de si la separación se efectúa en ausencia o en presencia de un medio de sostén o estabilizador. Los métodos electrocromatográficos son indispensables para el fraccionamiento de un número asombroso de materiales biológicos, una de las más aplicadas es el diagnóstico clínico para la separación de proteínas y otras macromoléculas del suero, orina, líquido cefalorraquídeo, jugo gástrico y otros líquidos corporales. La electrocromatografía también ha sido aplicada para el fraccionamiento de ácidos nucleicos y también, de moléculas más pequeñas, como alcaloides, antibióticos, vitaminas, pigmentos naturales, esteroides, aminoácidos, carbohidratos y ácidos orgánicos, así como para separación de iones inorgánicos (Skoog y West, 1987; Dabrio *et al.*, 2000).

5. Teorías cromatográficas

5.1 Teoría de los platos.

La teoría original de la cromatografía, llamada teoría de los platos, que describe las velocidades de la migración en forma cuantitativa de aquellos componentes o solutos de una muestra, fue desarrollada originalmente por Martín y Synge (1941) citado por Skoog y West 1982, considera que una columna cromatográfica está compuesta por una serie de estrechas capas horizontales, contiguas y separadas, denominadas platos teóricos. Se supone que en cada plato tiene lugar el equilibrio del soluto entre la fase

móvil y la fase estacionaria. El movimiento del soluto y del disolvente, se considera entonces como una serie de transferencias sucesivas de un plato al siguiente. La eficiencia de una columna cromatográfica como dispositivo de separación mejora a medida que aumenta el número de equilibrios o platos teóricos. Sin embargo, su utilidad resulta limitada porque no logra describir los efectos de las numerosas variables que dan lugar al ensanchamiento de las zonas o "platos" dentro de la columna y que podrían ser representados por los picos de un cromatograma específico. Como consecuencia, la teoría de los platos es sustituida en la actualidad por la teoría cinética, que puede describir estas variables (Skoog y West, 1982).

5.2 Teoría cinética de la cromatografía

La teoría cinética de la cromatografía describe con éxito los efectos de las variables que afectan al ancho de un pico de elución además del momento de su aparición en el extremo de una columna. Los picos cromatográficos se ensanchan por lo general, debido a tres procesos bajo control cinético: la difusión en remolino, la difusión longitudinal y la transferencia de masa fuera del equilibrio. Las magnitudes de estos efectos están determinadas por variables controlables tales como la velocidad de flujo, el tamaño de partícula del material de empaque, las velocidades de difusión y grosor de la fase estacionaria. La difusión en remolino, se debe a la gran cantidad de trayectorias que puede encontrar una molécula en su camino a través del empaque de una columna. El efecto de la difusión longitudinal, se debe a la tendencia de las moléculas a migrar desde la porción central concentrada de una banda, hacia las regiones más diluidas a ambos lados de ella. Este tipo de difusión que puede ocurrir tanto en la fase móvil como en la fase estacionaria, produce un ensanchamiento adicional de las bandas. La difusión longitudinal es más importante cuando la fase móvil es un gas debido a que las velocidades de difusión en la fase gaseosa, son varios órdenes de magnitud mayores que en los líquidos. El grado de la magnitud de la difusión aumenta con el tiempo. En consecuencia, el grado de ensanchamiento aumenta a medida que disminuye la velocidad de flujo. La transferencia de masa fuera del equilibrio hace que las bandas cromatográficas se ensanchen también debido a que el flujo de la fase móvil es por lo

general tan rápido que no se puede alcanzar un verdadero equilibrio entre las fases. Por ejemplo, al frente de la zona donde la fase móvil encuentra la fase estacionaria nueva, no se logra el equilibrio en forma instantánea y el soluto se transporta entonces un poco más abajo en la columna de lo que se debería esperar bajo verdaderas condiciones de equilibrio. De la misma forma, al final de la zona, los solutos de la fase estacionaria, encuentran una fase móvil nueva. Nuevamente, la velocidad de transferencia de las moléculas del soluto no es instantánea; entonces, la cola de la zona se estira más de lo que ocurriría si el tiempo fuese suficiente para lograr el equilibrio. El efecto neto, es un ensanchamiento de la banda del soluto en ambos extremos (Skoog y West, 1987; Figura 10).

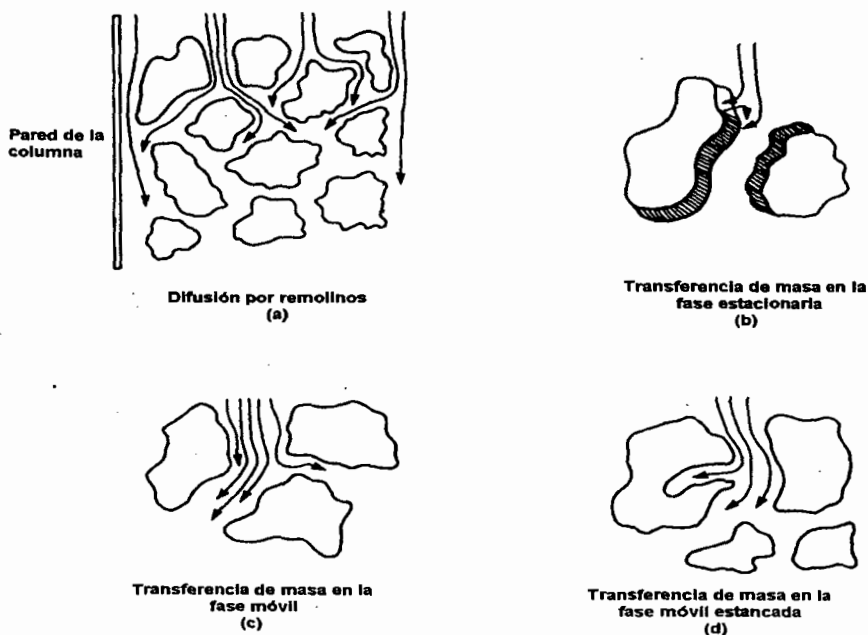


Figura 10. La difusión por remolino a) es el resultado de la discontinuidad en las velocidades de flujo y en la longitud de los caminos alrededor de las partículas del empaque; b) es el resultado de la resistencia a la transferencia de masa del soluto en la intercara de la fase estacionaria; c) representa la resistencia de masa radialmente entre líneas de corriente de fase móvil adyacentes; y d) las moléculas de soluto se mueven por difusión hacia dentro (Willard *et al.* 1991).

6. Análisis por cromatografía

La cromatografía se ha desarrollado como el principal método de separación e identificación cualitativa y cuantitativa de especies químicas estrechamente relacionadas (Dabrio *et al.*, 2000).

6.1 Análisis cualitativo

Un cromatograma proporciona una pieza única de información cualitativa acerca de cada especie de analito en una muestra compleja, es decir, su tiempo de retención (o su posición) en la fase estacionaria después de un cierto periodo de migración y posteriormente la elusión a través de la columna. Por ejemplo, se puede comprobar la presencia o ausencia de 30 o más aminoácidos en un hidrolizado proteínico con un grado de certeza grande en base a las posiciones relativas de estas especies después de separarlas sobre una placa de cromatografía en capa fina (Skoog y West, 1982). Es importante agregar que la identificación espectroscópica positiva, es por lo general imposible sobre una muestra tan compleja como la precedente sin una separación cromatográfica preliminar. De esta forma, la cromatografía es un precursor esencial de los análisis espectroscópicos cualitativos (Skoog y West, 1987; Dabrio *et al.*, 2000).

6.2 Análisis cuantitativo

La cromatografía proporciona información cuantitativa valiosa acerca de las especies químicas separadas. La cromatografía cuantitativa se basa en una comparación ya sea de la altura o del área de los picos cromatográficos producidos por los analitos separados con los picos que presentan los estándares adquiridos comercialmente. Si las condiciones están perfectamente controladas los parámetros varían linealmente con la concentración (Skoog y West, 1987; Dabrio *et al.*, 2000).

6.2.1 Análisis basados en la altura y área de los picos.

La altura de un pico cromatográfico se obtiene conectando la línea de una recta trazada en la base del pico y midiendo la distancia perpendicular entre esta línea y el pico. Esta medida puede tomarse con una precisión razonablemente grande y

proporciona buenos resultados siempre y cuando las variaciones en las condiciones de la columna no alteren el ancho de los picos durante el periodo necesario para obtener los cromatogramas de la muestra y los estándares. Las variables que se deben controlar cuidadosamente son la temperatura de la columna, la velocidad de flujo del eluyente y la velocidad de inyección de la muestra. Además es necesario tener cuidado en evitar la sobrecarga de la columna. El efecto de la velocidad de inyección de la muestra es particularmente crítico, si no se cuenta con un dosificador, para los picos iniciales de un cromatograma, esto podría representar errores relativos de 5 a 10 %. Las áreas de los picos constituyen un parámetro analítico mucho más satisfactorio que sus alturas. Muchos instrumentos cromatográficos modernos, están equipados con integradores de esfera y disco o integradores electrónicos que permiten una estimación precisa del área de los picos. Cuando no se dispone de este tipo de equipos se logra obtener el dato con la fórmula matemática para calcular el área de un triángulo recto $[(base)(altura)/2]$. Otro método consiste en usar un planímetro o recortar el pico y establecer su peso en relación con el de una superficie conocida (por medio de estándares) del papel de registro (Skoog y West, 1987; Dabrio *et al.*, 2000).

7. Calibración con estándares

Un método más directo para los análisis cromatográficos cuantitativos, consiste en la preparación de una serie de soluciones estándar cuya composición se aproxima a la del problema. Se realizan los cromatogramas para los estándares, en donde se observa las alturas de las áreas de los picos en función de la concentración (Skoog y West, 1987; Katime *et al.*, 1998).

7.1 El método del estándar interno

En cromatografía cuantitativa, se obtiene mayor precisión cuando se utiliza un estándar interno inyectado con la muestra, debido a que en esta forma se evitan las incertidumbres causadas por la inyección de la muestra. Cuando se utiliza un estándar

interno adecuado se logran precisiones relativas de 0.5 a 1 %. Para determinar que estándar interno se debe utilizar, es necesario tomar en cuenta los siguientes aspectos:

- Que el pico del estándar interno esté separado de los picos de la muestra y sin traslaparse
- Poner suficiente y que eluya cerca de los picos de la muestra
- Que no esté presente en la muestra de interés
- Que presente un área similar a los analitos de interés
- Que presente estabilidad
- Que no reaccione químicamente con los analitos

Para realizar este procedimiento se mezcla una cantidad definida y cuidadosamente medida de una sustancia de interés y pura (estándares), comercialmente adquirida, que actúa como referencia en las soluciones estándar que se usan para la calibración y se utiliza para calcular el "Factor de Respuesta" relacionando el cociente de las áreas de los picos con respecto a las concentraciones del estándar del analito con los del estándar interno

$$FR = ([CM]/AE)(A_{EI}/[EI])$$

FR = Factor de respuesta del analito

[CM] = Concentración del estándar del analito

AE = Área del pico de la muestra (estándares: Pu, Spd, Spm)

A_{EI} = Área del pico del estándar interno

[EI] = Concentración del estándar interno

Posteriormente, para determinar la concentración del analito de interés en una muestra, se realiza el siguiente cálculo que consiste en usar el cociente de la concentración conocida del estándar interno entre la cantidad de muestra inyectada y el factor de respuesta obtenido con la ecuación anterior multiplicando a las áreas del analito y del estándar interno inyectado en la muestra de análisis. También se utiliza el Factor de Respuesta del estándar interno que por definición es 1 y la ecuación para determinar la concentración de la muestra es la siguiente

$$[\text{muestra}] = ([E.I.M/M])(FR)(AM)/(RF_{E.I.})(AE.I.M) (100)$$

$E.I.M$ = Concentración del estándar interno adicionado a la muestra, misma unidad para ambos.

M = Cantidad de material de muestra medida.

FR = Factor de respuesta del analito determinado por calibración.

AM = Área del pico de la muestra en la corrida del análisis.

$RF_{E.I.}$ = Por definición el factor de respuesta del estándar interno es 1.

$AE.I.M$ = El área del pico del estándar interno en la corrida de análisis.

100 = Solo si se quiere usar como multiplicador, que puede ser usado como factor de conversión.

(Spectra Physics 4200, 1982).

8. La validación

Para la aplicación con seguridad de un método cromatográfico es necesario tener control en cada aspecto que compone el sistema analítico por consiguiente se requiere de una validación la cual al aplicarla otorga certeza (Krull y Swart, 1997).

La validación es una serie de procedimientos que utilizan los laboratorios para acreditar un método analítico con exactitud, precisión, especificidad, reproducibilidad linealidad, límite de cuantificación, límite de detección y robustez con un intervalo de seguridad para un analito de interés. La validación es necesaria para confirmar y documentar los resultados producidos por cualquier técnica analítica. El proceso total del diseño se lleva a cabo con formatos existentes o normas que guían el desarrollo, optimización y validación de dichos métodos. Las normas proveen una guía para evitar discusiones y confusiones acerca de la confiabilidad de nuevos métodos, siguiendo el desarrollo del procedimiento para que sea correcto y posteriormente asumir su validación. Esto representa un adelanto importante en la ciencia por que nuevos métodos "completos" y una adecuada validación pueden ser introducidos en la literatura. Para la farmacopea de los Estados Unidos (USP) (Krull y Swartz, 1997) el método de validación provee una seguridad o integridad durante el uso normal del método y es definido como "el proceso que provee evidencia documentada de un método que se intenta realizar". Los laboratorios

deben acreditar la validación regularmente para cumplir con las agencias de gobierno u otros organismos reguladores, por ejemplo, la norma de sometimiento para muestras, pruebas y datos analíticos para métodos de validación y la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los EUA indica una lista de especificaciones.

Los parámetros del método de validación son nombrados a continuación:

- Exactitud
- Sensibilidad
- -Límite de detección (LOD)
- -Límite de cuantificación (LOQ)
- Reproducibilidad
- Linealidad
- Precisión
- Especificidad
- Robustez

Aunque estos términos son familiares y usados diariamente pueden ser utilizados de diferente forma, por consiguiente, se definirá a continuación la terminología del método de validación (Krull y Swartz, 1997).

8.1 Exactitud

La exactitud, se define como la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el resultado de la frecuencia al analizar muestras a las que se les ha adicionado el analito de interés (estándar) en concentraciones conocidas y se expresa como el porcentaje de recuperación del analito, también puede ser descrita como la aproximación entre un valor obtenido con otro que es verdadero o aceptado, también es conocida como error sistemático o tendencia (Delgado, 1998). Para el ensayo o prueba de una sustancia se obtiene también exactitud por comparación de un método ya conocido.

Para documentar la exactitud, la norma acordada en la Conferencia Internacional sobre la Armonización por sus siglas en inglés ICH (Krull y Swartz, 1997), de requerimientos técnicos para el registro de fármacos de uso humano, recomienda coleccionar datos de por lo menos nueve determinaciones en un mínimo de tres concentraciones, cubriendo el intervalo específico. Por ejemplo, tres concentraciones y tres replicas de cada una. Los datos deberán ser reportados como el % de recuperación del analito conocido o como la diferencia entre el valor más bajo del porcentaje recuperado y el verdadero con intervalo

de confianza aceptable (ver ejemplo más adelante), una figura es comúnmente usada como ilustración gráfica de exactitud para diferenciarla de la precisión (Figura 11).

Matemáticamente se puede expresar como:

$$\text{Desviación: } B = \bar{A} - \check{A}$$

$$\text{Desviación Relativa: } B \% = B / \bar{A} (100)$$

$$\text{Recuperación: } R = \bar{A} / \check{A} (100)$$

Donde \bar{A} es el valor promedio y \check{A} es el valor verdadero o aceptado.

De estas expresiones la más utilizada es la de recuperación y aunque el valor verdadero de concentración es solo una estimación, se prepara una muestra con un procedimiento más exacto que el evaluado ya sea por pesada o por dilución en peso, etc. para utilizarse como referencia.

Ejemplo de la determinación de Exactitud

Se preparan tres muestras con el 80, 100 y 120 % de la concentración estimada del analito en la muestra de interés y se analiza cada una por triplicado.

Cuadro1. Ejemplo de la determinación de exactitud.

% agregado	% encontrado			% recuperación		
80	78.5	78.3	76.0	98.1	97.9	95.0
100	101.1	101.3	98.4	101.1	101.3	98.4
120	119.2	119.5	118.8	99.3	99.6	99.0
				R (n=9):	98.9%	
				S:	1.88	
				RSD:	1.90	

RDS= desviación estándar relativa

Donde la recuperación media (R), para n = 9, es 98.9 %, $t_{tablas}(v:8;\alpha:0.05)=2.306$ y t_{ob} se calcula como: $t_{ob} = |100 - R| \sqrt{n} / RSD = (100 - 98.9) 3 / 1.90 = 1.74$

Como $t_{ob} < t_{tablas}$ ($1.74 < 2.036$) entonces no hay diferencias significativas entre la recuperación media y 100.

t_{ob} o "t" experimental se determina por la prueba de t de Student y se compara con el "t" de tablas para n-1 grados de libertad en el nivel de confianza, generalmente $p = 0.05$. Su valor se calcula como sigue

$$t_{ob} = \frac{\bar{A} - \bar{A}}{S} \sqrt{n}$$

Si t_{ob} es menor que el valor en las tablas, el método tiene la exactitud requerida para ese (intervalo) ámbito de confianza, pero si t_{ob} es mayor que el valor tabulado, el método tiene un error sistemático.

Otro diseño muy utilizado, usa al menos 3 concentraciones de la muestra y preparadas por triplicado, comprendidas dentro del rango de linealidad del sistema. En este caso el valor de t se calcula como:

$$t_{ob} = \frac{|100 - R| \sqrt{n}}{RSD}$$

Donde R es el porcentaje de recuperación.

Los valores de t_{ob} se comparan con los tabulados para el intervalo de confianza requerido con n-1 grados de libertad y exactitud o inexactitud se evalúan para el promedio de recuperaciones de todas las concentraciones. Si $t_{ob} < t_{tablas}$, no existe diferencia significativa con 100% de recuperación y la exactitud es apropiada (Krull y Swartz, 1997).

8.2 Precisión

En la **precisión** se mide el grado de repetibilidad de un método analítico bajo operación normal y usualmente es expresado como el porcentaje relativo de la desviación estándar (% RDE) por una significancia estadística del número de muestras. Según la ICH, la precisión podría ser medida en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La **repetibilidad** abarca el resultado del método operando durante un intervalo de tiempo corto bajo las mismas condiciones (precisión entre ensayos). Podría ser determinado de un mínimo de nueve determinaciones cubriendo el intervalo especificado del procedimiento (por ejemplo, tres niveles, tres repeticiones) o de un mínimo de seis determinaciones al 100% de concentración del blanco de la prueba (Krull y Swartz, 1997; Manríquez, 1993). La **precisión intermedia** es la comparación de los resultados en diferentes días. La **reproducibilidad**, se refiere a la colaboración entre laboratorios comparando los resultados de sus estudios. Para documentar y dar soporte de los estudios de precisión se podría incluir la desviación estándar, coeficiente de variación y el intervalo de confianza.

En el caso de muestras escasas que no permiten efectuar más de 2 ó 3 determinaciones, la estimación de la desviación estándar sería incierta (Willard *et al.*, 1991).

Puede recurrirse a un “estimador agrupado”, donde se efectúan mediciones por duplicado o triplicado en diferentes muestras y se calcula la desviación estándar como:

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-g} \sum_{j=1}^g \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X}_j)^2}$$

Siendo “N” el número total de determinaciones, “g” el número de muestras y “n” el número de determinaciones sobre cada muestra.

En este caso, debe tenerse en cuenta que “s” varía con la concentración, de modo que, de ser muy diferentes, deberán agruparse por rangos bajo, medio y alto y no deberán agruparse valores de “s” muy disímiles.

La precisión de un método deberá estudiarse sobre:

- (a) el sistema, evaluando la dispersión de al menos 6 inyecciones del estándar.
- (b) el método, evaluando la dispersión de varias preparaciones de la muestra final homogénea. La evaluación corresponde a todo el procedimiento, desde la preparación

de la muestra hasta la medición del analito por parte del instrumento. Así por ejemplo, resulta necesario considerar la imprecisión causada por las diluciones, un factor frecuentemente olvidado (Willard *et al.*, 1991; Krull y Swartz, 1997).

La precisión debe medirse en condiciones repetitivas (mismo analista, mismo día, mismo instrumento y mismo laboratorio) y en condiciones reproducibles (diferente analista, diferente día, diferente instrumento y diferente laboratorio). El cociente repetibilidad/reproducibilidad es un parámetro muy útil para evaluar la precisión de un método analítico. Su valor, según estudios realizados por la Association of Analytical Communities (AOAC) o Asociación de Comunidades Analíticas está normalmente comprendido entre 1.5 y 2. Valores mayores de 2 pueden indicar un método "muy personal", mientras un valor menor de 1.5 indica pobre repetibilidad de algún analista en una serie de mediciones (Krull y Swartz, 1997). El criterio de aceptación puede ser variable y estará dictado por los objetivos buscados. Así, la USP indica en general una RSD del sistema de no más de 2%, inyectando 5 veces una solución estándar, aunque pueden obtenerse en condiciones apropiadas valores inferiores al 1% e incluso menores (Krull y Swartz, 1997).

Existen tablas que relacionan la RSD máxima aceptable para un método analítico en función de los límites de aceptación y del número de réplicas (Cuadro 2). Por ejemplo, para un intervalo de aceptación de 95-105%, para efectuar una determinación por duplicado, la RSD deberá ser menor de 2.7%. Por otra parte, la magnitud porcentual o la masa relativa del analito y la complejidad de la matriz resulta también de importancia y para el análisis de trazas o para el ensayo de una droga en fluidos biológicos puede no ser posible la precisión indicada, resultando apropiadas RSD de 5 % a 10 % o mayores.

Cuadro 2. Criterios de aceptación para precisión.

Límite de Aceptación	Simple		Duplicado	
	RSD METODO	RSD SISTEMA	RSD METODO	RSD SISTEMA
98.5-101.5	0.6	0.4	0.8	0.6
97-103	1.2	0.8	1.6	1.2
95-105	1.9	1.4	2.7	1.9
93-107	2.7	1.9	3.8	2.7
90-110	3.9	2.8	5.5	3.9

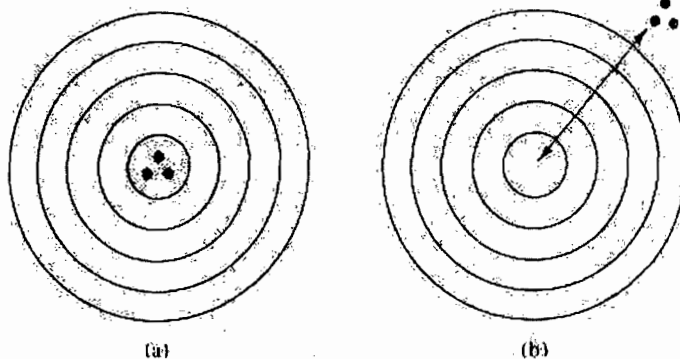


Figura 11. Esquema que ejemplifica con un tiro al blanco la diferencia entre exactitud y precisión: (a) impactos de disparo sobre un blanco, exactos y precisos. (b) impactos precisos solamente, sin exactitud (Willard *et al.*, 1991).

8.3 Especificidad

La especificidad, según la USP, es la habilidad para medir el analito de interés exactamente y específicamente en la presencia de otros componentes en la muestra. La especificidad es una medida del grado de interferencia de otro ingrediente activo en la muestra, excipientes de impurezas y degradación de productos. Un pico de respuesta es el

resultado de un componente particular solamente. La especificidad es medida y documentada en una separación por la resolución, conteo de platos (eficiencia) y factor extremo. La especificidad también puede ser evaluada con modernos detectores con un arreglo de fotodiodos comparando el espectro del pico de respuesta en un cromatógrafo (Krull y Swartz, 1997). La ICH también usa el término especificidad dividiéndolo en dos categorías: identificación y prueba ensayo de impurezas. En la categoría de identificación, la ICH define especificidad como la habilidad para discriminar entre compuestos con estructuras similares o realizando la comparación del resultado con la referencia de un material conocido, estos pueden ser otros ingredientes activos o impurezas. El termino especificidad y selectividad (Figura 12) con frecuencia son usados indistintamente; pero especificidad generalmente denota al método que responde a un simple analito y selectividad describe un método que provee una respuesta para un número de analitos (Krull y Swartz, 1997).

En muchos casos la especificidad no puede seguir modelos muy sistemáticos y depende del arte e ingenio del analista, tomando como referencias:

- 1.-Tiempo de retención. Sirve como primera base para la identificación del pico, pero esto a veces no resulta suficiente. En el caso de disponer de estándares, la coinyección de éstos y la comparación cuidadosa de los cromatogramas resultantes (observando la posible aparición de ensanchamientos de bandas de hombros, si es posible por derivación de la señal), puede servir como primera aproximación.
- 2.- La modificación de las condiciones cromatográficas (proporción de solventes o modificadores, pH, etc.) y la observación de los resultados complementan el ensayo anterior.
- 3.- La caracterización espectral, por empleo de detectores de arreglo de fotodiodos o el barrido espectrofotométrico a caudal detenido o el empleo de cocientes de absorbancia, brindan apoyo adicional.
- 4.- Pueden emplearse detectores de mayor selectividad (y en general mayor sensibilidad), como los de radiactividad, los de fluorescencia (ya sea haciendo uso de la fluorescencia nativa de algunos compuestos o por reacciones de derivatización para la formación de compuestos fluorescentes) o los de detección electroquímica empleados para la oxidación

o la reducción. Todos estos detectores permiten suponer la presencia de ciertos grupos funcionales en la molécula del analito.

5.- El empleo de técnicas enzimáticas para la transformación del analito, consistentes en la incubación del fluido en presencia de la enzima apropiada, en condiciones adecuadas de temperatura y de pH; y la inyección del producto para comprobar la reducción o desaparición del sustrato pueden brindar un gran apoyo, debido a la selectividad propia de la enzima.

6.- Las reacciones degradativas (oxidación, reducción, fotólisis, etc.) empleadas para comprobar la disminución o desaparición de la señal del analito en el cromatograma pueden apoyar la hipótesis de la presencia de un compuesto con determinados grupos funcionales en el pico a evaluar.

7.- Finalmente, existen técnicas complementarias, consistentes en el aislamiento de la fracción correspondiente al analito y la aplicación de técnicas espectroscópicas, o bien, sistemas de acoplamiento directo: Cromatografía con Infrarrojo (C-IR), Cromatografía con Espectrometría de Masas (C-MS), etc. (Krull y Swartz, 1997; Manríquez, 1993).

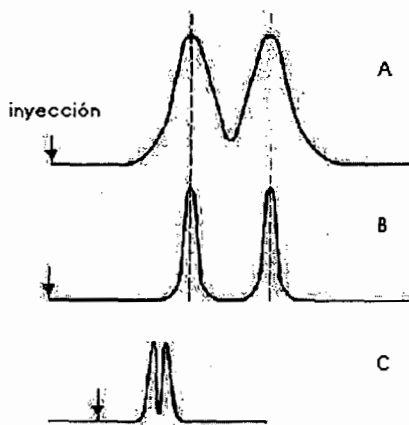


Figura 12. Comparación de la separación de un analito en cromatogramas tomando en cuenta la selectividad, eficiencia y razón de reparto (o repartición), en donde se observa que A) tiene selectividad adecuada pero eficiencia baja, B) buena eficiencia y selectividad y C) buena eficiencia pero poca selectividad (Willard *et al.*, 1991).

8.4 Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico se interpreta como la mínima cantidad de muestra que puede producir un resultado significativo (Cuadro 3). Existen dos tipos de sensibilidad:

1. Sensibilidad de calibración: que corresponde a la pendiente de la curva de calibración.
2. Sensibilidad analítica: correspondiente al cociente entre la sensibilidad de calibración y la desviación estándar de la sensibilidad medida (Krull y Swartz, 1997).

Claro está que, dos técnicas o la misma técnica empleada para diferentes matrices, pueden tener la misma sensibilidad de calibración, pero diferente sensibilidad analítica debida a factores propios como necesidad de extracción, concentración, etc.

Ejemplo de determinación de límites de detección y de cuantificación:

Tomando una curva de calibración representada por la ecuación $Y = 857.6X + 27.9$ y calculada entre 2.4 y 13.6 g de masa inyectada, se efectúan tres mediciones por triplicado en la zona inferior de la curva para el cálculo de los límites de detección y de cuantificación.

Cuadro 3. Ejemplo de las concentraciones para determinar la sensibilidad.

μg inyección.	Area			Area media	s	RSD
0.25	242	245	230	242.0	12.00	9.46
0.50	460	465	447	457.3	9.29	2.03
0.75	671	667	679	672.3	6.11	0.91

1. Cálculo de respuesta a concentración cero:

El análisis de regresión tomando los valores medios de área de la recta $Y = 860.6X + 26.9$

La estimación de la respuesta a concentración cero es $\hat{Y}_{bl} = 26.9$

2. Cálculo de la desviación estándar de la respuesta a concentración cero:

Se efectúa el análisis de regresión tomando concentración como X y desviación estándar como Y.

La recta calculada es	X (g)	s
$Y = -11.78 X + 5$	0.25	12.0
Y se toma $s_{bl} = 15$	0.50	9.29
	0.75	6.11

Luego, tomando como pendiente b: 857,6 los índices a calcular son:

$$\text{Límite de detección} = (26.9 + 3 \times 15) / 857.6 = 0.08 \mu\text{g}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = (26.9 + 10 \times 15) / 857.6 = 0.21 \mu\text{g}$$

-Límite de detección:

El límite de detección (LOD) es la concentración más baja del analito que puede ser detectado pero no cuantificado en una muestra. Es una prueba específica ya sea que un analito este por encima o abajo de un cierto valor. LOD es expresado como una razón específica de señal-ruido (S/N), usualmente 2:1 o 3:1. La ICH ha reconocido la conversión S/N pero también lista otras dos opciones para determinar el límite de detección: Método visual no instrumental y el cálculo del límite de detección. El método visual no instrumental puede incluir el límite de detección determinado por técnicas tales como la cromatografía de capa fina o titración. El límite de detección también puede ser calculado basándose en la desviación estándar de la respuesta (SD) y la inclinación de la curva de calibración (S) los niveles aproximados del límite de detección son según la siguiente fórmula: $\text{LOD} = 3.3 (SD/S)$. Puede ser determinado por la desviación estándar de la respuesta basándose en la desviación estándar del blanco, en la desviación estándar residual de la regresión lineal.

-Límite de cuantificación:

El límite de cuantificación (LOQ) es la concentración más baja del analito que puede ser determinada en una muestra con precisión aceptable y exactitud bajo el estado de condiciones de operación del método. Del mismo modo que el límite de detección, el límite de cuantificación es expresado como una concentración, con la precisión y exactitud de la medida también reportada. Algunas veces una razón S/N de 10:1 es usado para

determinar el límite de cuantificación. Esta S/N es una buena regla de THUMB, pero la detección del límite de cuantificación es un compromiso entre la concentración y la precisión requerida y exactitud. En otras palabras, si el límite de cuantificación decrece y el nivel de concentración decrecen, la precisión también decrece. Si se requiere una mayor precisión, una alta concentración debe ser reportada para el límite de concentración. Este acuerdo es dictado por el método analítico que es intentado usar. La ICH reconoce el 10:1 S/N como el típico y también del mismo modo el límite de detección, el método de cálculo es de nuevo basado en SD y S según la siguiente formula $LOQ = 10 (SD/S)$, de nuevo SD puede ser determinado basándose en la desviación estándar del blanco, en la desviación estándar de los residuales de los datos observados y los datos esperados (Krull y Swartz,1997).

8.5 Linealidad

La linealidad es la habilidad del método para extraer resultados de la prueba que es directamente proporcional a la concentración del analito dentro un intervalo dado, se reporta como la varianza de la inclinación de la regresión lineal. Donde el rango es el intervalo entre el nivel alto y el nivel bajo de la recta. El intervalo normalmente es expresado en unidades iguales como la prueba de resultados obtenidos por el método. La norma ICH específica un mínimo de cinco niveles de concentración, con una certeza mínima de 80-120% del intervalo específico de la concentración del blanco (Krull y Swart, 1997; Delgado, 1998).

Ejemplo de determinación de linealidad (Cuadro 4). Los cálculos efectuados sobre la siguiente curva de calibración, empleando las ecuaciones indicadas, dan los siguientes resultados:

Cuadro 4. Ejemplo de linealidad.

Datos	µg inyección		Área		
	X _i	Y _i	X _i • Y _i	X _i ²	Y _i ²
1	2.4	2002	4804.8	5.76	4008004
2	5.2	4461	23197.2	27.04	19900521
3	8.0	7033	56264.0	64.00	49463089
4	10.8	9418	101714.4	116.64	88698724
5	13.6	11530	156808.0	184.96	132940900
Σ	40.0	34444	342788.4	398.40	295011238

De los valores de la tabla:

$$A = \frac{342788.4 - (40 \times 34444) / 5}{398.4 - 40^2 / 5} = \dots\dots\dots 857.64$$

$$b = \frac{34444 - (857.64 \times 40)}{5} = \dots\dots\dots 27.9$$

ecuación de la recta: Y= 857.6X + 27.9

$$r = \frac{342788.4 - (40 \times 34444) / 5}{[(398.4 - 40^2 / 5) (295011238 - 34444^2 / 5)]^{1/2}} = \dots\dots\dots 0.99938$$

grados de libertad: n - 2 = 3 t_{tabla} : 3.182

$$t_r = \frac{0.99938 (5 - 2)^{1/2}}{(1 - 0.99938^2)^{1/2}} = 49.16 \gg 3.182 = > \text{ correlación linea mayor que } p = 0.05$$

$$S_{xy}^2 = \frac{295011238 - (27.9) 34444 - 857.64 \times 342788.4}{5 - 2} = \dots\dots\dots 34972.85$$

$$S_b = (24972.85 / 398.4 - 40^2 / 5)^{1/2} = \dots\dots\dots 17.85$$

$$B = b \pm t \cdot S_b = 857.64 \pm 2.776 \times 17.85 = \dots\dots\dots (808.1; 907.2)$$

$$S_a = (318.53 \times 398.4 / 5)^{1/2} \dots\dots\dots 159.31$$

$$A = a \pm t \cdot S_a = 27.9 \pm 2.776 \times 159.3 = \dots\dots\dots (-131.4; 187.2)$$

8.6 Robustez

La robustez es la capacidad de un método para medir variaciones pequeñas, en parámetros tales como: el porcentaje de solventes orgánicos, pH, fuerza iónica y temperatura. Pueden ser también ligeras diferencias operativas, de equipos, analistas, laboratorios, fuente de columnas, etc. Dicho estudio suele hacerse de manera retrospectiva, a partir de los resultados obtenidos en un tiempo determinado en el que se ha utilizado la técnica. En el caso de métodos nuevos, conviene que el estudio sea efectuado por el laboratorio pionero (Waters, 2002).

Es importante mencionar que no necesariamente la robustez o reproducibilidad debe serlo ante todos los cambios estudiados, excepto en el caso de analistas o instrumentos. Cuando algún factor o variable altere drásticamente los resultados, se informará en la publicación de las variables que son críticas para la separación y se precisan las condiciones y el rango dentro del cual es posible variar sin producir alteraciones en los resultados.

Por otro lado, cuando algún factor no es crítico para la separación, es posible indicar en el texto del método que su proporción puede modificarse para asegurar la separación que se pretende. En la selección de las variables a considerar se utiliza todo el conocimiento acumulado durante el desarrollo analítico para minimizar el número de ensayos que se realizarán. En un diseño normal de “una variable por vez”, el estudio de 5 variables resultaría en $2^5 = 32$ ensayos. Por eso, cuando los factores a evaluar en el estudio de robustez son muchos, se recurre a un diseño global que permite agruparlos, reduciendo el número de ensayos a efectuar. Un diseño muy utilizado es el de Plackett y Burman, que permite estudiar el efecto de n variables en $n + 1$ ensayos en la tabla 5 se ejemplifica el estudio de 7 variables en 8 ensayos. Las variables seleccionadas se indican con letras: las letras mayúsculas (A, B, C, D, E, F) corresponden al nivel alto y las letras minúsculas (a, b, c, d, e, f) al nivel bajo de la variable en cuestión. Luego se selecciona uno o más parámetros a medir y se obtienen los resultados indicados con las letras s, t, u, v, w, y, z. Estos resultados corresponden a uno o más parámetros en estudio: concentración hallada, resolución, asimetría, etc.

Cuadro 5. Diseño experimental para 7 variables en un estudio de robustez según Plackett y Burman.

Factor/ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	g	G	g
Resultado	s	t	U	v	w	x	y	z

Cuadro 6. Cálculo de la diferencia de respuesta para cada parámetro.

Parámetros	Diferencia
A-a	$V_A = 1/4(s + t + u + w) - 1/4(w + x + y + z)$
B-b	$V_B = 1/4(s + t + w + x) - 1/4(u + v + y + z)$
C-c	$V_C = 1/4(s + u + w + y) - 1/4(t + v + x + z)$
D-d	$V_D = 1/4(s + t + y + z) - 1/4(u + v + w + x)$
E-e	$V_E = 1/4(s + u + x + z) - 1/4(t + v + w + y)$
F-f	$V_F = 1/4(s + v + w + z) - 1/4(t + u + x + y)$
G-g	$V_G = 1/4(s + v + x + y) - 1/4(t + u + w + z)$

Finalmente, se calcula la diferencia de las medias para cada parámetro en forma individual.

Para decidir si un parámetro tiene influencia significativa sobre el resultado, se compara la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre ese parámetro y el producto de s (desviación estándar del estudio de precisión) y raíz de 2. Por ejemplo,

Si $V_B > s r^2$ ► diferencia significativa

Ejemplo del estudio de robustez en una valoración por HPLC

Cuadro 7. Ejemplo de robustez.

variable	Nivel bajo	Nivel alto
columna	6 cm, 3 μ m dp	15 cm, 5 μ m dp
pH	3.0	5.0
caudal	1.00 ml/min	2.00 ml/min
Temperatura del horno	30° C	50° C
Concentración de Trietilamina	30 mM	60 mM
Concentración de MeOH	50%	60%
Tiempo preparación-inyección	30 minutos	8 hr

Es decir, puede estudiarse el efecto producido al cambiar una columna de 6 cm de longitud y partícula de 3 μ m de diámetro de por una columna de 15 cm y 5 μ m (en este caso se intenta estudiar solo una variable, la eficiencia-N-, que puede suponerse *a priori* aproximadamente igual en una columna corta de diámetro de partícula pequeño y en una más larga, de mayor diámetro de partícula), por variación de 2 unidades de pH de la fase móvil, de la concentración hallada, resolución, asimetría, etc.

Para que se pueda validar un sistema analítico cada uno de sus componentes técnicos tiene que funcionar perfecta y óptimamente, (Figura 13) resume los componentes de un sistema cromatográfico (Peña, 2003).

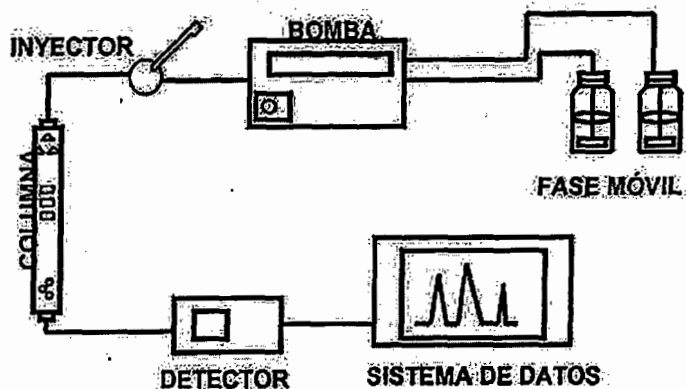


Figura 13. Componentes principales de la instrumentación cromatográfica.

9. Las Poliaminas (PAs)

Las aminas son compuestos orgánicos derivados del amoníaco por sustitución de uno o dos átomos de hidrógeno por radicales alifáticos o aromáticos. El aminoácido L-arginina (Arg) es cabeza de síntesis de diversos compuestos como el óxido nítrico, las poliaminas putrescina, espermidina, espermina y la ornitina (Orn), también precursor de las poliaminas (Morcillo, 1999).

Las PAs son moléculas nitrogenadas alifáticas ubicuas (Cohen, 1998), es decir, están presentes en todos los seres vivos, se encuentran involucradas en una gran variedad de eventos celulares, fuertemente relacionadas más que todo con el ciclo celular (Kumar *et al*, 1997). Las PAs putrescina (Pu), espermidina (Spd) y espermina (Spm) son compuestos que se consideran como reguladores del crecimiento y desarrollo celular por su efecto sobre el crecimiento, la división y la diferenciación celular a bajas concentraciones. Por su carácter policatiónico pueden unirse a moléculas cargadas negativamente tales como ácidos nucleicos, proteínas o fosfolípidos, alterando la expresión génica y la actividad de ciertas enzimas, así como alterando la fluidez y la permeabilidad de las membranas biológicas. En algún caso, las PAs actúan como reserva de nitrógeno (Gallardo *et al*, 1996). Todos estos elementos y las enzimas responsables de la biosíntesis forman un entramado que hace cada vez más interesante su estudio.

9.1 Biosíntesis de Poliaminas

El primer paso en la biosíntesis de las PAs es la formación de Pu, esto ocurre por descarboxilación de Arg y Orn sucesivamente y las reacciones respectivas son realizadas por Arginasa y Ornitina descarboxilasa (ODC) (Walters y Mackintosh, 1997). En células de mamíferos y en la mayoría de los hongos, la reacción de la ODC sobre la ornitina conduce a la formación de Pu. Las PAs Spd y Spm son sintetizadas por la adición subsecuente de un grupo aminopropil a la Pu y a la Spd, por las enzimas Spd y Spm sintetetas respectivamente (Figura 14).

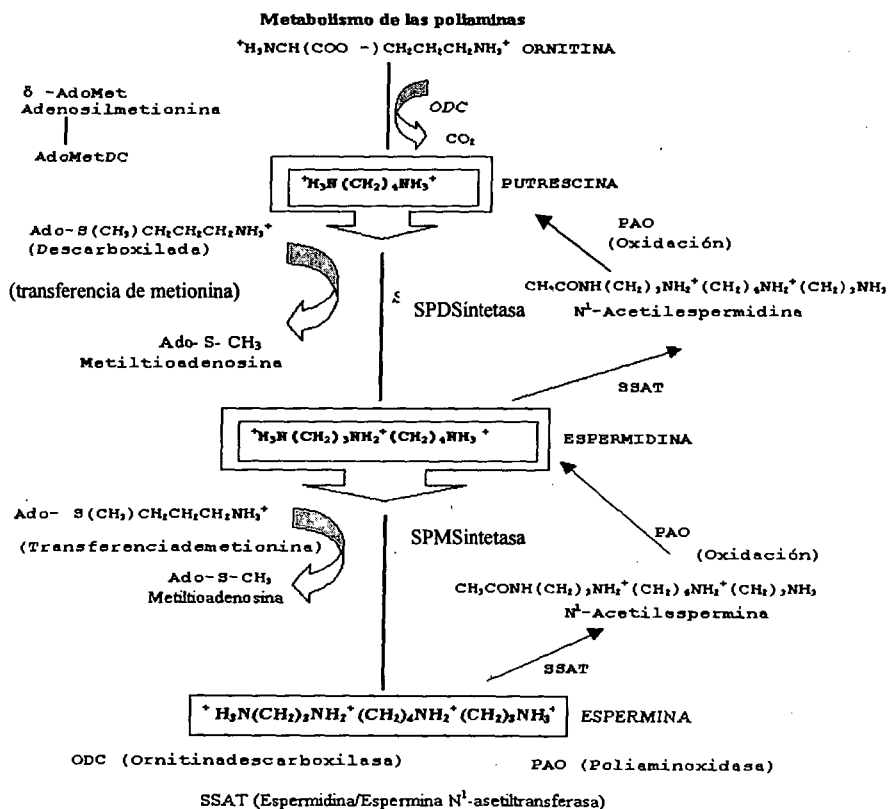


Figura 14. Metabolismo de las poliaminas (Pegg, 1988; Casero y Pegg, 1993).

*ODC (Ornitinadecarboxilasa), PAO (Poliaminoxidasa) y SSAT (Espermidina/N¹-asetiltransferasa).

Las enzimas Diaminoxidasa (DAO) y Poliaminoxidasa (PAO) tienen como función catabolizar a las PAs, degradando a la Spm y Spd en sentido inverso de la vía metabólica que las introdujo; el carbón y el nitrógeno resultante son reciclados por otras vías metabólicas (Casero y Pegg, 1993).

Los niveles intracelulares adecuados de PAs son necesarios para el crecimiento celular; la replicación, la transcripción, las etapas de la traducción óptimas, y estabilización de membranas en plantas, bacterias, hongos y, de hecho, de todos los tipos de células examinadas hasta ahora (Cohen, 1998). Como se mencionó las PAs son un grupo de componentes celulares importantes en la regulación de la proliferación y diferenciación celular. Existen también evidencias que sugieren que las PAs juegan un papel en la muerte celular programada o apoptosis (Thomas y Thomas, 2001; Figura 15).

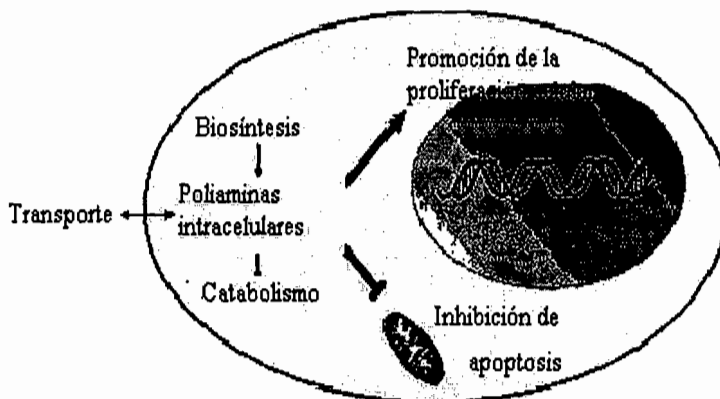


Figura 15. Funciones de las poliaminas.

Está claro que las PAs desempeñan papeles importantes en varios procesos celulares. Su participación probablemente es ejercida por las interacciones específicas de las cargas catiónicas como cargas únicas, con sus distribuciones características y flexibles. La importancia de las PAs, en las funciones de la célula, se refleja en sus niveles intracelulares que ejercen un control regulador determinante. Los niveles intracelulares adecuados de PAs son alcanzados por un equilibrio cuidadoso entre la biosíntesis, la

degradación, excreción y la incorporación de aminos. Algunos de los mecanismos reguladores implicados en mantener un equilibrio en los compartimentos celulares de PAs son únicos por ejemplo. La vida media de la ODC (síntesis) y de la AdoMet (catabolismo) es de 5-60 minutos y está entre las más cortas para las enzimas de mamíferos, permitiendo que la célula cambie rápidamente sus niveles celulares de PAs. Además de la regulación de los niveles de PAs por biosíntesis y degradación, las células presentan un sistema eficiente del transporte para la utilización de PAs exógenas (Wallace y Caslake, 2001; Figura 16).

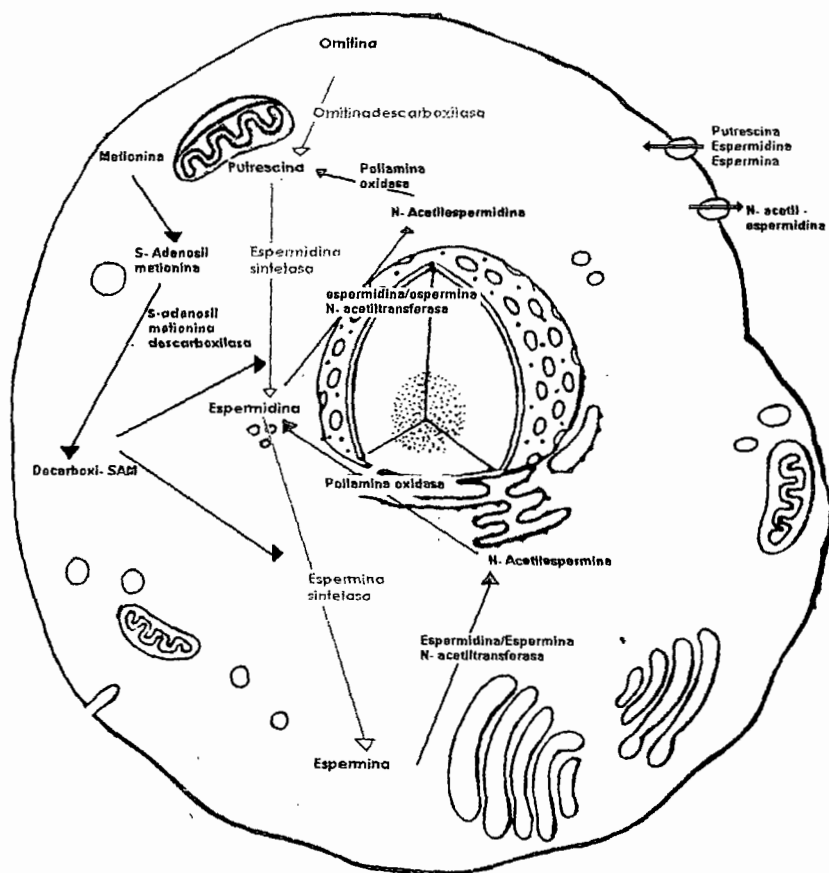


Figura 16. Vía metabólica de PAs en células de mamíferos (Wallace y Caslake, 2001).

En estudios realizados con células de ovario de hámster chino que progresan sincrónicamente durante el ciclo celular, se encontró que la biosíntesis de PAs es activada en las fases G2 a la transición de M y G1 a S por lo que se deduce un papel de las PAs en la replicación del DNA, demostrado por que el agotamiento de PAs afecta la síntesis del DNA. Además, se encontró que ODC y AdoMet están regulados en la transcripción durante el ciclo de la célula, tal investigación proporciona un marco de fondo para entender el papel de las PAs en la regulación del ciclo celular y regulación de oncogenes y genes supresores de tumor. En la mayoría de los tipos de células, las características bioquímicas de la muerte celular programada (apoptosis) incluyen la activación del calcio endógeno y las endonucleasas dependientes del magnesio, conduciendo a la fragmentación del DNA; el DNA se desestabiliza en células con PAs agotadas en su interior. Esto da lugar a una mayor vulnerabilidad del DNA a ser atacado por nucleasas (Thomas y Thomas, 2001).

En las plantas, las PAs pueden conjugarse con ácidos higroxicinámicos y desempeñar funciones en los procesos de diferenciación, floración y maduración; pueden favorecer la resistencia a virus y hongos; y también tienen importancia como precursoras de numerosos alcaloides (Gallardo *et al*, 1996; Cohen, 1998).

La biosíntesis de PAs y la concentración de ODC se aumentan (Jeevanandam y Petersen, 2001), en una gran variedad de estímulos fisiológicos del crecimiento; y la deficiencia de PAs da lugar a un arresto de la proliferación de la célula, que se puede invertir por la suplementación con PAs exógenas. El hecho de que exista una deficiencia de PAs también, bajo ciertas circunstancias, da lugar a apoptosis. Los inhibidores específicos de las enzimas biosintéticas de PAs permiten lograr la deficiencia de las mismas. La superproducción constitutiva de ODC se ha observado en muchos tipos de células cancerosas, el gen de ODC parece ser de gran importancia en la regulación del crecimiento de la célula, cuando éste es sobre-expresado, las células pueden pasar a una transformación maligna ocasionando cáncer (Lan *et al*, 2000).

Existe un nuevo blanco prometedor en la quimioterapia contra el cáncer que podría afectar la formación y la metástasis de un tumor inhibiendo el crecimiento de la célula, como ya se ha mencionado la célula requiere de PAs para desempeñar correctamente su

ciclo celular dado que las PAs desempeñan un papel esencial en la proliferación celular, existen dos caminos para asegurar una fuente adecuada de PAs. Una es la producción de sus propias PAs y la otra es obtenerlas de la fuente dietética, de bacterias intestinales y las expulsadas por otras células; existe una molécula en la superficie de la membrana celular llamada sulfato de heparan, que es crítica para que la célula tome PAs que circulan en el exterior. Si la producción interna de PAs se bloquea con difluoromethylornitina (DFMO), un inhibidor específico de ODC, la célula continúa proliferando simplemente aumentando su captación del exterior. Finalmente, usando un inhibidor del sulfato de heparan se bloquean ambos caminos, de la célula para obtener PAs y da lugar a una reducción dramática en la formación y desarrollo del tumor en un modelo experimental de metástasis. DFMO es una droga bien conocida y bien tolerada usada tradicionalmente como antiparasítico, pero ahora se está estudiando en ensayos clínicos como agente quimiopreventivo en los individuos que se encuentran en riesgo de padecer una variedad de cáncer (Belting *et al*, 2001). Esta función demuestra que inhibir la producción del sulfato de heparan y el bloqueo de la biosíntesis de PAs proporciona una terapia en combinación para tratar tumores, de aquí la importancia de poder medir las PAs ya que han sido propuestas como biomarcadores para el tratamiento de cáncer, al igual que para probar, medir y desarrollar mejores inhibidores y por consiguiente nuevos medicamentos eficientes en bloquear el desarrollo del padecimiento (Belting *et al*, 2001).

9.2 Las Poliaminas como bioindicadoras de crecimiento tumoral

Como ya se mencionó a nivel biológico, las PAs juegan un papel crítico en la proliferación, diferenciación, mantenimiento y transformación neoplásica de las células de mamíferos (Khuhawar y Qureshi, 2001). Además, están involucradas en la apoptosis y la angiogénesis; esta última es esencial para el crecimiento tumoral y la metástasis. De tal manera que el gen de la ODC es considerado un protooncogen crítico para la regulación del crecimiento celular y la transformación. Sus implicaciones biológicas hacen relevantes a las PAs como:

- Moléculas biológicas marcadoras del cáncer

- Agentes quimioterapéuticos dirigidos a las PAs
- Quimioprevención con las PAs como blanco
- Modulación nutricional dirigida a PAs en pacientes con cáncer
- Modulación de la radioterapia y la hipertermia basada en las PAs.

El uso de las PAs como marcadores de malignidad, en especial los niveles de PAs en circulación, es de gran interés en la clínica actualmente (Nishioka, 1996).

La determinación de las PAs unidas a proteína en el plasma pueden convertirse en una buena herramienta en los inicios del desarrollo de un tumor para dar seguimiento al tratamiento que se aplica a pacientes con cáncer (Persson *et al.*, 1998; Srinath *et al.*, 2002; Schipper *et al.*, 2003). De este tipo de estudios se esperaría conocer aspectos cualitativos del cáncer, pero si se estudia a los niveles de PAs en las células rojas, se podría considerar como un reflejo de la proliferación. El nivel de PAs en los eritrocitos es un indicador de hiperplasia del tumor en cuestión; en varios tipos de tumor en animales los niveles de PAs se incrementan en las células rojas, en particular Spd se correlaciona no solo con la progresión del tumor, sino también con el contenido de PAs en el tejido afectado. Un ejemplo por demás elocuente es el caso del Carcinoma Pulmonar de Lewis (Moulinoux *et al.*, 1996). En general, los niveles de PAs en eritrocitos sanguíneos son proporcionales al grado de malignidad, excepto para tumores sólidos como el de colon y tiroides. Debemos aclarar que aunque los niveles de PAs en células rojas se incrementan en los pacientes con cáncer de una manera significativa, estadísticamente hablando, no permiten diagnosticar la presencia de procesos de malignidad. En las etapas iniciales las PAs en eritrocitos no son muy útiles quizás por que reflejan el comportamiento de la hiperplasia el cual se presenta de una manera discontinua, con fases de crecimiento y fases estacionarias. Los niveles de PAs en los eritrocitos de pacientes con tumores recurrentes se incrementan y permiten llevar un seguimiento confiable (Moulinoux *et al.*, 1996). En el caso de pacientes con glioblastoma que han sido sometidos a cirugía se puede determinar la “recurrencia biológica”, al incrementarse el contenido de PAs en los eritrocitos, donde sucede una fase proliferativa que corresponde a la reconstrucción celular de la masa tumoral, la cual es sensible a la quimioterapia. Si ocurre una “recurrencia clínica” y/o radiológica donde la proliferación ya ha sucedido y la masa tumoral se reconstituyo totalmente, en este caso podría requerir

cirugía y/o radioterapia. Finalmente este tipo de estudio contribuye para que los pacientes incrementen su sobrevida. En clínica, especialmente en referencia a la terapia, las PAs circulantes son marcadores de la proliferación celular, por otro lado las PAs totales del organismo y no solo en el compartimiento intracelular, son también buenos indicadores de este parámetro (Moulinoux *et al*, 1996).

Está bien establecido que las PAs se encuentran elevadas en la orina de pacientes que presentan varios tipos de tumor. A pesar que no son muy congruentes los resultados obtenidos en trabajos que tratan de asignarles a las PAs urinarias un papel, como marcadores bioquímicos, se cree que es por que se miden las PAs totales en lugar de medir las PAs libres y acetiladas por separado. Las formas acetiladas se proponen como un criterio de diagnóstico más seguro (Suh *et al*, 1997).

La distribución de las principales PAs: Pu, Spd y Spm se altera, al incrementarse su concentración en tejidos que crecen rápidamente. Este fenómeno a provocado múltiples estudios en estados de salud y enfermedad. La medición simultánea a nivel picomolar de las PAs individuales en fluidos extracelulares o en los tejidos, es común en trabajos publicados actualmente (Weiss *et al.*, 2002). Las concentraciones elevadas de PAs en el fluido extracelular son indicadores inmediatos de las terapias en padecimientos que involucran el crecimiento celular y pérdida de los componentes celulares. El monitoreo diario de los niveles de PAs en orina o plasma indica la existencia de la enfermedad si se aplica una terapia (Jeevanandam y Petersen, 2001). Particularmente en el cáncer, monitorear la concentración de PAs en orina, suero o tejidos afectados a tiempos regulares de los pacientes podría tener significancia clínica en la predicción terapéutica o indicadora del transcurso del tumor. Además, en lo que respecta a las técnicas de separación cromatográfica, se sabe que la derivatización post-columna presenta ventajas, sobre todo en la sensibilidad con respecto a la derivatización precolumna (Khuhawar y Qureshi, 2001).

Los datos que se obtendrán en el modelo murino cepa BALB/c con la técnica de cromatografía de intercambio iónico a baja presión pueden tener aplicación a futuro en el área de las ciencias biomédicas, en particular en el área del cáncer y su tratamiento ya que las PAs han sido propuestas como biomarcadores tumorales dado que muchos tipos

de células y tejidos neoplásicos presentan niveles elevados de las mismas, debido en particular a la sobre-expresión de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), la enzima limitante de la biosíntesis de las PAs.

III. JUSTIFICACIÓN

La validación de la técnica de cromatografía por intercambio iónico a baja presión es indispensable lo cual garantizará la confiabilidad de la técnica en un experimento determinado ya que una validación bien establecida asegurará la aplicación del sistema cromatográfico en investigaciones que requieran de dicho análisis proporcionando confianza a los resultados que se obtengan; la validación es de importancia ya que no se ha realizado en el Laboratorio de Cromatografía de la Unidad de Genética.

IV. HIPÓTESIS

Por medio de la validación de la técnica de análisis de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina por cromatografía de intercambio iónico a baja presión, será posible obtener resultados confiables al analizar estas moléculas en muestras de orina de ratones BALB/c sanos e inducidos con linfoma.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Validar una técnica para el análisis de poliaminas por cromatografía de intercambio iónico a baja presión

Objetivos particulares

- 1.-Ensamblar el sistema analítico y desarrollar el método de separación y cuantificación de poliaminas.
- 2.-Validar la técnica de cromatografía por intercambio iónico a baja presión para el análisis de las poliaminas putrescina (Pu), espermidina (Spd) y espermina (Spm).
- 3.-Analizar los niveles de poliaminas en muestras biológicas (orina) obtenidas de ratones sanos y con linfoma L5178Y para corroborar la aplicabilidad de la técnica validada.

VI. METODOLOGÍA

1. Sistema cromatográfico de intercambio iónico

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Cromatografía del Departamento de Biología Celular y Molecular del CUCBA. El análisis cromatográfico se realizó según el método desarrollado por Villanueva *et al.* (1986), donde se utilizó una resina de intercambio catiónico BC X-12 (Benson Co, Reno, Nevada, USA.) empacada en una columna de vidrio (0.4 cm de diámetro interno por 9 cm de altura) mantenida a 74°C. Se utilizó un sistema de dos amortiguadores (ver cuadro 8), basados en citrato de litio, los cuales se utilizan en secuencia (Figura 17) por medio de una bomba recíprocante a 33mL/h de flujo.

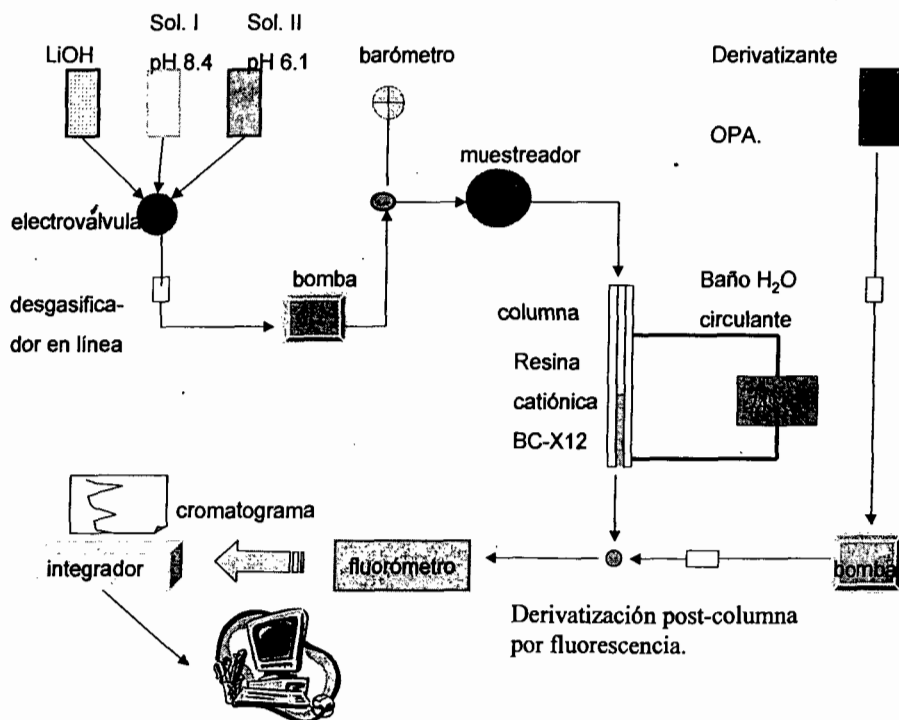


Figura 17. Sistema cromatográfico utilizado (Villanueva *et al.*, 1986).

Los amortiguadores fueron filtrados en membranas de 0.45 μm de diámetro de poro (Millipore corporation, Bedford MA, USA).

Cuadro 8. Componentes de los amortiguadores (fase móvil).

	Tiempo (min)	Ácido Bórico (N)	KCl (N)	EDTA (N)	pH	Surfactante (%)	Volumen (L)
Amortiguador I	30 min.	0.4 N	0.12 N	0.3 N	8.45	2.5 %	100 μL
Amortiguador II	50 min.	0.6 N	2.0 N	-	6.10*	5.5 %	-

*El pH fue modificado del método original utilizado por Villanueva *et al.* (1986), con el fin de obtener una buena separación de las poliaminas en el cromatograma, encontrando el indicado en este caso de 6.10 (reactivos de Merck, Darmstadt Alemania).

Al final del ciclo, la columna se lava durante 11 minutos, con una solución de Hidróxido de Litio (LiOH) 0.3 N, KCL 0.2 N y EDTA 100 mg/L. La columna se reequilibra con amortiguador I eluyendo durante 10 minutos.

La detección post-columna se realizó con: *o*-phthalaldehído (OPA) (Sigma Chemical, San Luis Missouri) como derivatizante, preparado con 800 mg de OPA en 10 mL de etanol y 2 mL de 2-mercaptoetanol (Sigma Chemical, San Luis Missouri). Esta mezcla se llevó a un litro de ácido bórico (0.4 M, ajustando pH a 10.4) y se le adicionó 3 mL de Brij 35 (Merck, Darmstadt, Alemania) al 30%. Se utilizó un detector de fluorescencia (Shimatzu modelo RF-530) con una longitud de onda de excitación de 345 nm y una longitud de onda de emisión a 455 nm, el derivatizante fluye por medio de una bomba a 15 mL/h. El estándar interno utilizado fue el 1,7-diaminoheptano (DAH) (Sigma Chemical, San Luis Missouri).

En estas condiciones el primer amortiguador eluye los precursores Orn, tiempo de retención (TR, min) 8.86 y Arg TR 19.10; el segundo amortiguador eluye a la ¹Pu TR 39.29, la Spd TR 46.70, la ²Spm TR 60.00 y al estándar interno 1,7-diaminoheptano TR 68.88.

¹ Estándares putrescina y espermidina (Sigma, San Luis Missouri). ² Estándar espermina (Merck, Darmstadt, Alemania).

Los cromatogramas se obtuvieron por medio del integrador Spectra- Physics SP 4290. Para la obtención de datos del área bajo la curva (ABC) se midió con regla y se calculó mediante la fórmula de (Base)(Altura/2).

Mediante un programador diseñado por Villanueva y Adlakha (1978), se le aplicó al sistema cromatográfico el siguiente ciclo:

Cuadro 9. Ciclo programado al sistema cromatográfico

Línea	Tiempo minutos	Amortiguador I	Amortiguador II	Reactivo derivatizante OPA*	LiOH
00	10	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
01	10	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
02	20	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
03	50	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
04	11	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

* o-phthalaldehído

El tiempo de corrida se estableció en 80 minutos.

2. Validación

-LINEALIDAD

Para su determinación se inyectaron 6 diluciones seriadas 1:2 por triplicado de los estándares Pu, Spd y Spm. A partir de los resultados de área bajo pico, se desarrolló la regresión cuadrática usando el programa de computación SPSS-10.0.

-EXACTITUD

Se inyectaron 5 µL de muestra, en tres concentraciones distintas de estándares: para Pu 61.77, 51.11 y 42.70 pmol, para Spd 3.95, 3.63 y 3.40 pmol, Spm 201,181 y 165 pmol respectivamente y 5 µL de DAH 0.088 nmol por triplicado para cada concentración y se determinó el porcentaje de recuperación.

-PRECISION DEL SISTEMA.

Se realizaron 9 inyecciones al cromatógrafo de una solución homogénea de estándares y los datos obtenidos se les evaluó la dispersión, midiendo el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

-PRECISION DEL MÉTODO.

Se inyectaron 4 concentraciones de muestra de orina de ratón cada una por triplicado y se determinó la media, la D.E. y el C.V.

-ESPECIFICIDAD

Para éste parámetro se inyectó una muestra de orina con los analitos estándares y otra muestra, la cual no contenía los analitos de interés.

-SENSIBILIDAD

Límite de detección: Se inyectaron 6 diluciones seriadas 1:2 de los analitos puros y se determinó este parámetro en aquella dilución que no permitió detectar su presencia en el cromatograma.

Límite de cuantificación: Se inyectaron 6 diluciones seriadas 1:2 y se tomó aquella señal correspondiente a la concentración mínima detectable del analito.

3. Preparación de la muestra

Se obtuvo la orina de ratones sanos y con linfoma sobre caja de Petri con diámetro de 15 cm y se colectó con pipeta Pasteur. Se mezcló con una solución de ácido tricloroacético al 5% y ácido clorhídrico al 0.05N (TCA-HCl), a una proporción de 1:3. La mezcla fue centrifugada 10,000 rpm durante 20 min a 4°C. Para la inyección se diluyó la mezcla con TCA-HCL y también añadiéndole 5 µL el estándar interno 1,7-diaminoheptano diluido 1:500 0.2 nmol hasta donde el resultado del área bajo la curva (ABC) permitiera interpolarse con la curva de regresión cuadrática

VII. RESULTADOS

-LINEALIDAD

Es la proporción entre la concentración de muestra y su respuesta representada por una curva de calibración, cada concentración de Pu se inyectó por triplicado.

Cuadro 10. Resultados obtenidos de la inyección de 0.25 a 0.0078 nmol de Pu (correspondiente a la curva 1; Figura 18 a).

nmol Pu	[Pu]/[DAH]	Área del pico		Relación de áreas	Factor de Respuesta
		Putrescina	DAH		
0.25	2.5	20.82	12.28	1.69	0.676
		20.62	11.80	1.79	0.694
		20.67	11.84	1.70	0.680
0.125	1.25	12.85	10.08	1.27	1.016
		11.70	10.24	1.14	0.912
		10.68	10.16	1.05	0.840
0.0625	0.625	3.5	13.60	0.257	0.411
		3.5	13.64	0.236	0.377
		3.5	13.52	0.258	0.412
0.0312	0.312	1.83	11.66	0.156	0.500
		1.84	11.64	0.158	0.506
		1.86	11.92	0.156	0.500
0.0156	0.156	0.77	11.08	0.069	0.442
		0.76	11.44	0.066	0.423
		0.75	11.28	0.066	0.423
0.0078	0.078	0.36	11.28	0.039	0.397
		0.34	11.44	0.029	0.371
		0.35	11.36	0.030	0.384
r^2		0.995	0.997		
pendiente (b_1)		0.0089	0.0107		
ordenada (b_0)		0.0108	0.0034		

Volumen de inyección = 17 μ L.

Los datos obtenidos para putrescina (Pu), se ajustaron a través de la regresión lineal de Pearson, desde 0.0078 hasta 0.25 nmol, el coeficiente de determinación (r^2) es igual a 0.995, lo que significa que el 99.5% de la variación de una de las variables es explicada por la variación de la otra.

Cuadro 11. Variabilidad de las inyecciones para putrescina (Figura 18 a).

nmol Putrescina	Promedio Factor de Respuesta	Desviación Estándar (D.E.)	Coefficiente de Variación (C.V)
0.25	0.683	0.009	1.38
0.125	0.922	0.088	9.58
0.0625	0.400	0.019	4.98
0.0312	0.502	0.003	0.69
0.0156	0.429	0.010	2.55
0.0078	0.384	0.013	3.38

C.V. = coeficiente de variación = D.E./Promedio x 100

Cuadro 12. Resultados obtenidos de la inyección 0.05 a 0.0015 nmol de Spd (correspondientes a la curva 2; Figura 18 b).

nmol Spd	[Spd]/[DAH]	Área del pico		Relación de áreas	Factor de Respuesta
		Espermidina	DAH		
0.05	0.5	76.50	12.28	6.22	12.44
		75.30	11.40	6.60	13.20
		75.90	11.84	6.41	12.82
0.025	0.25	53.24	10.08	5.28	21.12
		53.24	10.24	5.19	20.76
		52.78	10.16	5.19	20.76
0.0125	0.125	24.15	13.60	1.77	14.16
		24.07	13.64	1.76	14.08
		24.30	13.52	1.79	14.32
0.0062	0.062	25.50	11.66	2.18	35.16
		24.51	11.64	2.10	33.87
		25.60	11.92	2.14	34.51
0.0031	0.031	10.50	11.44	0.917	29.58
		9.29	11.28	0.875	28.22
		9.87	11.08	0.890	28.70
0.0015	0.015	5.15	11.28	0.456	30.4
		5.61	11.36	0.493	32.8
		6.00	11.44	0.524	34.9
R ² pendiente (b ₁) ordenada (b ₀)		0.991	0.997		
		0.0001	0.0107		
		0.0027	0.0034		

Los datos obtenidos para espermidina (Spd), se ajustaron a través de la regresión lineal de Pearson, desde 0.0015 hasta 0.05 nmol, el coeficiente de determinación (r^2) es igual a 0.991, lo que significa que el 99.1% de la variación de una de las variables es explicada por la variación de la otra.

Cuadro 13. Variabilidad de las inyecciones para espermidina (Figura 18 b).

nmol Espermidina	Promedio Factor de Respuesta	Desviación Estándar (D.E)	Coficiente de Variación (C.V)
0.5	12.82	0.38	2.96
0.25	20.88	0.20	0.99
0.125	14.18	0.12	0.86
0.062	34.51	0.64	1.86
0.031	28.83	0.68	2.35
0.015	32.7	2.25	6.88

Cuadro 14. Resultados obtenidos de la inyección de 0.25 a 0.007 nmol de Spm
(correspondientes a la curva 3; Figura 18 c).

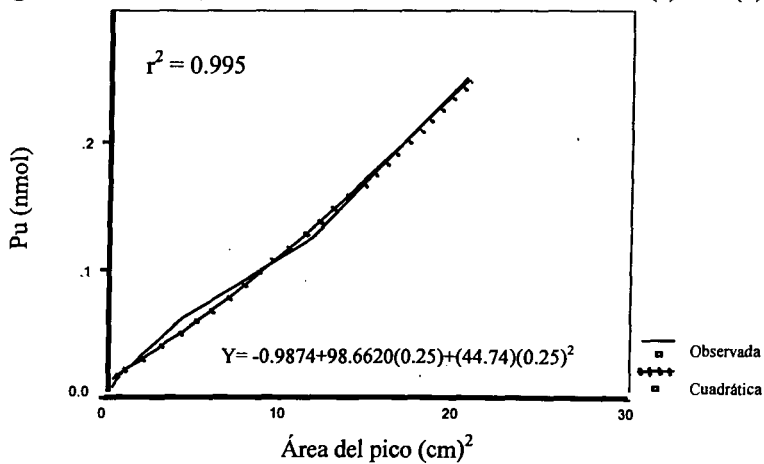
nmol Spm	[Spm]/[DAH]	Área del pico		Relación de áreas	Factor de Respuesta
		Espermina	DAH		
0.25	2.5	34.38	11.84	2.90	1.16
		36.00	12.28	2.93	1.17
		35.19	11.84	2.97	1.18
0.12	1.2	15.60	10.24	1.52	1.26
		15.52	10.08	1.53	1.27
		14.77	10.16	1.45	1.20
0.06	0.6	3.39	13.60	0.249	0.415
		3.60	13.64	0.263	0.438
		3.18	13.52	0.235	0.391
0.03	0.3	2.63	11.92	0.220	0.733
		2.25	11.64	0.193	0.643
		2.47	11.66	0.211	0.703
0.015	0.15	0.78	11.44	0.068	0.453
		0.77	11.28	0.068	0.453
		0.65	11.08	0.058	0.386
0.007	0.07	0.35	11.28	0.031	0.44
		0.35	11.36	0.030	0.42
		0.35	11.44	0.030	0.42
r^2		0.991	0.997		
pendiente (b ₁)		0.0097	0.0107		
ordenada (b ₀)		0.0111	0.0034		

Los datos obtenidos para espermina (Spm), se ajustaron a través de la regresión lineal de Pearson, desde 0.007 hasta 0.25 nmol, el coeficiente de determinación (r^2) es igual a 0.991, lo que significa que el 99.1% de la variación de una de las variables es explicada por la variación de la otra.

Cuadro 15. Variabilidad de las inyecciones para espermina (Figura 18 c).

nmol Espermina	Promedio Factor de Respuesta	Desviación Estándar (D.E.)	Coefficiente de Variación (C.V.)
0.25	1.17	0.01	0.85
0.12	1.24	0.03	3.04
0.06	0.41	0.02	4.87
0.03	0.69	0.04	5.79
0.015	0.43	0.03	6.97
0.007	0.42	0.01	2.38

Figura 18 a./Curva 1, Putrescina, ecuación de la curva $Y=b_0 + b_1(x) + b_2(x)^2$



Figuras 18. Gráficas de las curvas de regresión cuadrática (software: SPSS-10)

Figura 18 b / Curva 2, Espermidina

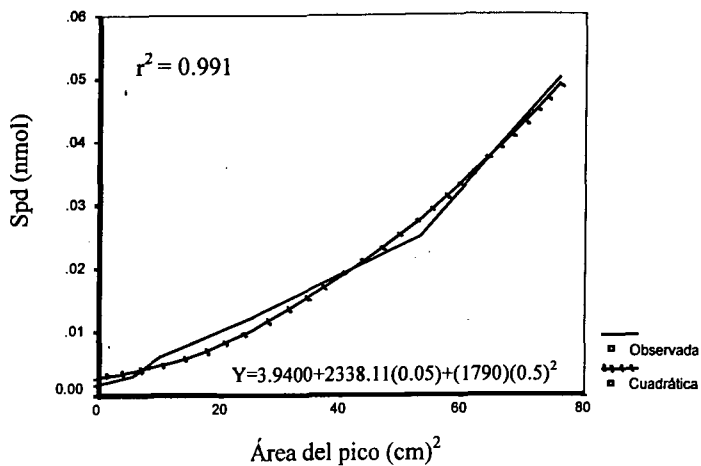
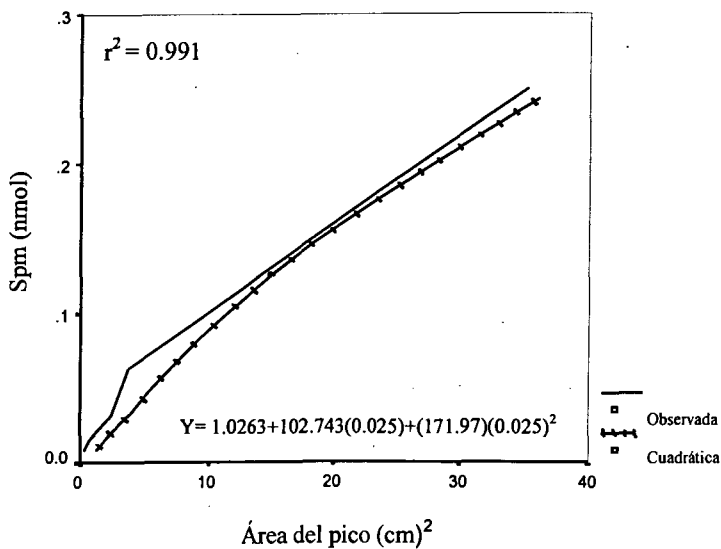


Figura 18 c./Curva 3, Espermidina



Figuras 18. Gráficas de las curvas de regresión cuadrática (software: SPSS-10) SPSS for Windows http://e-stadistica.bio.ucm.es/web-spss/índice_spss. (Agosto del 2003) (Salkind, 1999).

-PRECISIÓN DEL SISTEMA

Es el grado de concordancia entre ensayos cuando el método se aplica a alícuotas de muestra homogénea tomando en cuenta la D.E. y C.V.

Cuadro 16 Área de los picos cm^2 (estándares).

Inyección	Putrescina	Espermidina	Espermina	Diaminoheptano
1	4.69	9.88	14.41	14.98
2	4.06	9.10	13.44	14.84
3	4.55	9.42	14.14	15.66
4	4.48	9.68	14.72	14.98
5	4.65	9.88	14.30	15.34
6	4.60	9.52	13.32	15.00
7	4.48	9.49	14.37	15.47
8	4.55	9.75	14.19	15.21
9	4.80	9.45	14.04	15.12

Cuadro 17 Relación de áreas (área PAs / área DAH).

Inyección	Putrescina	Espermidina	Espermina	Diaminoheptano
1	0.313	0.659	0.961	1.00
2	0.273	0.613	0.905	1.00
3	0.290	0.601	0.902	1.00
4	0.299	0.646	0.982	1.00
5	0.303	0.644	0.932	1.00
6	0.306	0.634	0.888	1.00
7	0.289	0.613	0.928	1.00
8	0.299	0.641	0.932	1.00
9	0.317	0.625	0.928	1.00

Cuadro 18.Reproducibilidad en precisión del sistema (Datos estadísticos de la reproducibilidad de 9 inyecciones)

	Putrescina	Espermidina	Espermina	Diaminoheptano
Promedio	4.54	9.57	14.1	15.17
D.E.	0.20	0.25	0.45	0.26
C.V.	4.56	2.62	3.22	1.76
Concentración (nmol)	0.062	0.0005	0.125	0.02
Concentración relativa*	3.1	0.025	6.25	1.00
Factor de Respuesta	0.096	25.22	1.33	

*Concentración Relativa = Concentración del estándar /Concentración de DAH

Concentración de DAH = 0.02 nmol

Factor de Respuesta = Relación de área / relación de concentración

En general la reproducibilidad es muy buena para cada una de las PAs en la mezcla, con un C.V. menor al 5 %. La mejor reproducibilidad la presenta la Spd (C.V. 2.62) y la más baja es de Pu (C.V. 4.56) por lo que se considera una alta eficiencia del sistema para los estándares utilizados.

-PRECISIÓN DEL MÉTODO

Es el grado de concordancia entre ensayos y se inyectaron 4 concentraciones de muestra de orina de ratón, por triplicado.

Putrescina

Cuadro 19. Precisión del método para Pu (Cantidad de putrescina encontrada en la muestra de orina de ratones BALB/c).

Número de Muestra	µL de muestra	ABC			nmol Promedio	nmol por µL de muestra	media	D.E.	C.V.
		1	2	3					
1	1.6	1.35	1.32	1.20	0.0224	0.014	1.29	0.064	4.8
2	3.2	1.65	1.71	1.64	0.0258	0.0080	1.66	0.030	1.8
3	4.8	3.45	3.30	3.57	0.0425	0.0088	3.44	0.135	3.9
4	6.4	4.38	4.47	4.35	0.0518	0.0080	4.4	0.050	1.1

ABC = área bajo la curva

Espermidina

Cuadro 20. Precisión del método para Spd (Cantidad de espermidina encontrada en la muestra de orina de ratones BALB/c).

Número de Muestra	µL de muestra	ABC			nmol Promedio	nmol por µL de muestra	media	D.E.	C.V.
		1	2	3					
1	1.6	0.10	0.08	0.10	0.002709	0.00169	0.093	0.009	10
2	3.2	0.12	0.12	0.12	0.002712	0.00084	0.120	0	0
3	4.8	0.17	0.17	0.17	0.002717	0.00056	0.170	0	0
4	6.4	0.22	0.25	0.22	0.002723	0.00042	0.230	0.017	7.3

Espermina

No se detecto "en esta muestra"

-ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD

La especificidad da solo una respuesta a un analito y selectividad discrimina en una muestra compuestos con estructuras similares.

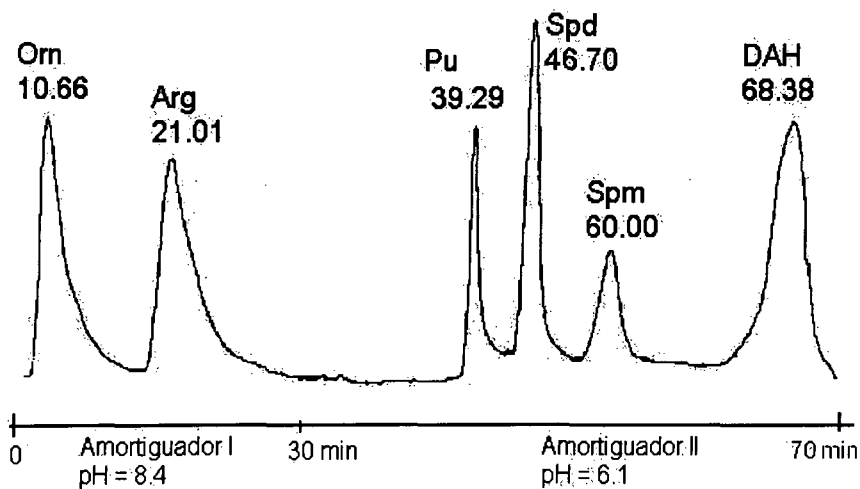


Figura 19. Cromatograma de estándares de poliaminas putrescina, espermidina, espermina además el estándar interno DAH y precursores de poliaminas: ornitina y arginina donde se marca su tiempo de retención respectivamente.

-EXACTITUD

Corresponde a la diferencia entre el valor obtenido y el valor real, la determinación de este parámetro esta dada al comparar el cromatograma de una muestra de orina sin estándares con el cromatograma de otra muestra de orina mezclada con estándares por medio del tanto % recuperado.

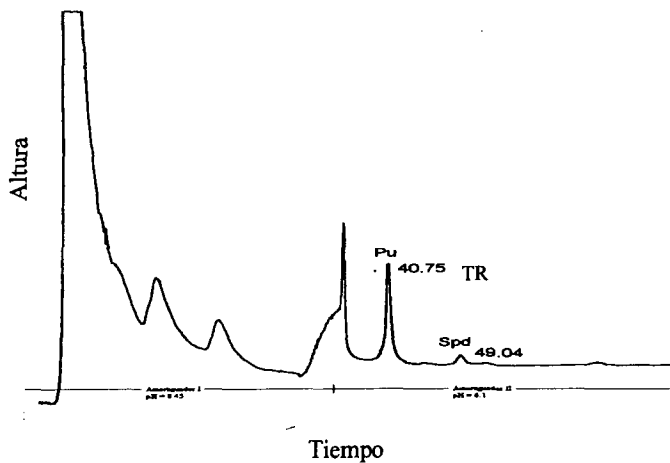


Figura 20 a) Cromatograma de una muestra de orina de ratón BALB/c.

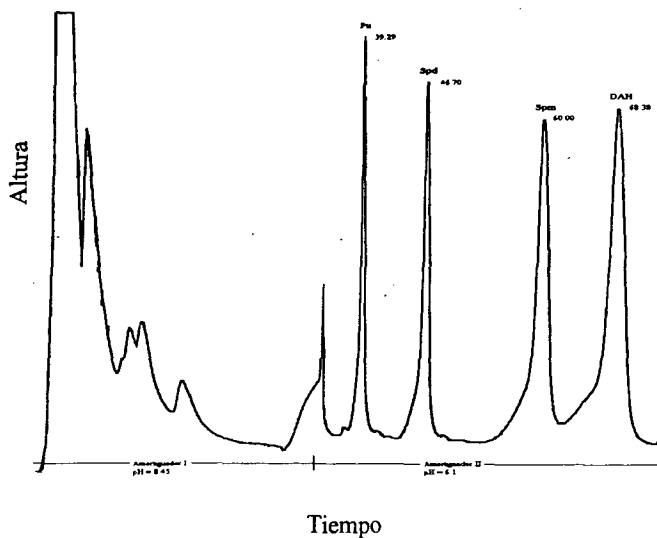


Figura 20 b) Cromatograma de una muestra de orina de ratón BALB/c mezclada con estándares.

Cuadro 21. Resultados de exactitud para Pu (Recuperación de los estándares adicionados a muestras de orina).

Putrescina (Pu).

Estándar Pu pmo	N. de Muestra	Muestra pmo	pmo totales	pmo hallados	ABC	% Recuperado	Promedio % Recuperado
61.77	5	23.54	85.31	94.00	7.51	110	105
				87.31	6.97	102	
				90.19	7.20	106	
51.10	5	23.54	74.64	76.60	5.88	102	103
				77.64	5.96	104	
				77.64	5.96	104	
42.69	5	23.54	66.23	65.42	4.80	98	98
				65.42	4.80	98	
				65.42	4.80	98	

El promedio de recuperación del estándar mezclado en el total de las muestras de orina es de 102 % y el CV. = 2.99.

$t_{ob} = 2.731$; $t_{tab} = 2.920$, nivel de significancia de 0.05

Cuadro 22. Resultados de exactitud para Spd .

Estándar Spd pmo	N. de Muestra	Muestra pmo	pmo totales	pmo hallados	ABC	% Recuperado	Promedio % Recuperado
3.95	5	2.7	6.65	6.42	8.10	96.54	98
				6.47	8.16	97.29	
				6.66	8.40	100.15	
3.63	5	2.7	6.33	6.26	6.65	98.89	95.20
				6.2111	6.60	98.10	
				5.61	5.96	88.62	
3.40	5	2.7	6.10	5.03	4.45	82.46	88.95
				5.60	4.95	91.80	
				5.65	5.00	92.62	

El promedio de recuperación del estándar mezclado en el total de las muestras de orina es de 94 % y el CV. = 3.98

$t_{ob} = 3.799$; $t_{tab} = 4.303$, nivel de significancia de 0.025

Cuadro 23. Resultados de exactitud para Spm.

Estándar Spm (pmo)	n.º de Muestra	Valor del pmo	pmo totales	pmo hallados	ABG	% Recuperado	Promedio % Recuperado
201.0	5	No detectada	201.0	190.6 188.9 199.5	8.96 8.88 9.00	94.82 93.98 99.25	96
180.9	5	No detectada	180.9	174.3 171.0 166.0	7.28 7.14 6.93	96.29 94.47 91.71	94.21
165.4	5	No detectada	165.4	134.0 145.3 145.3	4.90 5.32 5.32	81.21 88.06 88.06	85.56

El promedio de recuperación del estándar mezclado en el total de las muestras de orina es de 91.92 % y el C. V. = 4.69

$t_{ob} = 4.432$; $t_{tab} = 6.965$, nivel de significancia de 0.01

Cuadro 24. Resultados de exactitud 1,7-Diaminoheptano (DAH).

DAH pmo	n.º de Muestra	Muestra pmo	pmo totales	pmo hallados	ABG	% recuperado	Promedio % Recuperado
235.3	5	No detectado	235.3	94.84 94.84 107.35	11.22 11.22 12.70	89.47 89.47 101.27	93.4
207.0	5	No detectado	207.0	93.50 90.62 89.46	10.40 10.10 9.97	103.88 100.68 99.40	101.3

El promedio de recuperación del estándar mezclado en el total de las muestras de orina es de 97.3 % y el CV. = 4.05

-SENSIBILIDAD

Comprende límite de detección y límite de cuantificación.

En los siguientes cuadros se aprecia la concentración hallada de los analitos de interés para el límite de detección y cuantificación.

-Límite de detección:

Es la menor concentración de la muestra no cuantificada.

Cuadro 25. Concentraciones encontradas para el límite de detección.

LOD	pmol	ABC	Relación Señal / ruido
Pu	15.5	0.35	3.5
Spd	0.6	0.42	4.2
Spm	15.5	0.35	3.5
DAH	0.51	0.27	2.7

-Límite de cuantificación:

Es la menor concentración de la muestra determinada.

Cuadro 26. Concentraciones encontradas para el límite de cuantificación.

LOQ	pmol	ABC	Relación Señal / ruido
Pu	31.2	1.84	18.4
Spd	36.5	1.39	13.9
Spm	31.2	2.45	24.5
DAH	2.5	1.71	17.1

-Ejemplo de cromatogramas obtenidos

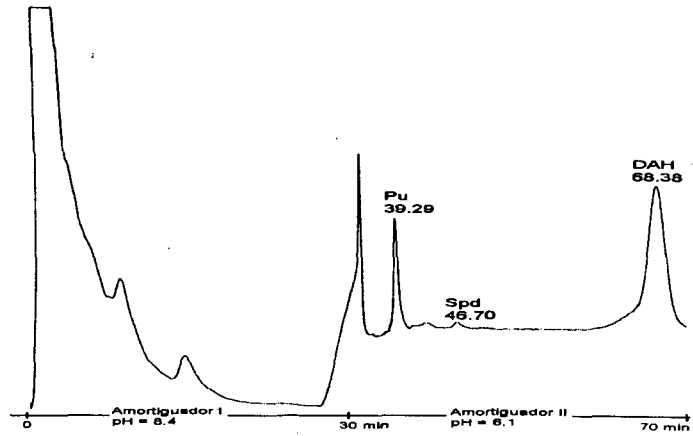


Figura 21. Cromatograma donde se analizó una muestra de orina de ratón sano, nótese el tamaño de los picos representativos de putrescina y espermidina, ausencia de espermina y el pico representativo del estándar interno DAH cada uno con su tiempo de retención respectivamente.

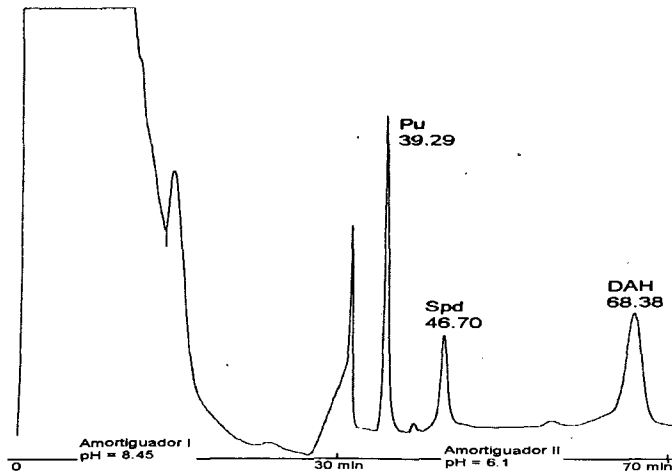


Figura 22. Cromatograma donde se analizó una muestra de orina de ratón con linfoma L5178Y, nótese el tamaño de los picos representativos de putrescina y espermidina, ausencia de espermina y el pico representativo del estándar interno DAH cada uno con su tiempo de retención respectivamente.

Resultados obtenidos al aplicar la técnica validada para analizar PAs por cromatografía de intercambio iónico.

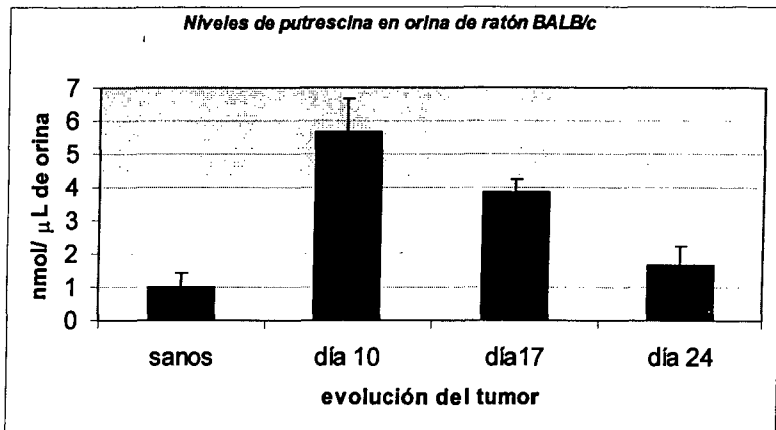


Figura 23 a. Gráfica de los niveles detectados de putrescina en muestra de orina de ratón sano y en distintos días de evolución del tumor (n = 5) por grupo los valores representan la media y desviación estándar.

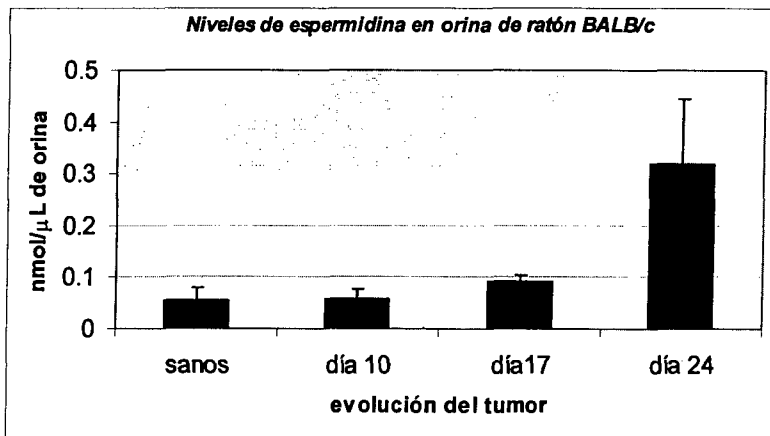


Figura 23 b. Gráfica de los niveles detectados de espermidina en muestra de orina de ratón sano y en distintos días de evolución de tumor (n = 5) por grupo los valores representan la media y desviación estándar.

VIII. DISCUSIÓN

El proceso de validación de cualquier técnica analítica representa la mejor manera de demostrar su control. Es importante mencionar que si se quiere lograr una validación económica en todos los sentidos; tiempo, costo y esfuerzo, la calidad de los equipos y de los insumos que se utilizan pueden ser determinantes así como la calidad y constancia en la preparación de los reactivos y muestras a analizar.

Por medio de las normas de validación preestablecidas como son la exactitud, linealidad, precisión, sensibilidad y selectividad; las cuales aportan confianza en datos, se logró evidenciar el grado de eficacia del sistema para el análisis de las PAs de nuestro interés logrando una separación adecuada y reproducible.

Se presentaron aspectos técnicos los cuales se superaron tales como el desuso del sistema cromatográfico, para superarlo primero se verifico la funcionalidad adecuada de cada parte del sistema, otro aspecto fue los altibajos en el voltaje lo cual se logro atenuar por medio de la conexión de reguladores de voltaje en los equipos electrónicos dado que el ruido se disminuye considerablemente al utilizar dichos aditamentos. Otro aspecto superado fue la fluctuación en las pulsaciones de las bombas recíprocas, que suele suceder que provoque una deriva del flujo (fase móvil) o cambio continuo que se genera por las pulsaciones del pistón, por lo cual se debe recalibrar sin dejar de pasar largos periodos de trabajo y también se reajusto el pH de la fase móvil, la literatura reporta un pH de 5.1 para el amortiguador II (Santerre, 1989) sin embargo, no proporcionó una adecuada separación de los picos de Spd y Spm ya que se traslapaban y para obtener una buena resolución de estas dos moléculas se realizaron análisis modificando el pH hacia más ácido (4.9) y hacia más básico (5.3, 5.5, 5.9 y 6.1), donde se observó que el pH de 6.1 proporcionó buena separación cromatográfica. Después de superar estos aspectos técnicos se prosiguió a realizar la validación.

Es interesante mencionar el caso de la Espermidina (Spd) ya que reportamos un límite de determinación a nivel 600 femtomoles tal como lo reportó Benson (1975), lo que demuestra que el equipo es eficiente. Putrescina (Pu) y Espermina (Spm) no alcanzan este límite, pero alcanza un nivel de detección que está en el intervalo de los picomoles.

Esto podría ser por el factor de respuesta que alcanza una molécula, el cual probablemente depende del equilibrio que logra dicha molécula dadas sus características físico-químicas al interactuar con la resina o fase estacionaria, así como la calidad de las soluciones, libres de impurezas (Benson, 1975), que se utilizan cotidianamente será trascendental para alcanzar la mejor sensibilidad.

Además es importante mantener los equipos cromatográficos en las condiciones adecuadas y en mantenimiento constante ya que de lo contrario, al tratar de hacer una validación de este, se puede enfrentar con un funcionamiento inapropiado que redundará en los resultados que se obtengan. En nuestro caso si el equipo, en lo que a sus vías de conexión se refiere, se le hace pasar agua bidestilada durante 2 o 3 jornadas laborales, se logra una mejor respuesta en el detector de fluorescencia probablemente debido a que la celda se limpia de impurezas, también se encuentra una mejor función en la electroválvula y el sistema de inyección, lo que evita que no existan obstrucciones en los puertos de entrada y salida a nivel de la válvula de inyección. En el caso del baño caliente que mantiene la temperatura de la columna a 73°C constantemente se ha observado que es necesario usar agua bidestilada dado que se forman depósitos de sales en la cara externa de la columna (entre la columna y la "camisa" con agua caliente) que impiden observar hacia el interior del tubo de vidrio donde se encuentra empacada la resina.

Se observó que el derivatizante *o*-phthalaldehído OPA es mejor utilizarlo dentro de 8 a 10 días de su preparación ya que posteriormente a ese periodo de tiempo se empieza a perder su eficiencia por lo cual no se obtiene una buena sensibilidad por parte del detector. En cuanto a la fase móvil es indispensable que se de un filtrado adecuado para que no lleguen partículas de suciedad a la parte superior de la columna lo cual sí sucediera se producirían obstrucciones en la resina al irse acumulando y no permitiría una buena separación de los analitos.

IX. CONCLUSIONES

Se logro estabilizar y mantener el sistema cromatográfico lo cual permitió una adecuada separación de las poliamidas de interés: putrescina, espermidina y espermina además de sus precursores, los aminoácidos secundarios ornitina y arginina.

La validación se realizo con éxito obteniendo así los diferentes parámetros de validación: exactitud, precisión, especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y linealidad los cuales proporcionaron valores aceptables.

Los datos obtenidos permitieron observar los distintos niveles de los analitos de interés: Pu, Spd y Spm, en orina de ratón sanos y con tumor L5178Y, con una resolución adecuada también para el 1,7-Diaminoheptano o estándar interno, logrando así ver las diferencias de cada una de estas moléculas en muestras de orina de ratones BALB/c .

X. PERSPECTIVAS

Aplicar el sistema cromatográfico en investigaciones en el área, tanto básica como aplicada que requieran de análisis cromatográfico por intercambio iónico proporcionando confianza a los resultados que se obtengan.

El presente trabajo es parte de una línea de investigación que pretende estudiar la relación que existe entre las poliaminas y el cáncer.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Belting, M.; Borsig, L.; Fuster, M. M.; Brown, J.; Persson, L.; Fransson, L.-A.; y Esko J. D. 2001. Tumor attenuation by combined heparan sulfate and polyamine depletion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99: 371-376.
- Benson, J. R.; y Hare, P.E. 1975. *O*-Phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 72: 619-622.
- Casero, R.A. Jr; y Pegg, A. 1993. Spermidine/Spermine N¹-acetyltransferase—the turning point in polyamine metabolisms. *FASEB J.* 7: 653-661.
- Cohen, S. 1998. A guide to the polyamines. Editorial: Universidad de Oxford. Nueva York. pp 15-56.
- Dabrio, M. V.; Blanch, G. P.; Cifuentes, A.; Díaz-Masa, J. C.; Frutos, M.; Herraiz, M.; Matfnez-Castro, I.; y Sanz, J. 2000. Cromatografía y electroforesis en columna. Editorial Springer. Barcelona España. pp 240-243.
- Delgado, L. 1998. Desarrollo de un método para medir el contenido de alcaloides en Lupinos por cromatografía de gases. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México.
- Fischer, R. B.; y Peters, D. G. 1970. Análisis químicos cuantitativos, tercera edición. Editorial Interamericana. México DF. pp 195.
- Flaschka, H. A.; Barnard, A. J. Jr.; y Sturrock, P. E. 1980. Química analítica cuantitativa, introducción a los principios, vol I. Editorial Continental. México DF. pp 549-551.
- Freiferdel, D. 1991. Técnicas de bioquímica y biología molecular. Editorial Reverté Barcelona España. pp 181.
- Gallardo, M.; Matilla, A.; Muñoz, P.; y Sánchez, I. 1996. Papel de las poliaminas en el crecimiento y desarrollo. *Ars. Pharm.* 37: 17-27.
- Herrera, M.; Dávila, L.; y Pérez, J. 1996. Conceptos básicos de química analítica. Instituto Politécnico Nacional. México DF. 42-45.
- Jeevanandam, M.; y Petersen, S.R. 2001. Clinical role of polyamine analysis, problem and promise. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 4: 385-390.

- Katime, I.; Katime, O.; y Katime, D. 1998. Cromatografía líquida, teoría y aplicaciones. Universidad de Guadalajara. México. pp 14-39.
- Khuhawar, M.Y.; y Qureshi, G.A. 2001. Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. *J. Chrom. B.* 764: 385-407.
- Krull, I.; y Swartz, M. 1997. Validation viewpoint. *LG GC. Mag. Sep. Sci.* 15: 534-54.
- Kumar, A.; Altabella, M. Taylor, A.; y Tiburcio, A. 1997. Recent advances in polyamines research. *Trends. Plant. Sci.* 2:124-130.
- Lan, L.; Trempus, C.; y Gilmour, S.K. 2000. Inhibition of ornithine decarboxylase (ODC) decreases tumor vascularization and reverse spontaneous tumor in ODC/Ras transgenic mice. *Cancer Res.* 60: 5696-5702.
- Manríquez, R. 1993. Desarrollo y validación de un método analítico para determinar benzimidazol en plasma por cromatografía de líquidos de alta presión. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Guadalajara. México.
- Morcillo, S. 1999. Agmatina; una amina biogénica poco conocida hasta el momento. *Encuentros en la biología.* Editorial Universidad de Málaga. España. no.55.
- Moulinoux, J-P.; Quemener, V.; Delcros, J-G. y Cipolla, B. 1996. capítulo 10 Circulating polyamines as biological markers for cancer; en: Nishioka, K. *Polyamines in cancer: basic mechanisms and clinical approaches.* Editorial Chapman and Hall. USA. pp 237-245.
- Muñoz, M. C. 1981. Métodos de separación, prácticas de instrumentación analítica, vol III. Editorial Limusa. México. pp 17-24.
- Nathan, P. 1975. Separaciones Cromatográficas. Asociación Nacional de Universidades e Institutos de Enseñanza Superior. Editorial ANUIES. México. pp 11-22.
- Nishioka, K. 1996. Introduction to polyamines: polyamines in cancer basic mechanisms and clinical approaches. Editorial chapman and Hall. Houston USA. 4.

- Oredsson, S. M. 2003. Polyamine dependence of normal cell-cycle progression. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 366-369.
- Prieto, S.; Amich, S.; y Salve, M. L. 1993. Laboratorio clínico. Principios generales. Interamericana-McGraw hill, Madrid España. pp 9.
- Pegg, A. 1988. Polyamine metabolisms and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Res.* 48: 759-774.
- Peña, M. E. 2003. Seminario: avances y aplicación de la instrumentación analítica en la industria química, cromatografía de líquidos. Perkin Elmer.
- Persson, L.; Holm, I.; Ask, A.; y Heby, O. 1998. Curative effect of DL-2 Difluoromethylornithine on mice bearing mutant LI210 leukemia cell deficient in polyamine uptake. *Cancer Res.* 48: 4807-4811.
- Salkind, N. J. 1999. Métodos de investigación, tercera edición. Prentice hall. Edo. México. pp 317-338.
- Santerre, A. 1989. Contribution a L'étude du dépérissement forestier a l' aide d'un système multianalitique assisté par ordinateur: Etude des affects biochimiques de la pollution atmosphérique sur l' épicea. Doctorado en Ciencia. Université Paris-Sud. 191.
- Schipper, R. G.; Romijn, J. C.; Cuijpers, V. M.; y Verhofstad, A. A. 2003. Polyamines and prostatic cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 375-380.
- Skoog, D.; y West, D. 1982. Análisis instrumental, Métodos de fraccionamiento cromatográfico y de otras clases. Editorial Interamericana. México. pp 606-639.
- Skoog, D.; y West, D. 1987 . Análisis Instrumental, segunda edición, Introducción a la cromatografía. Editorial Interamericana. México. pp 697-743.
- Spectra Physics 4200, Operators manual. 1982. Spectra-Physics. Section 4: Data reduction.USA. pp 7.
- Srinath, P.; McQuarrie, S. A.; y Suresh, M. R. 2002. Comparative uptake of polyamines by prostate and non-prostate cancer cell lines. *Nucl. Med. Biol.* 29: 497-503.
- Suh, J.; Lee, S.; Chung, B.; y Park, J. 1997. Urinary polyamines evaluation for effective of various cancers. *J. Chrom. B.* 688: 179-186.

- Thomas, T.; y Thomas, T.J. 2001. Polyamines in cell growth and cell death: mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 244-258.
- Villanueva, V.; y Adlakha, R. 1978. Automated análisis of common basic amino acid, mono-di- and poliamines, phenolicamines, and indoleamines in crude biological samples. *Anal. Biochem.* 91: 264-275.
- Villanueva, V.R.; Mardon, M.; y Le Goff, M. 1986. A new high performance chromatographic method for polyamines analysis in *Picea* needles, without previous extract purification. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 25: 115-125.
- Walters, D.; y Mackintosh, C. 1997. Fungicidal activity of two spermidine analogues. *J. Phytopathol.* 145: 43-45.
- Wallace, H. M.; y Caslake, R. 2001. Polyamines and colon cancer. *Eur J Gastroenterol. and Hepatol.* 13:1033-1039.
- Waters, (Filtros GOVE). 2002. Seminarios HPLC, Guadalajara 2002. Consulte www.waters.com/Guadalajara2002/index.html.
- Weiss, T.S.; Thasler, W. E.; Dolgner D.; y Jauch, K-W. 2002. Polyamine levels of human colorectal adenocarcinomas are correlated with tumor atage and grade. *J. Colorectal Dis.* 17: 381-387.
- Willard, H.; H. Merritt, L. A.; Dean, J. A.; y Settle, F. A. 1991. Métodos instrumentales de análisis. *Cromatografía de líquidos de alto rendimiento*. Editorial Iberoamérica. México DF. pp 603-632.
- www.e-stadistica.bio.ucm.es/web-spss (Agosto del 2003).