



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN  
DE NEUROTRANSMISORES MEDIANTE ELECTROFORESIS  
CAPILAR CON DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA  
INDUCIDA POR LÁSER

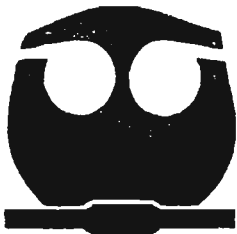
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

PERLA DEL ROCÍO MORENO CASTILLA



MÉXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2005

0348155



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: PROF. FRANCISCO ROJO CALLEJAS**  
**VOCAL: PROF. GEORGINA ARTEMISA DUARTE LISCI**  
**SECRETARIO: PROF. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI**  
**1ER SUPLENTE: PROF. RICARDO RODRÍGUEZ SAENZ**  
**2DO SUDLENTE: PROF. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE APRENDIZAJE Y MEMORIA, DEPARTAMENTO DE  
NEUROCIENCIAS, INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR, UNAM.**



---

**DR. FEDERICO BERMUDEZ RATTONI**  
**ASESOR DEL TEMA**



---

**PERLA DEL ROCÍO MORENO CASTILLA**  
**SUSTENTANTE**

Este trabajo fue realizado en el laboratorio BL-201 del  
Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México,  
bajo la dirección del **Dr. Federico Bermúdez Rattoni**, con  
apoyo económico de **CONACyT 42657 Q** y **DGAPA IX202504-15**.

*A mis padres, María Soledad Castilla de la Fuente y Moisés Moreno Manríquez, con todo mi amor, gracias por ser mis amigos, por su cariño, atenciones, apoyo y por enseñarme desde matemáticas y física hasta el mejor método para tomar decisiones. Les debo lo que soy, todos mis logros son suyos también.*

*A mis hermanas, Lucero Esmeralda Moreno Castilla, Iris Rubí Moreno Castilla, y Adela Salazar Espino, excelentes amigas y contemporáneas. Han sido las mejores compañeras de juegos desde la infancia y confidentes incondicionales. Gracias por su ayuda, comprensión y consejos.*

*A mis tíos Nefis Espino de la Fuente y Daniel Salazar Lazcano, quienes me impulsan y dan ánimo, son mi soporte, mi estabilidad, mi familia.*

*A Quetzalcóatl Hernández, eres la parte más feliz de mi día, mi amigo, mi consejero, mi amor. Gracias por toda tu ayuda con mis materias, exámenes, elecciones y sobre todo por completar el círculo.*

*Al resto de mis tíos y primos, en especial a mi tío Gandhi porque no olvidó su cariño y ayuda durante mis primeros años de escuela, Muchas gracias a todos.*

# Agradecimientos

*A todos mis profesores en la Facultad de Química de la UNAM y en el IMIQ, en especial a Sergio Arzamendi, Erika Gómez y Raquel Hernández Meneses, quienes me encaminaron a la ciencia, incubándome amor por la química.*

*A mi tutor, el Dr. Federico Bermúdez Rattóni, gracias por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su ayuda, apoyo, consejos, confianza y por la libertad intelectual que me entregó, pues fue el mejor aliciente para aprender más y desarrollarme.*

*A Kjojo Guzman Ramos, mi amiga, cómplice en el laboratorio y compañera, muchas gracias por tu indispensable ayuda y por abrirme espacio en tu vida. Estoy feliz de haberte conocido pues en un año de trabajo conseguí una amistad para toda la vida.*

*Al M. en C. Franciso Rojo Callejas, gracias por su guía durante el desarrollo de cada experimento, por su amistad y por aclararme los misterios de la EC.*

*A la distinguida profesora que es parte de mi jurado: Georgina Duarte Lisci, por las valiosas observaciones al presente trabajo que me ayudaron a mejorarlo. Gracias por su tiempo.*

*A Leticia Ramírez Lugo, gracias por la confianza, por acogerme en el laboratorio y enseñarme, por motivarme y ser mi amiga.*

*A mis amigas, Tamara Virgilio, Cristina Gil, Yessica Ramírez y Berenice Vite gracias por ser la mejor compañía desde el primer semestre de la carrera y porque desde entonces he podido contar con ustedes en cada momento. Les debo los mejores, más divertidos e importantes recuerdos en la facultad.*

*A mis amigos, Hugo, Carlos y Ricardo, les agradezco sinceramente su apoyo, compañía y amistad. Gracias porque siempre están allí.*

*A mis amigos Vany Vi, Rosalba, Juanma, los mejores equipos de trabajo, gracias por escucharme y acompañarme.*

*A Magali Arellanes Martínez, mi más vieja y mejor amiga, gracias por todos los años de compañía.*

*A Luis Royero, Luis Nuñez, Rodrigo, Tomás y Sergio, gracias por recibirme como su amiga y por procurarme ánimo y sus mejores deseos en todo momento.*

---

---

## ÍNDICE GENERAL

### I. INTRODUCCIÓN

1.1. La sinapsis química y los neurotransmisores .....	( 1 )
1.1.1. Comunicación neuronal	
1.1.2. Los Neurotransmisores	
1.1.3. Monitoreo de la liberación de los neurotransmisores	
1.2. Electroforesis capilar .....	( 5 )
1.2.1. Instrumentación .....	( 6 )
1.2.2. Movilidad electroforética y flujo electroosmótico .....	( 10 )
1.2.3. Tipos de Electroforesis Capilar .....	( 12 )
1.2.4. Cromatografía Electrocinética Micelar .....	( 14 )
1.2.5. Detectores en EC .....	( 24 )
1.2.5.1. Detección por fluorescencia inducida por láser.....	( 25 )
1.2.5.2. Procedimientos de derivatización .....	( 27 )

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	( 31 )
-------------------------------------	--------

### III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Condiciones de análisis .....	( 33 )
3.2. Subproceso muestreo .....	( 34 )
3.2.1. Implantación de la cánula guía	
3.2.2. Microdiálisis	

---

---

<b>3.3. Subproceso Tratamiento de la muestra</b> .....	( 36 )
3.3.1. Estabilidad del microdializado	
3.3.2. Reacción de derivatización	
<b>3.4. Subproceso Medición</b> .....	( 37 )
3.4.1. Variables del amortiguador de corrida	
3.4.2. Variables del equipo	
3.4.3. Variables en la muestra	
<b>3.5. Subproceso Manejo de datos</b> .....	( 38 )
<b>3.6. Análisis de muestras</b> .....	( 38 )
<b>3.7. Preparación de las disoluciones</b> .....	( 38 )
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1. Condiciones iniciales de análisis.....	( 40 )
4.2. Muestreo por microdiálisis .....	( 43 )
4.3. Tratamiento de la muestra .....	( 44 )
4.4. Cromatografía Electrocinética Micelar.....	( 53 )
4.5. Calibración inicial.....	( 67 )
4.6. El procedimiento analítico y los parámetros de desarrollo del método .....	( 69 )
4.7. Cuantificación en muestras biológicas .....	( 70 )
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	( 74 )
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	( 76 )



---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. La sinapsis química</b> .....	( 2 )
<b>Figura 2. Microdiálisis</b> .....	( 4 )
<b>Figura 3. Esquema básico de un equipo de EC</b> .....	( 7 )
<b>Figura 4. Tipos de inyección en EC</b> .....	( 8 )
<b>Figura 5. Movilidad neta</b> .....	( 9 )
<b>Figura 6. Flujo electroosmótico</b> .....	( 11 )
<b>Figura 7. Esquema de separación por MEKC</b> .....	( 15 )
<b>Figura 8. Estructura química de surfactantes aniónicos</b> .....	( 17 )
<b>Figura 9. Perfiles de velocidad</b> .....	( 18 )
<b>Figura 10. Mecanismo de reacción de FQ con amina primaria</b> .....	( 29 )
<b>Figura 11. Implantación de la guía cánula</b> .....	( 35 )
<b>Figura 12. Electroferograma</b> .....	( 42 )
<b>Figura 13. Electroferograma</b> .....	( 50 )
<b>Figura 14. Electroferograma</b> .....	( 51 )
<b>Figura 15. Electroferogramas</b> .....	( 55 )
<b>Figura 16. Electroferogramas</b> .....	( 61 )
<b>Figura 17. Electroferograma</b> .....	( 64 )
<b>Figura 18. Variación del ABC</b> .....	( 65 )
<b>Figura 19. Cinética de liberación de norepinefrina con sacarina</b> .....	( 71 )
<b>Figura 20. Cinética de liberación de glutamato durante la inyección de LiCl</b> .....	( 72 )
<b>Figura 21. Comparación de dos registros de liberación</b> .....	( 72 )

---

---

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tipos de EC .....	( 12 )
<b>Tabla2.</b> Propiedades de deoxicolato de sodio .....	( 17 )
<b>Tabla 3.</b> Métodos de detección en EC .....	( 24 )
<b>Tabla 4.</b> Reactivos de derivatización para aminoácidos-catecolaminas .....	( 28 )
<b>Tabla 5.</b> Condiciones iniciales de análisis .....	( 40 )
<b>Tabla 6.</b> Influencia de la mezcla antioxidante .....	( 45 )
<b>Tabla 7.</b> Estabilidad de las soluciones stock .....	( 46 )
<b>Tabla 8.</b> Estabilidad a largo plazo del microdializado .....	( 47 )
<b>Tabla 9.</b> Estabilidad de la muestra preparada .....	( 48 )
<b>Tabla 10.</b> EC vs HPLC .....	( 75 )

---

---

## RESUMEN

El estudio de los procesos bioquímicos que están involucrados en el aprendizaje y la memoria permiten su caracterización y entendimiento. Los resultados obtenidos gracias a la investigación básica, serán aprovechados por la investigación aplicada y el desarrollo tecnológico, entre otras cosas para el diagnóstico oportuno de trastornos del aprendizaje y la memoria y para el desarrollo de nuevas y mejores terapias contra estas enfermedades.

Resulta esencial para las ciencias químicas y bioquímicas el análisis de muestras biológicas complejas con el fin de conocer los compuestos presentes y su concentración. En particular, en el estudio de los procesos de aprendizaje y memoria, las muestras obtenidas por microdiálisis del espacio intersticial celular en estructuras cerebrales de ratas, arrojan información valiosa respecto a las sinapsis químicas necesarias para que se complete una tarea, de esta manera es posible elucidar los procesos bioquímicos que se llevaban a cabo en el momento del muestreo. Estas muestras son sumamente complejas y aunque únicamente contienen moléculas de pequeño tamaño molecular, están cargadas de una gran variedad de compuestos con diversas propiedades que son susceptibles a la degradación si se encuentran en condiciones desfavorables, asimismo el tamaño de la muestra está muy limitado por el tamaño de la estructura cerebral que se desee monitorear y por el tiempo en el que se dispara una señal, además de que se requiere la discriminación completa de los compuestos de interés, los cuales representan un porcentaje mínimo de la muestra y se encuentran mezclados con otros de estructura y propiedades muy semejantes. Por todas estas condiciones, es necesario un sistema de separación muy eficiente y una detección sumamente sensible y específica.

---

---

La electroforesis capilar ha tenido un enorme impacto en la investigación bioquímica debido a que proporciona una alta resolución en la separación de compuestos estructuralmente muy similares a partir de matrices complejas. Aprovechando las ventajas que ofrece esta técnica, en comparación con la HPLC, se desarrolló un método analítico que conjunta el empleo de la técnica de microdiálisis durante el subproceso muestreo, la separación y detección de los neurotransmisores de interés mediante cromatografía electrocinética micelar (modalidad de electroforesis capilar) con detección por fluorescencia inducida por láser.

Debido a las exigencias determinadas por la muestra de interés, la detección por fluorescencia inducida por láser fue seleccionada para alcanzar una alta sensibilidad, esto obligó a incluir un procedimiento de derivatización durante el subproceso tratamiento de muestra y a la vez, debido a la similitud estructural de los derivatizados formados, fue necesario usar una modalidad de la electroforesis capilar más compleja, por lo que se implementó la separación por cromatografía electrocinética micelar.

El método desarrollado comprobó ofrecer respuestas lineales durante el rango de concentraciones elegidas para cada neurotransmisor, resultó completamente automático y demostró ofrecer una mejor resolución temporal en la cinética de liberación de glutamato y norepinefrina, en comparación con otro método por HPLC, con detector de fluorescencia inducida por láser.

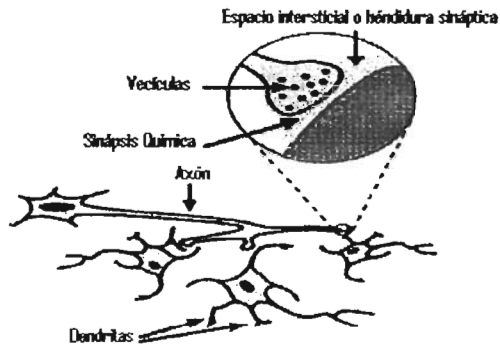
## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. LA SINAPSI QUÍMICA Y LOS NEUROTRANSMISORES**

#### **1.1.1. Comunicación neuronal**

El encéfalo humano contiene alrededor de 100 000 millones de neuronas [1], cada una con la capacidad de establecer contactos con muchas otras células. Para que la comunicación entre este gran número de elementos se efectúe es necesario un mecanismo altamente eficiente llamado sinapsis, que se refiere a los contactos funcionales entre neuronas. Los tipos de sinapsis se pueden dividir en dos grupos generales: Las sinapsis eléctricas y las sinapsis químicas.

Las sinapsis químicas permiten la comunicación a través de la secreción de neurotransmisores; en este mecanismo, los agentes químicos que son liberados por las neuronas presinápticas producen un flujo secundario de corriente en las neuronas postsinápticas al activar moléculas receptoras específicas. La secreción de los neurotransmisores se activa por canales de calcio activados por voltaje, los cuales elevan los niveles de calcio en el interior de la terminación presináptica, y esto favorece que las vesículas sinápticas (organelos presinápticos que almacenan neurotransmisores) se fusionen con la membrana y liberen su contenido en el espacio intersticial entre las células presinápticas y postsinápticas (Figura 1), luego de esta exocitosis los neurotransmisores se difunden en toda la hendidura sináptica y se unen a receptores específicos ubicados sobre la membrana de la neurona postsináptica. Con la interacción del neurotransmisor con su receptor, se abren o cierran los canales de la membrana, aumentando o disminuyendo la probabilidad de que la neurona dispare un potencial de acción.



**Figura 1.** La sinapsis química

Modificado de Herminia Pasantes, *De neuronas, emociones y motivaciones*, México 1997 Fondo de Cultura Económica, Capítulo I.

### 1.1.2. Los Neurotransmisores

Los neurotransmisores son señales químicas liberadas por las terminales nerviosas presinápticas en el espacio sináptico. Los neurotransmisores son moléculas sintetizadas, empaquetadas y liberadas por vesículas en la célula presináptica, que se unen a sus receptores en una o más células postsinápticas y que son rápidamente eliminadas o degradadas. Existen muchas moléculas que actúan como neurotransmisores y que pueden clasificarse de acuerdo al tamaño de la molécula en neurotransmisores de molécula pequeña y neuropeptidos (formados a partir de 3 a 36 aminoácidos).

Los neurotransmisores de molécula pequeña son, de acuerdo a su naturaleza química:

- Catecolaminas: dopamina, noradrenalina y adrenalina.
- Aminoácidos: glutamato, aspartato, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y glicina.
- Acetilcolina (de estructura lineal)
- Serotonina (con núcleo indólico)
- Histamina (núcleo de imidazol)

Como se comentó anteriormente, los neurotransmisores son producto de la comunicación neuronal vía sinapsis química, por lo que cada vez que un organismo requiera establecer, inhibir o modificar este tipo de comunicación, se alterará la liberación de los neurotransmisores y por tanto su concentración en el espacio intersticial.

Partiendo de este hecho, se han desarrollado numerosas investigaciones donde se demuestra que la concentración de uno o varios neurotransmisores correlaciona con un estado fisiológico determinado. Principalmente se ha logrado describir la presencia de neurotransmisores de molécula pequeña en función de algunos desordenes neurológicos, patologías específicas, dosificación de fármacos, efectos neurotóxicos de algunas drogas y en función del comportamiento y percepción de estímulos externos [2,3].

### **1.1.3. Monitoreo de la liberación de los neurotransmisores**

Entre los estudios que se han desarrollado monitoreando el nivel de cierto neurotransmisor en función de alguna actividad se encuentran los practicados durante las tareas de aprendizaje y memoria. En particular durante el aprendizaje gustativo se ha descrito la relación que se guarda entre los niveles de dopamina, acetilcolina, glutamato y norepinefrina con la presentación de un estímulo gustativo nuevo, un estímulo gustativo familiar, el condicionamiento aversivo a los sabores<sup>1</sup> y con el aprendizaje de lo seguro<sup>2</sup> [4, 5, 6, 7,8]. El estudio de los niveles de la liberación de neurotransmisores a lo largo de una tarea cognoscitiva, podría permitir elucidar los procesos bioquímicos involucrados, así como descubrir y enlistar las estructuras o regiones neuronales participantes.

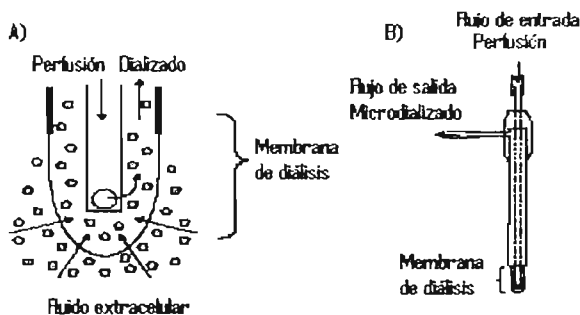
---

<sup>1</sup> Asociación de un estímulo gustativo nuevo con un malestar gástrico (comúnmente inducido por la inyección intraperitoneal de cloruro de litio), lo que conduce a que dicho sabor sea clasificado como aversivo. El animal aprende que no debe consumir el alimento con ese sabor.

<sup>2</sup> Clasificación de un nuevo sabor como seguro pues no se asocia con ningún malestar.

La principal técnica que permite monitorear la presencia de moléculas pequeñas en el espacio extracelular en tejidos vivos es la Microdiálisis, ésta consiste en el intercambio de moléculas a través de una membrana semipermeable, siguiendo gradientes de concentración, lo que permite extraer o introducir sustancias en matrices químicas complejas.

El muestreo por microdiálisis consiste en la perfusión de una solución isotónica que fluye lentamente desde un lado de la membrana y que entra en contacto con el espacio intersticial de una estructura o tejido de interés al otro lado de la membrana, la solución isotónica alcanza el equilibrio con respecto al fluido extracelular del tejido y así el analista recupera una solución que contiene una proporción representativa de los compuestos extracelulares presentes al momento del muestreo, de manera que un análisis cuantitativo de las moléculas recolectadas en las fracciones de microdializado refleja el patrón de liberación temporal en el fluido extracelular. (Figura 2).



**Figura 2. Microdiálisis: (A) Migración de las moléculas a través de la membrana de microdiálisis (B) Diseño comercial de la membrana y tubería para microdiálisis en ratas. Modificado de Monika Orłowska-Majdak [9].**

Las muestras obtenidas por microdiálisis se analizan por distintas técnicas de separación e identificación, lo que nos permite, dependiendo del tipo e instrumento de análisis, desde simplemente estar al tanto de la presencia o ausencia de una molécula, hasta determinar la concentración exacta de una serie de compuestos presentes en la muestra.



La técnica más usada para analizar las muestras obtenidas por microdiálisis en sistema nervioso central, específicamente para determinar neurotransmisores, ha sido la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección UV, y con detección electroquímica, siendo la última la más usada ya que resulta selectiva, muy sensible y ofrece alta eficiencia en la separación, además es posible encontrar métodos analíticos bien establecidos y fáciles de montar en el laboratorio y existe la opción de comprar paquetes de reactivos (o Kits) que contienen todo lo necesario para el análisis, incluyendo el procedimiento a seguir.

A pesar de todas estas ventajas que ofrece la CLAR, la detección electroquímica debido a que es muy selectiva, limita el análisis a compuestos de la misma naturaleza química, y requiere de columnas y condiciones específicas para neurotransmisores de distinta naturaleza, además el volumen de muestra mínimo requerido es de 20 a 30  $\mu\text{L}$ , lo que implica un monitoreo poco detallado en función del tiempo.

Una técnica analítica novedosa que compensa las desventajas de la CLAR en el análisis de este tipo de muestras, es la Electroforesis Capilar (EC), la cual al acoplarse a un detector de fluorescencia inducida por láser (LIF), permite el análisis simultáneo tanto de aminoácidos como catecolaminas sin restringir la sensibilidad y requiere únicamente de 5  $\mu\text{L}$  de muestra, usando sólo algunos nanolitros para el análisis, lo que conduce al seguimiento detallado de la liberación de neurotransmisores por microdiálisis.

## **1.2. ELECTROFORESIS CAPILAR**

La electroforesis capilar (EC) es una técnica analítica instrumental de separación, la cual permite la determinación y cuantificación de los analitos una vez separados, al encontrarse acoplada al detector adecuado.

La EC puede ser considerada como una nueva modalidad de la electroforesis porque ambas comparten sus fundamentos básicos, es decir, la separación se da en función de la migración de especies cargadas a través de un soporte por la influencia de un campo eléctrico provocado al aplicar un voltaje, de esta manera los cationes migran hacia el electrodo negativo (cátodo) y los aniones migran hacia el electrodo positivo (ánodo), obteniendo así una movilidad particular para cada analito que está función de sus propiedades moleculares intrínsecas tales como carga eléctrica neta y tamaño.

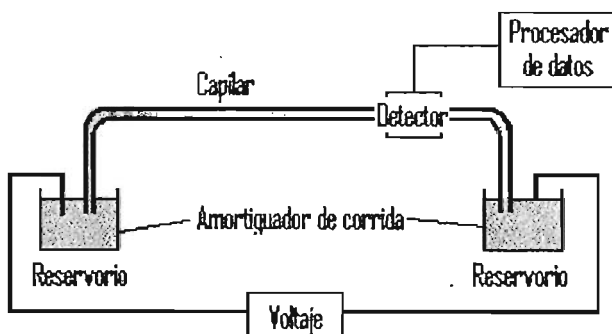
La electroforesis en capilar se refiere a la migración de especies cargadas que se encuentran disueltas o suspendidas en un electrolito dentro de un tubo capilar de diámetro muy pequeño. El uso de capilares como canales para la electromigración, ofrece varias ventajas con respecto a los soportes sólidos convencionales (electroforesis en papel, en gel de poliacrilamida o agarosa), entre éstas la más importante es la eficiente dispersión del calor de Joule (el calor generado por un medio conductor al aplicarse en él una diferencia de potencial), lo cual permite aplicar un voltaje de hasta 30 000 volts, al hallarse el capilar en un compartimiento termostatzado, lo que resulta en un tiempo de análisis substancialmente menor, así mismo gracias al pequeño diámetro interno del capilar se requieren volúmenes de muestra muy pequeños para el análisis y son necesarios tan sólo unos mililitros de amortiguador como medio de separación, además la detección de los analitos se lleva a cabo en el momento mismo de la separación pues el detector se encuentra acoplado a la columna capilar, evitando así un paso extra para el revelado por tinción, típico en electroforesis en gel.

### **1.2.1. INSTRUMENTACIÓN**

A pesar de que la EC es una técnica relativamente nueva, ha tomado un gran impulso y cada vez son más los trabajos que se desarrollan usándola, por esto la demanda de equipos comerciales ha ido en aumento y actualmente es posible encontrar instrumentos completamente automatizados y con opción a diferentes detectores.

En la **Figura 3** se muestra un diagrama con los elementos básicos que componen un equipo de EC, este dispone de una fuente de alimentación variable que puede suministrar hasta 30 KV durante la separación, un capilar de sílice fundida recubierto con poliimida, un sistema de estabilización de la temperatura (que puede ser un tubo que contenga al capilar a todo lo largo y a través del cual fluya un líquido refrigerante), reservorios para el amortiguador de corrida y un detector.

Durante la separación tanto el capilar como los electrodos de platino se sumergen dentro de los viales que contienen el amortiguador de corrida, lo que permite establecer contacto eléctrico entre una fuente de poder de alto voltaje y la solución del interior de la columna capilar.



**Figura 3.** Esquema básico de un equipo de electroforesis capilar  
Modificado de James P. Landers [10].

La inyección de la muestra se realiza reemplazando uno de los viales con amortiguador de corrida, por otro vial que contiene la muestra en solución. Es posible practicar dos tipos de inyecciones, la inyección electrodinámica o la inyección electrocinética (**Figura 4**), la primera consiste en aplicar presión positiva o negativa durante algunos segundos, con ayuda de una bomba y la segunda en aplicar un campo eléctrico, de cualquier modo, la muestra es cargada dentro del capilar para comenzar o continuar la separación aplicando voltaje.

Una vez dentro del capilar, los compuestos migran en función de sus propiedades y recorren el capilar de punta a punta en un orden único y reproducible para cada compuesto bajo las mismas condiciones. En la sección final del capilar se encuentra una ventana donde se acopla el detector, lo que permite el registro del análisis y el trazo del electroferograma.

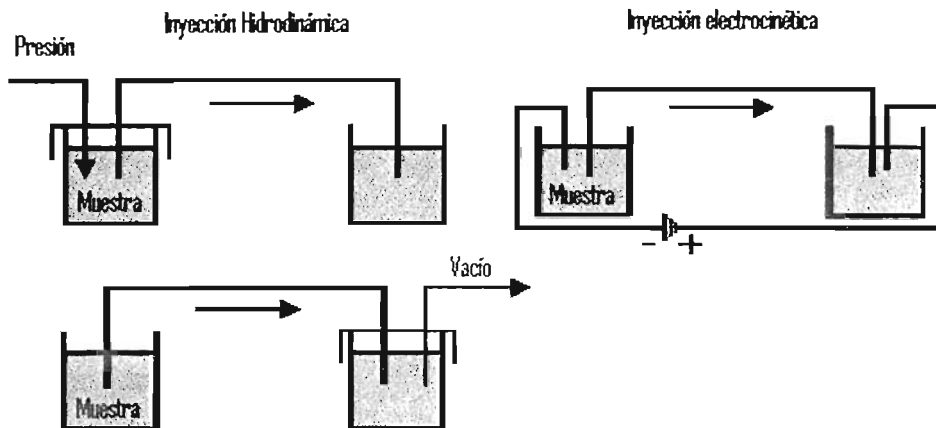


Figura 4. Tipos de inyección en Electroforesis capilar

Las columnas capilares usualmente son de sílice fundida, material que resulta ideal por ser química y eléctricamente inerte, transparente a la mayoría de los detectores, flexible y económico; sin embargo la sílice fundida es frágil por lo que es necesario recubrir el capilar con una capa de poliimida, polímero que le confiere dureza y le permite ser manejable, pero que interfiere con la detección, por lo que se raspa una porción de este recubrimiento para formar una ventana transparente de aproximadamente de 2 mm, justo donde se coloca el detector. El diámetro interno del capilar varía desde 50 $\mu$ m hasta 100 $\mu$ m y su longitud se elige desde 10 cm hasta 100 cm, considerando que un capilar más corto permite un análisis más rápido.

La separación por EC de distintos compuestos en una muestra, se da gracias a las diferentes movilidades que adquieren compuestos de diferente naturaleza química, con las condiciones de separación seleccionadas. La movilidad neta de un compuesto ( $\mu_T$ ), se encuentra descrita, en términos generales de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\mu_T = (\mu_{EF} + \mu_{EO}) E$$

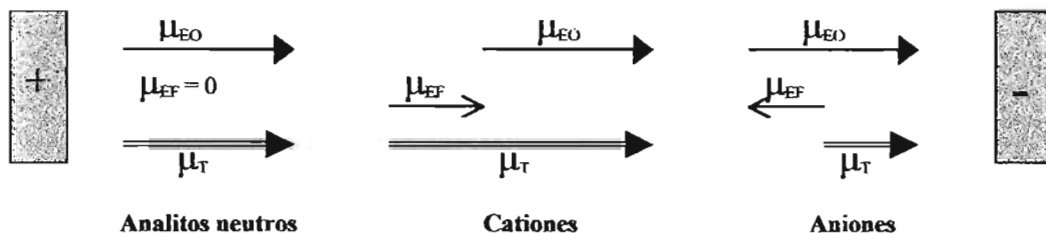
Donde,  $\mu_{EO}$  es la movilidad electroosmótica o flujo electroosmótico (FEO) y  $\mu_{EF}$  es la movilidad electroforética o flujo electroforético (FEF). El primero corresponde al movimiento de cationes atraídos por la carga negativa que adquiere la pared del capilar a niveles altos de pH y el segundo es el movimiento propio de los analitos en función de su carga eléctrica neta y su tamaño.

La movilidad neta que adquirirá una analito durante la separación, dependerá entonces de sus propiedades moleculares intrínsecas y del FEO. Dependiendo de la carga del analito de interés, el FEO puede frenar su movilidad o favorecerla.

En la **Figura 5**, se esquematiza el efecto del FEO sobre la movilidad neta de analitos con carga eléctrica neta positiva, negativa y neutra, cuando el electrodo positivo se coloca en el vial de entrada y el electrodo negativo está en el vial de salida (polaridad normal).

**Figura 5.** Movilidad neta

Los analitos neutros migran gracias a la movilidad del flujo electroosmótico, la movilidad de los cationes aumenta debido a que se da en la misma dirección que el FEO y la movilidad de los aniones disminuye por ir en contra del FEO. Los compuestos con mayor  $\mu_T$ , serán los primeros en ser detectados



### 1.2.2. MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA Y FLUJO ELECTROOSMÓTICO

La separación de una muestra por EC ocurre al estar disuelta o suspendida en el amortiguador de corrida dentro del capilar, los compuestos iónicos migran de acuerdo a su carga eléctrica neta y a su tamaño a una velocidad y dirección única para cada molécula, lo que se registra como tiempo de migración. Como se explicó antes, a éste desplazamiento particular de cada compuesto se le conoce como  $\mu_{EF}$  y está definida de acuerdo a la teoría Debye-Huckel-Henry con la siguiente ecuación:

$$\mu = q / 6 \pi \eta r$$

Donde  $q$  es la carga de la partícula,  $\eta$  es la viscosidad del amortiguador de corrida y  $r$  es el radio de la partícula. Por lo tanto La movilidad electroforética es directamente proporcional a la carga neta del compuesto e inversamente proporcional a su tamaño y a la viscosidad del soporte de separación.

Así un analito con carga negativa se dirigirá al ánodo con una movilidad electroforética mayor que un compuesto menos negativo y a la vez ambos tendrán mayor movilidad electroforética que un compuesto con carga positiva, así mismo una molécula negativa pequeña presentará menor fricción que una molécula de la misma carga pero de mayor tamaño y por tanto tendrá un tiempo de migración menor, correspondientemente todos los compuestos migrarán más rápido a medida que el amortiguador de corrida sea menos viscoso. En resumen, a polaridad normal, primero migrarán y se registrarán los compuestos más positivos de menor tamaño, luego los compuestos neutros (sin separarse) y finalmente los compuestos con carga negativa.

Si la movilidad electroforética fuera la única participante en la separación por EC, en un análisis a polaridad normal, sólo se registrarían los compuestos con carga positiva, pues los neutros y los de carga negativa no son atraídos por el cátodo y permanecerían estáticos en un punto dentro del capilar. La detección de moléculas positivas, negativas y neutras en un mismo análisis se explica por efecto del flujo electroosmótico.

El FEO es aquel producido por el desplazamiento de una capa de iones positivos hacia el cátodo. Esta capa móvil se forma debido a que a un pH mayor a 7, los grupos silanol de la pared interna del capilar de sílice fundida se encuentran en su mayoría ionizados y adquieren una carga neta negativa que atrae fuertemente a los cationes del electrolito de fondo (Figura 6), la atracción que ejerce la carga negativa del capilar sobre un catión, disminuye a medida que el catión se encuentra más alejado de la pared, así los cationes más cercanos forman una capa positiva fija y los más alejados forman capas que se desplazan hacia el cátodo. El flujo electroosmótico será más fuerte a medida que el pH del amortiguador de corrida sea más alto y los grupos silanol se encuentren más ionizados, por lo que en un análisis a polaridad normal el flujo electroosmótico empuja hacia el cátodo tanto a los compuestos neutros como a los de carga negativa.

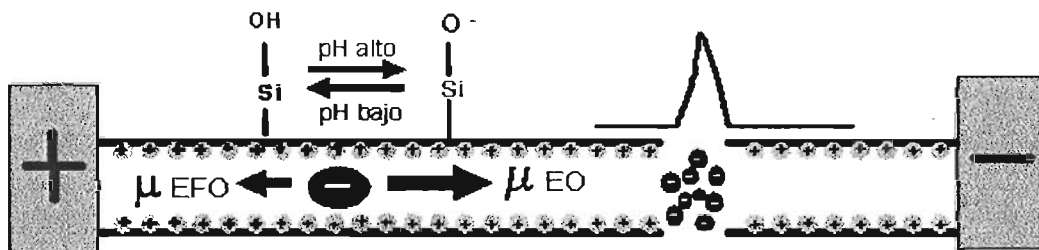


Figura 6. Flujo electroosmótico

Se conoce como Electroforesis capilar de zona (ECZ) al tipo más sencillo de separación por EC, donde la separación de los compuestos está en función únicamente de la movilidad electroforética y del flujo electroosmótico, pero existen más géneros de separación por EC.

### 1.2.3. TIPOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR

La *electroforesis capilar* es una familia de técnicas que comparten los mismos principios básicos pero poseen diversas modificaciones que permiten la separación de prácticamente cualquier matriz. El tipo de EC que se usará para el análisis de una muestra debe ser elegido en función de las propiedades de los analitos de interés (Tabla 1) [10].

**Tabla 1.**  
Tipos de EC para el análisis de diversos analitos [10]

Iones pequeños	Moléculas pequeñas	Péptidos	Proteínas	Oligonucleótidos	DNA
ECZ	CECM	ECZ	ECZ	ECG	ECG
ITF	ECZ	ITF	ECG	CECM	
	ITF	CECM	EIC		
		EIC	ITF		
		ECG			

ECZ: Electroforesis Capilar de Zona

MEKC o CECM: Cromatografía Electrocinética Micelar

ITF: Isotacoforesis

EIC: Enfoque isoelectrico capilar

ECG: Electroforesis capilar en gel



La **electroforesis capilar de zona (ECZ)** es el método de separación de solutos más simple por EC y así mismo es el más usado por ser práctico y versátil, en esta técnica los analitos son separados en función de sus movibilidades electroforéticas individuales y por el FEO. Los compuestos separados pasan por el detector en forma de “zonas de analito” (origen del término ECZ), lo que permite la separación de cualquier molécula con carga y en un mismo análisis separa aniones y cationes con ayuda del flujo electroosmótico. La ECZ es usada para analizar péptidos, iones y enantiómeros, sin embargo no es útil para separar moléculas neutras porque éstas son detectadas juntas al ser arrastradas todas al mismo tiempo por el flujo electroosmótico.

La **electroforesis capilar en gel (ECG)** separa las moléculas que migran de acuerdo a su carga por efecto de un campo eléctrico usando como soporte un capilar empacado con algún polímero que obstaculiza el movimiento de las partículas de mayor tamaño, es empleada en biología molecular para separar proteínas y ácidos nucleicos de acuerdo a su peso molecular.

El **enfoque isoeléctrico capilar (EIC)** es una técnica usada para separar moléculas bipolares o zwitteriones que contienen grupos positivos y negativos y poseen un punto isoeléctrico (PI) que es el pH al cual las cargas positivas y negativas se equilibran. En esta técnica el capilar se llena con compuestos anfóteros que generan un gradiente de pH que permanece fijo durante la separación, se coloca una solución básica en el cátodo y ácida en el ánodo y la muestra se inyecta desde el extremo del capilar con pH más bajo, lo que la mantiene con carga eléctrica. Al aplicar voltaje, las moléculas cargadas migran hasta alcanzar su punto isoeléctrico donde permanecen estáticas, finalmente los compuestos pueden ser empujados con presión hasta el detector para su análisis.

La **isotacoforesis (ITF)** es una técnica electroforética que tiene lugar en un sistema discontinuo de amortiguadores, consiste en inyectar primero un electrolito líder ó guía de alta movilidad, luego se introduce la muestra seguida del electrolito terminal o cola, cuya movilidad debe ser menor que cualquiera de los componentes de la muestra, así en el momento en el que se genera un campo eléctrico, se crea un patrón de migración en el que los analitos migran como zonas consecutivas dependiendo de la movilidad de cada fase. Esta técnica es útil para el análisis de cationes y aniones pero de manera independiente.

Finalmente la **cromatografía electrocinética micelar** es una técnica de separación que se basa tanto en principios cromatográficos como electroforéticos y que es capaz de separar conjuntamente compuestos iónicos y neutros en función de sus movilidades electroforéticas y su partición entre una fase móvil y otra semiestacionaria.

Debido a esta dualidad en la separación y a las ventajas que ofrece, esta modalidad de EC es de particular interés por lo que se explicará a detalle a continuación.

### **1.2.3. CROMATOGRAFÍA ELECTROKINÉTICA MICELAR (MEKC)**

La cromatografía electrocinética micelar o MEKC por sus iniciales en inglés (Micellar Electro-Kinetic Chromatography) es una técnica de separación en capilar que permite el análisis conjunto tanto de moléculas neutras o con movilidades electroforéticas muy similares como de moléculas con carga positiva y moléculas con carga negativa.

En esta técnica, la separación ocurre gracias a la presencia de un aditivo en el amortiguador de corrida que debe cumplir con dos condiciones: (i) ser capaz de interactuar diferencialmente con los analitos y (ii) formar complejos analito-aditivo que posean movilidades electroforéticas diferentes a la del flujo electroosmótico.

Cumpliendo con estas características, los aditivos más usados han sido los surfactantes, estos compuestos se polimerizan en forma de agregados o micelas e interaccionan con los analitos de la muestra creando una partición del analito entre la micela y el medio externo, dicha partición puede basarse en distintas interacciones como son la hidrofobicidad, la atracción iónica, la formación de puentes de hidrogeno con la micela, etc.

La separación por MEKC depende de las diferencias en las movilidades electroforéticas de los compuestos y de sus coeficientes de partición entre el medio y la micela. La micela constituye una fase pseudoestacionaria que migra dependiendo del tipo de surfactante del que está constituida, pues posee carga y en consecuencia movilidad electroforética.

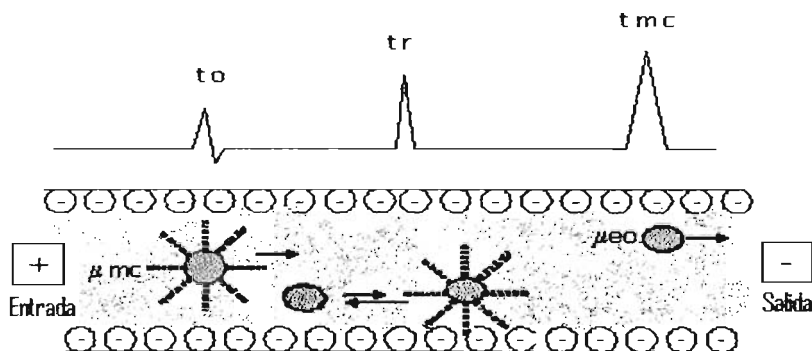


Figura 7. Esquema de separación por MEKC

En la figura 7 se presenta un electroferograma típico de un análisis por MEKC, se trata de una separación a polaridad normal y pH alto, empleando un surfactante aniónico. En esta separación, el primer pico en registrarse (al  $t_0$ ) es el que corresponde al llamado marcador de flujo electroosmótico, el cual es un compuesto neutro que no sufre interacción alguna con la micela,

luego son detectados por separado los componentes de la muestra que tendrán un orden de migración de acuerdo a su carga, tamaño y afinidad a la fase pseudoestacionaria. En general los componentes de la muestra sufren interacciones, que dependiendo de sus propiedades intrínsecas, serán de mayor o menor potencia. En este ejemplo los primeros compuestos en migrar hacia el detector (ánodo) serán los que sean menos afines a la micela y tengan carga mas positiva. Finalmente se detectará la micela a un tiempo de migración micelar ( $t_{mc}$ ), pues aunque posee carga negativa, la separación es a pH elevado y el flujo electroosmótico es fuerte, lo que la empuja hacia el ánodo y le permite ser detectada.

Es importante señalar que el patrón de migración presentado en la **Figura 7** varía dependiendo del tipo de surfactante y la interacción analito-micela. El surfactante de mayor uso es el dodecil sulfato de sodio (SDS) que estructuralmente está formado por una cola hidrofóbica y una cabeza hidrofílica con carga negativa, pero hay muchos tipos diferentes de surfactantes, en general pueden ser clasificados de acuerdo a la carga de su parte iónica en: surfactantes aniónicos, catiónicos, no-iónicos y anfóteros.

Entre la gran variedad de surfactantes disponibles, resulta de particular interés para nosotros el llamado deoxicolato de sodio (SDC), un surfactante aniónico que estructuralmente difiere del SDS por presentar un hidroxilo menos en la región hidrofóbica (**Figura 8**). El SDC, a diferencia del SDS no es un potente agente desnaturizador, pero al igual que el SDS se precipita a bajas temperaturas, no es tóxico, posee una composición definida, no presenta auto-oxidación y es económico y fácil de conseguir. En la tabla 2 se enlistan algunas propiedades físicas que se deben tener presentes al implementar un análisis por MEKC empleando SDC.

Figura 8.

Estructura química de los surfactantes aniónicos

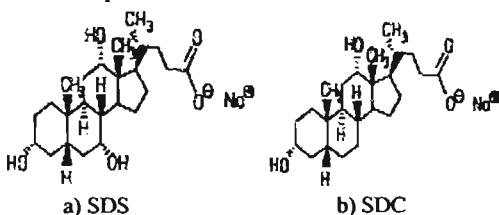


Tabla 2.  
Propiedades físicas del  
deoxicolato de sodio (SDC)

Masa molecular del monómero	432 Da
Masa molecular de la micela	4200 Da
Concentración micelar crítica	$5.0 \times 10^{-3} \text{ M}$
% CMC (m/v)	0.21 %

En resumen, ésta modalidad de EC permite la separación efectiva de moléculas cargadas y moléculas neutras, por lo demás es sencilla, predecible, económica y ofrece excelente resolución de los picos y por tanto muy buena reproducibilidad.

La resolución es la medida de la separación de dos picos adyacentes e indica que tan adecuado es un análisis, como lo ilustra la siguiente ecuación. En MEKC la resolución esta dada en función de la eficiencia, la selectividad, la partición y la ventana de migración, parámetros que a la vez se ven afectados por un gran número de variables propias de la técnica.

$$R_s = \underbrace{\left(\frac{N^{1/2}}{4}\right)}_{\text{Eficiencia}} \underbrace{\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)}_{\text{Selectividad}} \underbrace{\left(\frac{k_2}{k_2 + 1}\right)}_{\text{Partición}} \underbrace{\left(\frac{1 - \frac{t_0}{t_{mc}}}{1 + \frac{t_0}{t_{mc}} k_1}\right)}_{\text{Ventana de migración}}$$

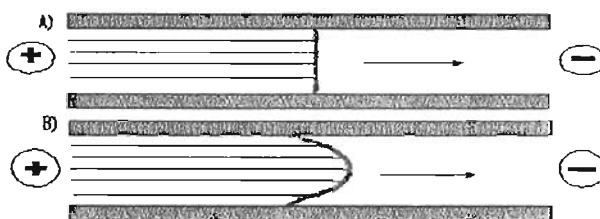
## I. Eficiencia

Es la capacidad del método para evitar el ensanchamiento de banda y registrar picos delgados y con bases angostas. Existen varias fuentes de ensanchamiento de banda, es decir de dispersión de la zona de migración de un analito, entre ellas está el calor de Joule, el flujo no laminar a través del capilar, la polidispersión micelar y la baja transferencia micela-medio externo del analito.

Las dos primeras fuentes de ensanchamiento son mínimas en las técnicas electroforéticas en capilar, pues todas son capaces de dispersar eficientemente el calor de Joule y el flujo dentro del capilar siempre es laminar gracias a la movilidad electroosmótica (Figura 9). En cuanto a la polidispersión micelar, se ha demostrado que es mínima para micelas formadas con SDS [11]. Finalmente, la transferencia micela-medio externo del analito es función de la matriz de la muestra pues si la muestra es afin al medio en el que se encuentra antes de la inyección, tardará en dispersarse en el amortiguador de corrida y esto afectara la eficiencia de la separación, lo que se reflejará en picos pequeños y anchos.

**Figura 9.**

- A) Perfil de velocidad electroosmótica con flujo laminar
- B) Perfil de velocidad hidrodinámica con flujo parabólico o turbulento



Las variables de la matriz de la muestra que afectan la eficiencia son:

- **Surfactantes:** en general una concentración de surfactantes equivalentes en la muestra y en el amortiguador de corrida, merman el tamaño del pico. Se ha reportado que una concentración menor de surfactantes en la muestra, con respecto al amortiguador de separación, favorece el tamaño de los picos pues concentra las zonas de migración.
- **Amortiguador de corrida:** cuando la muestra se encuentra disuelta o suspendida en amortiguador de corrida diluido, se beneficia el tamaño de los picos porque la zona de un analito es compactada por la diferencia de conductividad entre el amortiguador diluido y concentrado.

- **Solventes orgánicos:** la adición de solventes orgánicos en la muestra afecta el tamaño de los picos pues se altera la distribución del analito entre la micela y la fase acuosa. Esto representa un problema serio pues la MEKC se emplea usualmente para separar compuestos no polares que no son solubles en agua pero sí en solventes orgánicos, por eso es preciso estudiar la proporción adecuada de solvente que permita mantener la muestra en solución y no afecte el tamaño de los picos.

## **II. Selectividad**

La selectividad es la medida termodinámica de la afinidad de dos compuestos por alguna de las fases. Relaciona los factores de capacidad de dos analitos ( $k_2/k_1$ ), es decir, la constante de afinidad por alguna de las fases de un analito dado con respecto a otro. La selectividad se ve afectada por las siguientes variables:

- **Tipo de surfactante:** los analitos de una muestra pueden interactuar de manera más diferencial con un tipo de surfactante que con otro, dependiendo de sus características moleculares, por lo que es recomendable seleccionar el surfactante a emplear, contemplando que tipo de interacciones son deseables o ideales.
- **pH:** para moléculas ionizables, el valor de pH en el amortiguador de separación es decisivo, pues cuando una molécula se encuentra ionizada, exhibe propiedades fisicoquímicas diferentes con respecto a su estado no ionizado y las interacciones con la fase pseudo estacionaria dependerán de su estado.
- **Tipo de amortiguador:** el tipo de sal seleccionado para constituir el amortiguador de corrida debe ser inerte con respecto a la muestra, pues de formarse complejos muestra-sal, las constantes de afinidad de los analitos acomplejados se altera. Lo ideal es que el amortiguador de corrida cumpla con su única función de mantener el pH estable.

- **Temperatura:** a medida que la separación se lleva a cabo a menor temperatura, aumenta la partición, debido a que la energía cinética es menor y disminuyen las interacciones analito-micela.

### III. Partición

La partición o también llamada retención, indica el tiempo que ocupará en un electroferograma el pico de un analito, con respecto a  $t_0$  y  $t_{mc}$  por consecuencia de la fuerza o debilidad de las interacciones analito-micela. Este parámetro es afectado por las siguientes variables:

- **Concentración del surfactante:** la partición puede alterarse por la concentración de surfactante presente en el amortiguador de corrida y es un punto que debe estudiarse al desarrollar un método analítico por MEKC. La concentración de surfactante a elegir está limitada para bajas concentraciones por la concentración micelar crítica (CMC) que es la cantidad de monómeros que deben estar presentes para formar las micelas y para altas concentraciones por el tiempo de análisis
- **Tipo de surfactante:** el surfactante elegido define el patrón de migración porque establece el tipo de interacciones analito-micela y la dirección de la movilidad electroforética de la fase estacionaria. Se debe considerar que el surfactante empleado debe dar una partición moderada para evitar que la mayoría de los analitos en la muestra se recarguen del lado del metanol o muy cerca de la fase pseudo estacionaria, además es necesario tener en cuenta que los surfactantes catiónicos revierten la dirección del flujo electroosmótico al interactuar con las cargas negativas del capilar.



- **Modificadores orgánicos:** la partición puede ser modificada al agregar algún solvente orgánico (como el metanol, el isopropanol o el acetonitrilo) al amortiguador de corrida. En concentraciones mayores al 30%, altera la polaridad de la fase acuosa, lo que podría aumentar la afinidad de algunos analitos con la fase externa o móvil.

#### **IV. Ventana de migración**

Se le llama así al intervalo entre  $t_0$  y  $t_{mc}$  en un análisis por MEKC, mientras más grande sea este intervalo, será más probable tener una mejor separación de la muestra, pero a la vez el tiempo de análisis aumenta. Cuando el movimiento total de las micelas y los compuestos en la fase acuosa se dirigen en la misma dirección, es posible aumentar la ventana de migración ya sea aumentando la movilidad electroforética de las micelas o disminuyendo el flujo electroosmótico, al modificar las siguientes variables:

- **pH:** al trabajar con una micela negativa a un pH de 5 o menor, ésta migra hacia el ánodo por efecto de su carga y no por el arrastre del flujo electroosmótico, originando que el orden de migración de los compuestos neutros sea reverso con respecto al orden de migración obtenido al trabajar con pH de 6 o mayor, donde el flujo electroosmótico es grande y la micela es arrastrada al cátodo.
- **Modificadores orgánicos:** algunos solventes como el metanol y el isopropanol aumentan la ventana de migración al disminuir el flujo electroosmótico, pero al mismo tiempo reducen la partición. En cambio, el acetonitrilo no afecta el flujo electroosmótico pero sí modifica la polaridad del amortiguador de corrida. Se ha reportado que alcoholes lineales (C4-C8) agregados al 0.5% en el amortiguador de corrida, aumentan la ventana de migración aumentando la movilidad electroforética de las micelas [12].

- **Capilares recubiertos:** con el fin de alterar la carga negativa en la pared interna, las columnas capilares pueden ser sometidas a diversos tratamientos que actúan sobre los grupos silanol formando una capa que recubre las paredes y las mantiene neutras en amplios rangos de pH. De esta manera, en ausencia de micelas, el flujo electroosmótico es mínimo. Esto no es del todo cierto para MEKC pues en presencia de micelas, se alcanza a formar un FEO lo suficientemente potente.
- **Tipo de surfactante:** diferentes tipos de surfactantes forman micelas con diferentes movilidades. Si se obtienen micelas que exhiban mayor movilidad que las de otro tipo, se amplía la ventana de migración.
- **Tipo y concentración del amortiguador de corrida:** puesto que el flujo electroosmótico es inversamente proporcional a la fuerza iónica, a mayor concentración de sales y surfactantes se obtiene un flujo electroosmótico más débil y se amplía la ventana de migración; sin embargo, aumenta el calor de Joule y se produce ensanchamiento de banda. Amortiguadores preparados a base de sales zwitteriónicas u orgánicas poseen una excelente capacidad amortiguadora y son menos conductoras, por lo que es posible aumentar el voltaje sin el deterioro originado por el calor de joule.

Además de las variables ya señaladas, debemos tener en cuenta las variables instrumentales que afectan la separación por EC sin ser específicas de la MEKC.

**La longitud del capilar:** al utilizar un capilar más largo se favorece la eficiencia porque aumenta el número de platos teóricos, en consecuencia se mejora la resolución en el análisis; sin embargo aumenta sustancialmente el tiempo de corrida.

**El diámetro interno del capilar:** al aumentar el diámetro del capilar se incrementa la sensibilidad porque aumenta la cantidad de muestra cargada, sin embargo disminuye la relación superficie-volumen y se origina una dispersión del calor de Joule menos eficiente, resultando en la formación de un gradiente de temperatura a lo largo del capilar y por tanto, se presenta ensanchamiento de banda. Se produce un efecto similar al aumentar el **tiempo de inyección** y/o la **presión de inyección** pues se carga mayor cantidad de muestra, pero igualmente disminuye el radio superficie-volumen.

**El voltaje de separación:** al aumentar el voltaje, se reduce el tiempo de análisis y aumenta la agudeza de los picos, por lo tanto mejora la resolución; sin embargo al mismo tiempo, en amortiguadores de corrida con alta fuerza iónica, se produce mucho calor de Joule que no puede ser eficientemente dispersado, originando ensanchamiento de banda.

Es imperativo contemplar el efecto que producirá la alteración de cada una de las variables antes mencionadas, tanto en la resolución como en el tiempo de análisis y estudiar las condiciones óptimas de separación en función de los objetivos principales del método a desarrollar.

1.2.5. Tipos de detectores en EC

Los avances en la tecnología de detectores miniaturas han jugado un papel protagónico en el éxito en la difusión de esta técnica. Actualmente la EC puede ser acoplada a una gran variedad de detectores y el tipo de detección a usar debe seleccionarse en función de las propiedades de los analitos y del límite de detección deseado. A continuación se enlistan (Tabla 3) los tipos de detección más comunes para esta técnica, así como sus ventajas y desventajas [13].

Tabla 3. Métodos de detección en EC

Método de detección	Límite de detección (M)	Ventajas / Desventajas
UV- Vis	$10^{-5} - 10^{-8}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Universal</li> <li>• Arreglo de diodos ofrece información del espectro de absorción.</li> </ul>
Fluorescencia	$10^{-7} - 10^{-9}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta sensibilidad</li> <li>• Comúnmente requiere derivatización.</li> </ul>
Fluorescencia inducida por Láser	$10^{-14} - 10^{-16}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidad extrema</li> <li>• Comúnmente requiere derivatización.</li> <li>• Costoso</li> </ul>
Detección amperométrica	$10^{-10} - 10^{-11}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensible</li> <li>• Selectiva, pero sólo para analitos electroactivos.</li> <li>• Requiere modificaciones electrónicas y capilares especiales.</li> </ul>
Conductimetría	$10^{-7} - 10^{-8}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Universal</li> <li>• Requiere modificaciones electrónicas y capilares especiales.</li> </ul>
Espectrometría de masas	$10^{-8} - 10^{-9}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensible y ofrece información estructural</li> </ul>
Detección Indirecta UV, fluorescencia.	10-100 veces menos que los métodos directos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Universal</li> <li>• Menor sensibilidad que la ofrecida por los métodos directos</li> </ul>

### **1.2.5.1. Detección por fluorescencia inducida por láser**

Como se señala en la Tabla 3, la detección por fluorescencia inducida por láser es la técnica de detección óptica mas sensible que es posible adaptar a un equipo de EC.

En la detección por fluorescencia inducida por láser, una molécula de analito fluoróforo absorbe un fotón que es emitido por una fuente láser a una longitud de onda de emisión fija, entonces la molécula es promovida a un nivel energético superior para después regresar a su estado energético basal, ya sea al emitir un fotón (fluorescencia) que es detectado a una longitud de onda de emisión para trazar el electroferograma o al derivar a reacciones que conduzcan a la formación de productos NO fluorescentes.

Los parámetros más importantes para la fluorescencia son la absortividad, el rendimiento cuántico y la fotoestabilidad, estos determinan la utilidad de un fluoróforo. De manera semejante a la absorbancia UV-Vis un mayor coeficiente de absortividad indica que una molécula puede excitarse más con una intensidad luminosa determinada. Se conoce como rendimiento cuántico fluorescente a la fracción de las moléculas excitadas que finalmente emiten un fotón, por lo que es óptimo que el rendimiento del fluoróforo sea de uno o cercano, pues de esta manera cada fotón absorbido es emitido. Uno de los parámetros más importantes es la fotoestabilidad del fluoróforo, que se reporta como el promedio de ciclos de excitación-emisión que puede cumplir una molécula antes de degradarse.

El objetivo esencial de un sistema de fluorescencia es excitar eficientemente al fluoróforo y detectar una fracción de fotones emitidos tan grande como sea posible, obteniendo un límite de detección muy pequeño, sin embargo existen una serie de fuentes de ruido que limitan la discriminación de la señal y su identificación, las tres principales fuentes de ruido son la dispersión de Rayleigh, dispersión de Raman y el ruido por luminiscencia.

La dispersión de Rayleigh se debe a la dispersión de la longitud de onda de excitación y se evita con la presencia de filtros monocromadores apropiados. La dispersión de Raman es una de las fuentes de ruido más serias cuando la concentración de analito es pequeña. Finalmente, la luminiscencia, puede deberse a la pared del capilar y a las impurezas en el medio de separación.

Un sistema básico de fluorescencia consiste en la fuente de excitación, los lentes ópticos que permiten que la longitud de onda de excitación incida directamente sobre el capilar, los lentes que colectan la longitud de onda de emisión y el sistema de detección.

La fuente de excitación es una lámpara láser, la cual debe ser de intensidad y longitud de onda apropiadas. Las fuentes láser tienen la gran ventaja de emitir una línea espectral estrecha para la excitación y la capacidad de enfocarse a diámetros muy pequeños (capilar), pero el número de líneas de emisión (longitudes de onda de excitación) está limitada por los tipos de láser comerciales. Las lámparas láser son fáciles de usar, poseen tiempos de vida media excepcionales, su consumo de energía es bajo, poseen alta confiabilidad y ofrecen límites de detección extremos.

En conjunto, los métodos de detección por fluorescencia son los que tienen las mejores características de funcionamiento en términos de linealidad, sensibilidad y límites de detección, sin embargo muchas muestras no son fluorescentes (no son fluoróforos naturales) por lo que se deben convertir por procesos de derivatización (reacción con un fluorógeno para obtener un fluoróforo) o deben ser detectados por alguna técnica menos restrictiva como inmunoensayos o por detección indirecta.

### 1.2.5.2. Procedimientos de derivatización

La derivatización es la reacción química entre el analito de interés y algún reactivo fluorógeno que permita la obtención de un derivado capaz de ser detectado por fluorescencia.

La reacción de derivatización óptima debe cumplir con diversas exigencias: debe ser capaz de identificar una porción molecular común para todos los analitos de interés (i), debe ser cuantitativa (ii) y preferentemente el fluorógeno utilizado no debe ser fluorescente *in situ* (iii). Al cumplir con dichas características, se observa una mejora en el límite de detección y la resolución, pues de esta manera, es posible el análisis conjunto de todos los analitos de interés sin el registro excesivo de ruido o picos ajenos, gracias a que el fluorógeno no es detectable en ausencia de la muestra.

La selección del reactivo de derivatización es crucial para la capacidad del método, por lo que el reactivo seleccionado debe cumplir con varios requerimientos. Para empezar, debe ser un compuesto estable y que reaccione rápidamente y a bajas temperaturas con un alto rendimiento. Los derivados obtenidos deben ser suficientemente estables, el exceso de reactivo y el ruido que origine no deben perturbar la separación. Además, el reactivo debe ser viable y económico.

En la **tabla 4** se presentan los reactivos más comúnmente usados para la detección de aminoácidos y/o catecolaminas. Se detalla la longitud de onda de máxima absorción para el detector UV y las longitudes de emisión y excitación para la detección por LIF, Así mismo, se señalan las condiciones de reacción y el límite de detección reportado para dichas condiciones.

Entre los reactivos reportados, el fluorógeno 3-(2-furoil)-2-quinolin-carboxaldehído (FQ) ha sido extensamente usado para la detección de proteínas, péptidos, aminoácidos, amino-azúcares, monosacáridos, oligosacáridos reducidos y para neurotransmisores de molécula pequeña, incluyendo aminoácidos y catecolaminas [16, 17, 18,19].

**Tabla 4.**  
Reactivos de derivatización para aminoácidos-catecolaminas

Reactivo	Abreviatura	Condiciones de reacción	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}^a$ $\lambda_{max}^b$	Límite de detección (M)
2-(9-Antril)etil cloroformo	AEOC	TA/ 5 min	348/366 256	$1 \times 10^{-10}$ $1.5 \times 10^{-7}$
6-Aminoquinolil-N-hydroxisuccinimidil carbamato	AQC	508°C /10 min	360/395 214 o 254	$3 \times 10^{-7}$
Cianina	Cy5	TA / 60 min	635/670	$6 \times 10^{-8}$
Naftalen-2,3-dicarboxaldehído	NDA	TA / 30 min	442/490 254	$5 \times 10^{-10}$
Cloruro de 5-Dimetilaminonaftalen-1-sulfonilo	Dns	TA /120 min	360/570 254	—
Fluoruro de 2,4-Dinitrofenilo	DNP	—	254	—
Isotiocianato de fluoresceína	FITC	TA	488/520	$10 \times 10^{-11}$
9-Fluoroenilmetil cloroformato	FMOC	TA / 45 s	265/310 256	$3.4 \times 10^{-8}$
o-Ftalaldehído	OPA	TA / 1min	340/475 260	$2.1 \times 10^{-7}$
Feniltiohidantoina	PTH	TA / 5 min	254	—
3-(4-carboxibenzoil)-2-quinolin-carboxaldehído	CBQCA	TA	442/550	—
Cloruro de Dansilo	—	TA / 120 min	325/600	—
fluorescamina	—	TA	390/450	—
3-(2-furoil)quinolin-2-carboxaldehído	FQ	65 °C/ 3 min	488/590	$10 \times 10^{-13}$

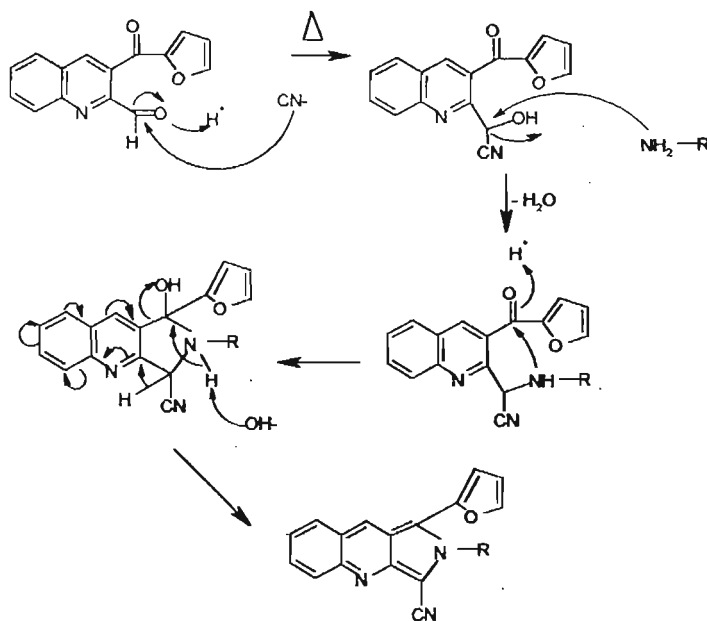
De acuerdo con el mecanismo propuesto en la **Figura 10** el FQ reacciona con el grupo amino primario en presencia de algún nucleófilo (usualmente CN<sup>-</sup>). Los derivados formados en la reacción de FQ con la amina primaria son estables en solución durante aproximadamente 24 h y hasta por dos semanas al secarlos y mantenerlos en congelación [16]. Son excitados con una láser ión Argón a 488 nm y poseen un rango amplio de emisión, lo que facilita filtrar la dispersión Raman producida por el solvente, además, el exceso de reactivo favorece el límite de detección sin aumentar el ruido del análisis pues no florece *in situ*.



Se reporta que la reacción de derivatización es rápida y eficiente, sin embargo no existe consenso en las condiciones de reacción como temperatura, tiempo, concentración, volumen de reactivos y medio de reacción [16, 20, 21, 22, 23]. Algunos autores indican que la reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente (*Molecular Probes*, hojas de información del producto, 2001) durante 2 h, usando 2  $\mu\text{l}$  de KCN 50 mM (Jonas Berquits et al., 1994), mientras que otros calientan a 40°C, usando 100 nmol de FQ seco, con metanol como medio de reacción y sólo 2  $\mu\text{L}$  de KCN 25 mM o utilizan NaCN 20 mM con sólo 50 nmol del reactivo de derivatización seco, usando agua como medio de reacción (Stoyanov Alexander et al., 2002). También se reportó una reacción eficiente, calentando a 65° C durante 50 minutos en la oscuridad, usando 100 nmol de FQ seco y 4  $\mu\text{L}$  de KCN 25 mM sin diluir durante la reacción.

Figura 10.

Mecanismo de reacción de FQ con amina primaria



Debido a estas discrepancias, es necesario estudiar cada una de las variables que están involucradas en esta reacción de derivatización, teniendo en cuenta que un mayor exceso de FQ ofrece un mejor límite de detección, que tanto el FQ como los derivados son poco solubles en agua, que es preferible diluir los productos lo menos posible para aumentar la detección y que el reactivo fluorógeno modifica las propiedades fisicoquímicas de los analitos, afectando el orden de separación.

## **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

El estudio de los procesos bioquímicos que están involucrados en el aprendizaje y la memoria permiten su caracterización y entendimiento. Los resultados obtenidos gracias a la investigación básica, serán aprovechados por la investigación aplicada y el desarrollo tecnológico, entre otras cosas para el diagnóstico oportuno de trastornos del aprendizaje y la memoria y para el desarrollo de nuevas y mejores terapias contra estas enfermedades.

Resulta esencial para las ciencias químicas y bioquímicas el análisis de muestras biológicas complejas con el fin de conocer los compuestos presentes y su concentración. En particular, en el estudio de los procesos de aprendizaje y memoria, las muestras obtenidas por microdiálisis del espacio intersticial celular en estructuras cerebrales de ratas, arrojan información valiosa respecto a las sinapsis químicas necesarias para que se complete una tarea, de esta manera es posible elucidar los procesos bioquímicos que se llevaban a cabo en el momento del muestreo. Estas muestras son sumamente complejas y aunque únicamente contienen moléculas de pequeño tamaño molecular, están cargadas de una gran variedad de compuestos con diversas propiedades que son susceptibles a la degradación si se encuentran en condiciones desfavorables, asimismo el tamaño de la muestra está muy limitado por el tamaño de la estructura cerebral que se desee monitorear y por el tiempo en el que se dispara una señal, además de que se requiere la discriminación completa de los compuestos de interés, los cuales representan un porcentaje mínimo de la muestra y se encuentran mezclados con otros de estructura y propiedades muy semejantes. Por todas estas condiciones, es necesario un sistema de separación muy eficiente y una detección sumamente sensible y específica.

La electroforesis capilar ha tenido un enorme impacto en la investigación bioquímica debido a que proporciona una alta resolución en la separación de compuestos estructuralmente muy similares a partir de matrices complejas.

Por lo anterior, el objetivo primordial de este trabajo, consiste en implementar un método para el análisis conjunto de algunos aminoácidos (glutamato y GABA) y catecolaminas (norepinefrina y dopamina) durante los procesos de aprendizaje y memoria, en muestras obtenidas por microdialisis del espacio intersticial de estructuras cerebrales de ratas, mediante Electroforesis Capilar (EC).

El método desarrollado debe cumplir con las siguientes condiciones:

- ✓ Separación y detección conjunta de aminoácidos y catecolaminas
- ✓ Alta sensibilidad para un análisis detallado con respecto al tiempo.
- ✓ Automatización del método

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

El presente trabajo se desarrolló en un equipo de electroforesis capilar comercial fabricado por Beckman Coulter, modelo P/ACE™ MDQ Glycoprotein System, que cuenta con detector UV de barrido y con detector de fluorescencia inducida por láser (LIF) con lámpara de ión argón de longitud de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) de 488 nm y con filtros de interferencia para la longitud de onda de emisión ( $\lambda_{em}$ ) de 590 nm y 520 nm.

La mayor parte del método fue desarrollado con la estrategia empírica y únicamente se utilizó el diseño experimental para la selección del pH del amortiguador de corrida utilizado como medio de separación. Durante este estudio se analizaron las principales variables de cada subproceso del proceso analítico para determinar las condiciones óptimas de análisis.

#### **3.1. CONDICIONES DE ANÁLISIS**

Teniendo en cuenta las opciones de detección y que se requiere un límite de detección muy pequeño para analizar las muestras, se optó por la detección por LIF, lo que implica la necesidad de un procedimiento de derivatización durante el subproceso tratamiento de la muestra que permita detectar tanto catecolaminas como aminoácidos a una  $\lambda_{ex}$  de 488 nm.

El reactivo de derivatización seleccionado fue el FQ (3-(2-furoil)-2-quinolin-carboxaldehído), utilizando para la detección, primero un filtro de interferencia de  $\lambda_{em}$  de 520 nm y luego un filtro de 590 nm que fue adquirido posteriormente. Además, se convino usar un aminoácido no biogénico como estándar para el seguimiento de la reacción.

Finalmente, debido a la semejanza en las propiedades fisicoquímicas de los derivados fluorescentes formados (especialmente carga y tamaño), se optó por la separación por MEKC.

### 3.2. SUBPROCESO MUESTREO

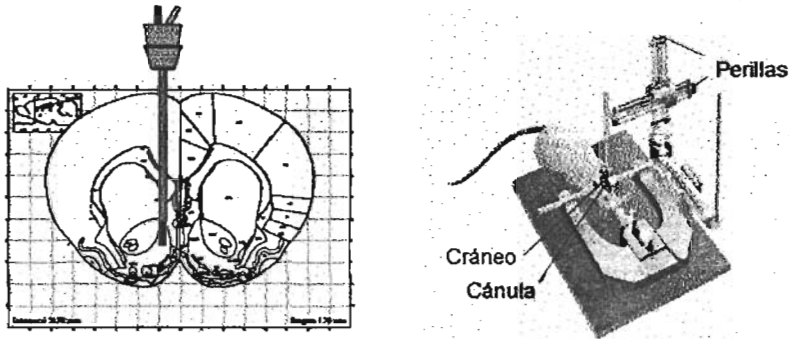
Este subproceso incluye la elección de la población de ratas para los estudios, el procedimiento quirúrgico necesario para la microdiálisis y la microdiálisis misma.

#### 3.2.1. Implantación de la cánula guía

Para los experimentos se utilizaron ratas Wistar macho, sanas, de aproximadamente 30 días de nacidas, con un peso de entre 260g y 280g, criadas en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular y alimentadas únicamente con croquetas Harlan <sup>TM</sup> y agua “*ad libitum*”.

El objetivo de este procedimiento quirúrgico es implantar una cánula que funciona como guía para introducir y fijar la membrana de microdiálisis justo en la estructura cerebral deseada, guiándose por un mapa estereotáxico que indica las coordenadas en tres planos con respecto a los puntos Bregma y lambda (unión de las fisuras craneales) (Figura 11A).

Durante el procedimiento quirúrgico las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico administrado por vía intraperitoneal, fueron montadas y fijadas en el esterotáxico (Figura 11B), se les aplicó una inyección subcutánea de xilocaína (anestésico local y vasoconstrictor) y se les hizo una incisión con bisturí para dejar el cráneo descubierto y permitir la ubicación de los puntos Bregma y lambda a partir de los cuales se ubica el punto donde se coloca la cánula guía. Una vez encontrada la posición anteroposterior y lateral, se utiliza un pequeño taladro para hacer un orificio en el cráneo en dichas coordenadas, después la cánula guía baja hasta la coordenada dorsoventral donde se fija con acrílico dental sujeto con ayuda de tornillos. Finalmente, se aplican antibióticos tópicos y se permite la recuperación de la rata por cuatro días.



**Figura 11.** Implantación de la guía cánula. (A) Mapa estereotáxico  
(B) Aparato estereotáxico para la cirugía

### 3.2.2. Microdiálisis

Pasados los días de reposo posteriores a la cirugía, las ratas fueron habituadas en las cámaras de microdiálisis para minimizar el estrés y fueron privadas de agua para acostumbrarlas a beber en el momento más conveniente.

El día del experimento se insertó la membrana de microdiálisis a través de la cánula guía y el tubo de entrada se conectó a una bomba de perfusión que infunde líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA), preparado con NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM,  $\text{MgSO}_4$  1.2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  19 mM, Glucosa 3.3 mM). Se ajustó la velocidad de perfusión y se procedió a purgar durante 30 minutos. Se midió la línea base tomando al menos 3 fracciones de tiempo y volumen definidos durante una fracción determinada. Se presentó el estímulo gustativo nuevo, es decir una solución de sacarina dispensada en los bebederos donde reciben agua. Las ratas bebieron y durante este tiempo se recolectaron las fracciones. Se continuó la recolección de por lo menos 7 fracciones más, suficiente para monitorear la respuesta debido al consumo de sacarina y para regresar a los niveles de la línea base. En el caso del acondicionamiento aversivo a los sabores, tiempo después de la sacarina se inyectó el LiCl, y se colectaron muestras durante la inyección y tiempo después.

Las principales variables controlables que afectan el análisis, son la velocidad de perfusión y el tiempo de recolección, por lo que se ensayaron velocidades de perfusión de 0.5 y 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  y lapsos de recolección de 4 y 8 minutos.

### 3.3. SUBPROCESO TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

#### 3.3.1. Estabilidad del microdializado

Una de las ventajas del muestreo por microdiálisis es que gracias al poro de la membrana, no alcanzan a pasar enzimas que pudieran degradar los neurotransmisores de la muestra, sin embargo las catecolaminas son muy susceptibles a oxidarse por lo que resulta necesario mezclar cada fracción colectada por microdiálisis con una mezcla que contenga compuesto antioxidantes y que evite el crecimiento de bacterias que estropeen el análisis.

Por lo tanto, se estudió el efecto de una mezcla de EDTA, ácido ascórbico y ácido acético. Se comprobó que no afecta ni la separación, ni la reacción de derivatización y se determinó la estabilidad de las muestras por efecto de dicha mezcla antioxidante con respecto al tiempo, bajo condiciones de almacenamiento determinadas.

#### 3.3.2. Reacción de derivatización

En esta sección se estudiaron las principales variables controlables para determinar las condiciones óptimas de reacción entre el FQ (derivatizante) y los neurotransmisores de molécula pequeña que poseen grupo amino primario.

- **Temperatura de reacción:** Se comparó el área registrada para GABA, cuando se efectuó la reacción a temperatura ambiente, a 40° C y a 65° C.
- **Tiempo de reacción:** Se comparó el área registrada para GABA al fijar una temperatura de reacción e incubar durante 40min, 60 min y 80 min.



- **Orden de adición de los reactivos durante la reacción:** se estudio si existe efecto al variar el orden de la adición de KCN, metanol, muestra y estándar interno, en la eficiencia de la reacción.
- **Tipo, concentración y volumen del nucleófilo:** Se seleccionó trabajar con cianuro de potasio y se estudio la reacción usando 2  $\mu\text{L}$  de una solución 50 mM y 4  $\mu\text{L}$  de una solución 25 mM.

### 3.3.3. Efecto de la matriz de la muestra

Se estudio el efecto en la eficiencia de la derivatización y de la separación en función del porcentaje acuoso y orgánico en la muestra

## 3.4. SUBPROCESO MEDICIÓN

Durante este subproceso se estudiaron las variables involucradas en la separación mediante MEKC. Las variables controlables estudiadas se clasifican en variables del amortiguador de corrida, variables del equipo y variables de la muestra.

### 3.4.1. Variables del amortiguador de corrida

Se seleccionó al tipo de sal para el amortiguador, su concentración y su pH, así como el tipo de surfactante empleado para formar la fase pseudoestacionaria y su concentración, Además se determinó la necesidad de agregar un modificador orgánico, se seleccionó el tipo y su concentración en el medio de separación.

### **3.4.2. Variables del Equipo**

Se establecieron las siguientes variables: temperatura del capilar, voltaje de separación, polaridad de separación, tipo de inyección, tiempo y presión de inyección y ciclo del acondicionamiento del capilar.

### **3.4.3. Variables en la muestra**

Se estudió el procedimiento para cargar la muestra y se estableció la temperatura de almacenamiento dentro del equipo para mantenerla estable durante el análisis.

## **3.5. SUBPROCESO MANEJO DE DATOS**

En este subproceso se seleccionó el tipo de calibración inicial a seguir y el procedimiento de calibración, así mismo se ajustaron los parámetros de integración para el análisis de los electroferogramas.

## **3.6. ANÁLISIS DE MUESTRAS**

Se cuantificó la liberación de GABA, dopamina, glutamato y norepinefrina en corteza insular y se monitorearon las concentraciones de dichos neurotransmisores con respecto al tiempo, durante la presentación de un estímulo gustativo nuevo (sacarina 0.1%) y durante la aplicación de la inyección de LiCl vía intraperitoneal.

## **3.7. PREPARACION DE LAS DISOLUCIONES**

Los estándares de aminoácidos (GABA y glutamato) y catecolaminas (dopamina y norepinefrina) fueron obtenidos de sigma. El KCN, el deoxicolato de sodio (SDC) y el dodecil sulfato de sodio (SDS) fueron obtenidos de Fluka. El ácido bórico, el borato de sodio, el acetonitrilo y el metanol se obtuvieron de J.T. Baker.

Todos los reactivos usados son grado analítico. Todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua desionizada con un sistema Milli-Q y filtradas con un poro de 0.2  $\mu\text{m}$  antes de ser almacenadas.

El reactivo de derivatización (FQ) se obtuvo de Molecular Probes (Eugene, OR, USA), para su almacenamiento el FQ disuelto en metanol (10 mM) y guardado en un desecador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El amortiguador de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) usado en microdiálisis, se preparó con NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM,  $\text{MgSO}_4$  1.2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  19 mM y Glucosa 3.3 mM. Se ajustó a un pH de 7.4.

EL KCN usado en la reacción de derivatización fue disuelto en amortiguador de boratos 10 mM, pH de 9.2, preparado en agua Milli Q.

Para la mezcla antioxidante se prepararon soluciones concentradas de Ácido L-ascórbico,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  y ácido acético, las cuales se diluyeron en agua Milli Q hasta 0.25 mM, 0.27 mM y 0.1 M, respectivamente.

Los estándares de cada aminoácido o catecolamina fueron pesados y preparados usando material volumétrico, se disolvieron en una cuarta parte del total del volumen con mezcla antioxidante y el resto con LCRA.

El estándar de referencia (l-metil-otreonina) fue preparado a partir de una solución concentrada de 1 mg/mL en agua desionizada y filtrada, de la que se hizo una dilución 1:100.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentarán y discutirán los resultados encontrados al estudiar las variables de cada uno de los subprocesos del procedimiento analítico, durante el desarrollo del método y enseguida se mostrarán sus parámetros y la calibración inicial.

### 4.1. CONDICIONES INICIALES DE ANÁLISIS

En la tabla 5 se resumen las condiciones iniciales que se establecieron para desarrollar el método analítico, las cuales están en función del objetivo del método y de las posibilidades técnicas y de instrumentación en el laboratorio.

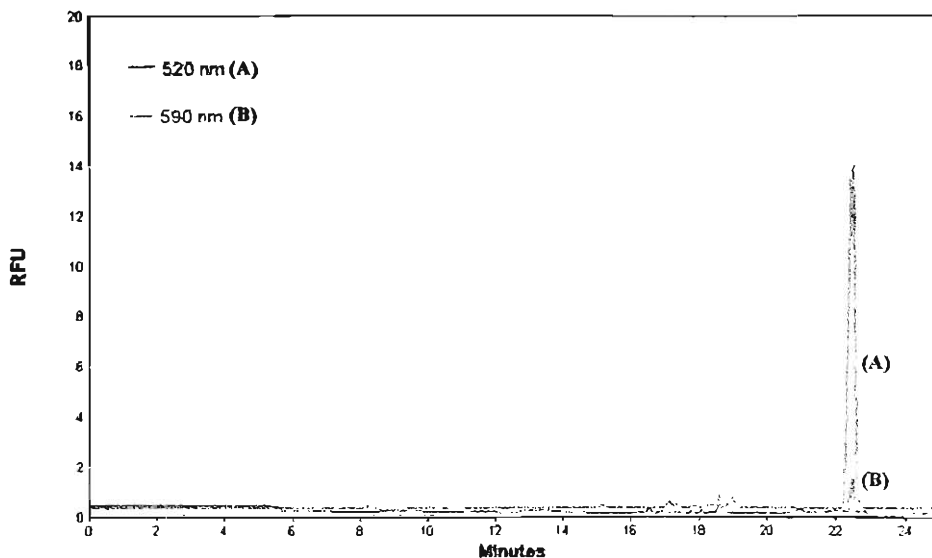
**Tabla 5.** Condiciones iniciales de análisis

A)	Detección	Fluorescencia inducida por Láser Láser de argón con $\lambda_{ex}$ de 488 nm y filtro de interferencia de 590 nm
B)	Derivatizante	3-(2-furoil)-2-quinolin-carboxaldehído (FQ) que forma derivados con $\lambda_{ex}$ de 488 nm y $\lambda_{em}$ de 590 nm
C)	Separación	Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)
D)	Estándar de referencia	L-metil-o-treonina 7.5 $\mu$ M

(A) En primera instancia, se optó por la detección por LIF debido a que en EC, es la técnica óptica que ofrece mayor sensibilidad. Esto resulta indispensable para lograr un estudio detallado de la liberación de los neurotransmisores con respecto al tiempo a lo largo de una tarea cognoscitiva, pues en microdiálisis el tiempo de recolección de una muestra está en función de los microlitos colectados (velocidad de perfusión  $\mu$ L/min). Es decir, si se desea obtener un mayor número de fracciones en un determinado tiempo de muestreo, disminuirá el volumen de cada fracción, lo que exige un método de detección altamente sensible.

El reactivo derivatizante seleccionado fue el FQ porque este fluorógeno forma derivados que son detectados con el láser de ión argón con el que cuenta el equipo en el laboratorio y además reacciona con las aminas primarias que están presentes tanto en GABA, glutamato y otros aminoácidos, como en dopamina, norepinefrina y otros neurotransmisores de molécula pequeña, lo que permite su análisis conjunto. Se reporta que los derivados que se forman con el FQ son excitados a una longitud de onda de máxima excitación ( $\lambda_{max}$ ) de 488 nm y que poseen un rango de máxima emisión ( $\lambda_{max}$ ) de aproximadamente 590 nm (Tabla 3). Debido a que inicialmente el equipo contaba con un único filtro de interferencia de 520 nm, se optó por comprar otro filtro al considerar que para optimizar el límite de detección del método, la excitación debe producirse a la  $\lambda_{max}$  de los compuestos formados y que la longitud de onda de emisión debe pasar por el filtro de interferencia más cercano a la  $\lambda_{max}$  de emisión. Se adquirió entonces un filtro de interferencia a 590 nm y se compararon los resultados obtenidos con ambos filtros.

En la Figura 12 se comparan los electroferogramas registrados para glutamato 10  $\mu$ M con el filtro de interferencia de 520 nm y con el filtro de interferencia de 590 nm. En estos resulta evidente que el límite de detección se ve favorecido con el filtro de interferencia de 590 nm pues permite la detección de la emisión máxima de los derivatizados y a la vez elimina las señales emitidas por impurezas fluorescentes a longitudes de onda dispersas, hecho que mejora indiscutiblemente la sensibilidad del método. Por tal motivo, las condiciones de detección usadas fueron: detector de fluorescencia inducida por láser de ión argón con  $\lambda_{ex}$  de 488 nm y filtro de interferencia de 590 nm, tal como se muestra en la Tabla 5.



**Figura 12.** Electroferogramas traslapados de glutamato  $10\ \mu\text{M}$  detectado con un filtro de interferencia de 520 nm (A) y la misma concentración detectada con otro filtro de 590 nm (B). Amortiguador de boratos 25 mM pH=9.35, acetonitrilo 10 %, SDC 35 mM, 20 KV, polaridad normal, columna de 50 cm de longitud efectiva y 75 mM de diámetro interno.

(B) La técnica de separación elegida fue la electroforesis capilar, principalmente porque gracias a su capacidad de analizar volúmenes muy pequeños de muestra, permite el análisis de pequeñas fracciones recolectadas por microdiálisis en lapsos cortos. Sin embargo, ya que los neurotransmisores son derivatizados previo a la inyección de la muestra, la separación se complica debido a que los derivados formados con el FQ poseen características fisicoquímicas muy semejantes y la ECZ no logra una resolución adecuada. Para resolver el problema se seleccionó la separación mediante cromatografía electrocinética micelar (MEKC) pues con esta modalidad, además de la carga y el tamaño del compuesto, la separación está en función de la afinidad con una fase pseudoestacionaria determinada.

(C) Se optó por el uso de un estándar de referencia en cada corrida para lo que fue elegido el aminoácido L-metil-o-treonina que reacciona con el FQ para ser detectado por LIF. Este compuesto no está presente de manera natural en las muestras biológicas, posee un tiempo de migración menor al de todos los compuestos de interés y no interfiere con la separación. Fue usado en cada análisis a una concentración de 7.5  $\mu\text{M}$ , lo que corresponde a una señal adecuada para su cotejo. La presencia de un estándar de referencia en cada análisis permite monitorear la reacción y la detección, pues el análisis de la señal de una misma concentración del estándar en cada corrida, denuncia la eficiencia de la reacción de derivatización y de la detección. Es decir, si resulta que en un análisis el área del estándar de referencia es menor en un 15%, comparada con otros análisis, la reacción de derivatización para dicha muestra pudo no ser completa, ya sea por la temperatura, el tiempo o la calidad de los reactivos usados o bien la detección pudo no ser la óptima, hecho que se puede comprobar analizando el estándar de calibración del equipo distribuido por *Beckman Coulter*.

#### 4.2. MUESTREO POR MICRODIÁLISIS

La estructura elegida para ser monitoreada fue la corteza insular(CI)<sup>3</sup> pues está involucrada tanto en el procesamiento de los sabores (estímulos gustativos) como en la noscicepción. Debido a las dimensiones de esta estructura, se emplearon membranas cilíndricas de 3mm de longitud y 0.3 mm de diámetro, con poro de 30 KDa por donde difunden únicamente las moléculas pequeñas y se estudió el efecto de la velocidad de perfusión ( $\mu\text{L}$  de LCRA que se infunden por minuto o  $\mu\text{L}$  de microdializado que se recolectan por minuto) en la sensibilidad y la resolución temporal (cantidad de fracciones obtenidas en determinado tiempo de muestreo) del análisis.

---

<sup>3</sup> Estructura cerebral localizada en el lóbulo temporal

Una velocidad de perfusión menor permite que se alcance mejor el equilibrio entre el LCRA y los compuestos en el espacio intersticial celular pues se encuentran en contacto por mas tiempo y por lo tanto es posible capturar muestras mas concentradas; sin embargo, al mismo tiempo aumenta el tiempo requerido para obtener una fracción de muestra con un volumen adecuado.

Se ensayaron velocidades de perfusión de 0.5  $\mu\text{L}/\text{min}$  y de 1.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La primera velocidad demandó recolectar la muestra durante 8 min para obtener 4  $\mu\text{L}$  en cada fracción y con la segunda velocidad de perfusión se obtuvieron los 4  $\mu\text{L}$  de muestra en 4 min. Se seleccionó una velocidad de perfusión de 1.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  debido a que es preferible monitorear con detalle la respuesta generada por el estímulo gustativo (mejor resolución temporal del análisis), con el fin de aumentar la probabilidad de observar punto por punto el momento justo donde se dispara la respuesta y la magnitud de dicha respuesta. Al mismo tiempo, dicha velocidad de perfusión ofrece un volumen de muestra suficiente para su derivatización y su análisis por EC, sin afectar el límite de detección.

### **4.3. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA**

#### **4.3.1. Estabilidad de la muestra**

La estabilidad de un analito en una matriz biológica es función de las condiciones de almacenamiento, de sus propiedades químicas y de la composición de la misma matriz. Es una condición fundamental para el análisis conjunto y automático de los neurotransmisores.

Las muestras obtenidas por microdiálisis no contienen enzimas que pudieran originar la degradación de los neurotransmisores recolectados; sin embargo, el grupo catecol presente en las catecolaminas es muy susceptible a oxidarse y además, tanto los estándares como las muestras de microdializado, se encuentran en un medio rico en nutrientes que favorece el crecimiento microbiano. Una manera de mantener la estabilidad es la adición de una mezcla antioxidante en las muestras y estándares.



Se ha reportado que la mezcla a base de ácido acético, ascórbico y EDTA es eficiente para prevenir la oxidación de las catecolaminas y mantener la estabilidad de muestras obtenidas por microdiálisis [24]. Esto se debe a que el ácido ascórbico y el ácido acético son oxidados por el oxígeno disuelto en el medio acuoso (principal oxidante de grupos catecol e indol) y por otro lado, la presencia de EDTA favorece la estabilidad de la muestra, gracias a sus propiedades bacteriostáticas, pues elimina trazas de metales mediante la formación de complejos.

Al usar la mezcla antioxidante en el análisis de muestras y estándares, se comprobó que dicha adición no interfiriera ni con la reacción de derivatización ni con la separación y detección por EC-LIF. Para esto se compararon dos grupos, el primero de estándares de referencia (l-metil-o-treonina) de muestras recién preparadas sin mezcla antioxidante y el segundo con mezcla antioxidante.

**Tabla 6.**

Influencia de la mezcla antioxidante en la reacción de derivatización y en el análisis por EC.  
Análisis de l-metil-o-treonina 7.5  $\mu$ M, Amortiguador de boratos 25 mM, pH 9.6, SDC 35 mM, 30 % de metanol, 20 KV, polaridad normal, capilar negativo de 50 cm con DI de 75  $\mu$ m

L-metil-o-treonina	Áreas			Promedio	DE
	Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3		
Con mezcla antioxidante (1:4)	1877391	19311193	1895979	7694854.33	10060048.7
Sin mezcla antioxidante	1938586	1911216	1805925	1885242.33	70040.7649

Los valores presentados en la **Tabla 6** fueron tratados con la prueba estadística *t de student* y se determinó que no existe diferencia significativa entre el grupo de análisis con mezcla antioxidante y el grupo de análisis sin mezcla antioxidante, por lo que resulta evidente que la presencia de la mezcla en la reacción y durante la separación, no merma la formación de los derivados ni su detección.

A continuación, se comprobó el periodo de estabilidad de los estándares almacenados en el refrigerador (6°C), los microdializados almacenados a -80°C y las muestras una vez derivatizadas almacenadas dentro del equipo a 6°C, todos en presencia de la mezcla antioxidante. Para esto se compararon las áreas registradas para cada neurotransmisor en función del tiempo.

**Tabla 7.** Estabilidad de las soluciones stock

Estándares preparados a la concentración correspondiente en una mezcla de líquido cefalorraquídeo artificial y ¼ de mezcla antioxidante. Mismas condiciones de análisis que las presentadas en la tabla 6.

T = 4 °C	Tiempo							
	0 días		2 días		5 días		7 días	
	Área	%	Área	%	Área	%	Área	%
Norepinefrina(1.0mM)	66380	100	61611	<b>92.816</b>	65179	<b>98.190</b>	68773	<b>103.605</b>
GABA (1.75 mM)	829831	100	789942	<b>95.193</b>	884640	<b>106.605</b>	733804	<b>88.428</b>
Dopamina (2.0 mM)	202267	100	217649	<b>107.605</b>	172447	<b>85.257</b>	186201	<b>92.057</b>
Glutamato (1.5 mM)	223628	100	208406	<b>93.193</b>	195514	<b>87.428</b>	248059	<b>110.925</b>

Los estándares fueron preparados usando un 25% del volumen final de mezcla antioxidante y llevados al aforo con líquido cefalorraquídeo artificial. Posteriormente se almacenaron en refrigeración a 6°C, en tubos *Epenlorf* de 1.5 mL, protegidos de la luz con papel aluminio. Como se puede observar en la **tabla 7**, la señal arrojada (área) por cada alícuota de una misma muestra en análisis a distintos tiempos, no varía más del 15% con respecto al análisis al tiempo cero. Esto indica que los estándares que sean almacenados bajo las mismas condiciones de este estudio, permanecen estables al menos por siete días [25].

**Tabla 8.** Estabilidad a largo plazo del microdializado

Mezcla de fracciones recolectadas por microdiálisis hasta formar un pull de 100  $\mu\text{L}$ . Se tomaron alícuotas de las muestras y se almacenaron (alícuotas de 10  $\mu\text{L}$ ) para su posterior análisis. Mismas condiciones de análisis que las presentadas para las tablas 6 y 7..

T = -80 °C	Tiempo									
	0 días		2 días		5 días		10 días		15 días	
	Área	%	Área	%	Área	%	Área	%	Área	%
Norepinefrina	106617	100	108425	101.696	107717	101.032	105130	98.605	101714	95.401
GABA	19096	100	19727	103.304	18468	96.711	18468	96.711	19996	104.713
Dopamina	32360	100	30272	93.547	35235	108.884	32753	101.216	29235	90.343
Glutamato	190118	100	198027	104.160	191415	100.682	186101	97.887	200901	105.672

La estabilidad a largo plazo indica el periodo durante el cual es posible analizar un microdializado, con la confianza de que las condiciones de almacenamiento le confieren estabilidad suficiente a los analitos de interés. Es importante hacer notar que no se comprobó la estabilidad de las muestras tras periodos de congelación y descongelación, por lo que un microdializado, una vez descongelado, debe ser analizado de inmediato o desechado.

En la **Tabla 8** se presentan las áreas registradas para cada neurotransmisor en análisis de diferentes alícuotas de una misma muestra homogénea de microdiálisis a diferentes tiempos. Cada 4  $\mu\text{L}$  de microdializado fueron recibidos con 1  $\mu\text{L}$  de mezcla antioxidante e inmediatamente después fueron almacenados protegidos de la luz a -80 °C, hasta el momento de su análisis. Ninguna de las áreas registradas se encuentra fuera de rango de 85%-115%, por lo que se comprobó que los microdializados permanecen estables por al menos 15 días, cuando son almacenadas bajo las condiciones antes mencionadas.

**Tabla 9.** Estabilidad de la muestra preparada.

Análisis de microdializados de corteza insular, bajo las mismas condiciones de los estudios anteriores.

T = 6 °C	Tiempo					
	0 h		12 h		24 h	
	Área	%	Área	%	Área	%
Norepinefrina	83198	100	85104	102.291	NA	NA
GABA	475416	100	467969	98.434	NA	NA
Dopamina	121680	100	123659	101.627	NA	NA
Glutamato	281543	100	283750	100.784	NA	NA

Así mismo, es importante comprobar el periodo de estabilidad de las muestras una vez que están listas para su análisis. Esto acredita la automatización del método, pues en una secuencia algunas muestras deberán permanecer dentro del equipo durante el tiempo de análisis de las primeras muestras. Por lo tanto, para este estudio se siguió el mismo procedimiento que se efectuará para obtener, derivatizar y tratar las muestras durante su análisis. Las muestras se almacenaron dentro del equipo a 4°C (temperatura mínima programable), en los viales de carga correspondientes, durante el tiempo necesario.

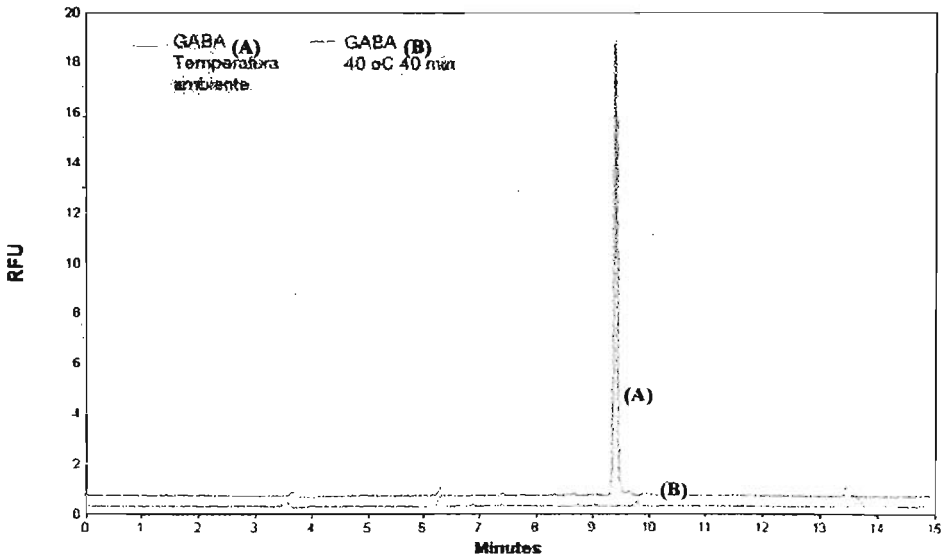
En la Tabla 9 se presentan las áreas de cada neurotransmisor en una sola muestra obtenida por microdiálisis. En ninguno de los casos la respuesta varía en más del 15% a las 12 h, sin embargo, en el análisis de la misma muestra 24 h después, se registró un electroferograma completamente descompuesto, sin picos superiores a 0.1 RFU (No Analizado), lo que indica que la muestra no permanece estable por 24 h. Esto nos conduce a establecer que debido a que no se analizaron tiempos intermedios entre 12 h y 24 h, las muestras no podrán ser analizadas si han permanecido bajo dichas condiciones por más de 12 h, pues su estabilidad no está comprobada.

#### 4.3.2. Reacción de derivatización

**Elección del tipo y concentración de nucleófilo.** El nucleófilo activa el ataque nucleofílico por parte de la amina primaria sobre el carbonilo del FQ, por lo que es esencial para la formación del compuesto fluorescente. Se dispuso usar KCN por ser el nucleófilo más empleado en las referencias y como se indica, debe estar presente en un exceso de al menos 6 veces con respecto a la concentración total de aminas primarias [16], por lo que se estipuló usar 2  $\mu\text{L}$  de KCN 25 mM en la reacción, lo que equivale a 50 n moles y un exceso de mas de diez veces con respecto a la muestra.

La **temperatura de reacción** es un factor crítico para la detección de los derivados con FQ, como reporta Liu X., *Journal of Chromatography A.*, 1998. La reacción requiere calentamiento para que se lleve a cabo, a pesar de lo indicado en otras referencias [16, 20]. Además, en una curva de temperatura para la reacción de FQ con algunas aminas primarias [22], se establece que una temperatura menor a 40°C, requiere de un tiempo de reacción largo y a una temperatura de 50°C los derivados se descomponen rápidamente, sin alcanzar el mismo rendimiento que con una incubación de menor tiempo.

Por lo anterior, se estudió el efecto de la temperatura de reacción analizando estándares de GABA 0.3 mM, cuando la muestra fue incubada a temperatura ambiente a 40 °C y a 65 °C, durante una hora (**Figura 13**). A temperatura ambiente se registró un electroferograma prácticamente blanco con algunas señales menores a 0.4 RFU, lo que no corresponde con lo esperado para la concentración analizada, Se concluye que no se formó del derivado fluorescente. Cuando se incubó a 40 °C, se observó el pico correspondiente a GABA 0.3 mM y finalmente al incubar la reacción a 65 °C, apenas se obtuvo un pico de 0.7 RFU, al tiempo de migración para GABA, lo que indica que calentar 65°C durante una hora, degrada los productos de reacción. Por lo tanto, 40°C fue seleccionada como la temperatura óptima usada durante la reacción de derivatización.



**Figura 13.** Electroferogramas traslapados correspondientes al análisis de estándares de GABA 0.3 mM cuando las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente (A) y 40 °C (B), durante una hora. El registro a 65°C no se muestra. Solución amortiguadora de boratos 25 mM pH= 9.35, con SDC 40 mM y 10% de acetonitrilo, como medio de separación [22]. 20 KV, polaridad normal, columna negativa de 50 cm de longitud efectiva y 75 mM de diámetro interno.

El efecto del **Tiempo de Reacción** sobre el rendimiento de derivados formados fue analizado a los 40, 60 y 80 minutos, con el mismo estándar a la concentración ya mencionada y bajo las mismas condiciones de separación que para la temperatura de reacción, incubando en todos los casos a 40°C.

De acuerdo con la **Figura 14**, se encontró que el área de los picos formados a 40, 60 y 80 minutos de incubación no varía substancialmente y no se obtuvo tendencia alguna que señalara que a mayor tiempo se obtendría mejor rendimiento, por lo que se seleccionó disminuir el tiempo de reacción a 40 minutos, pues no reduce el rendimiento pero favorece el tiempo de análisis.

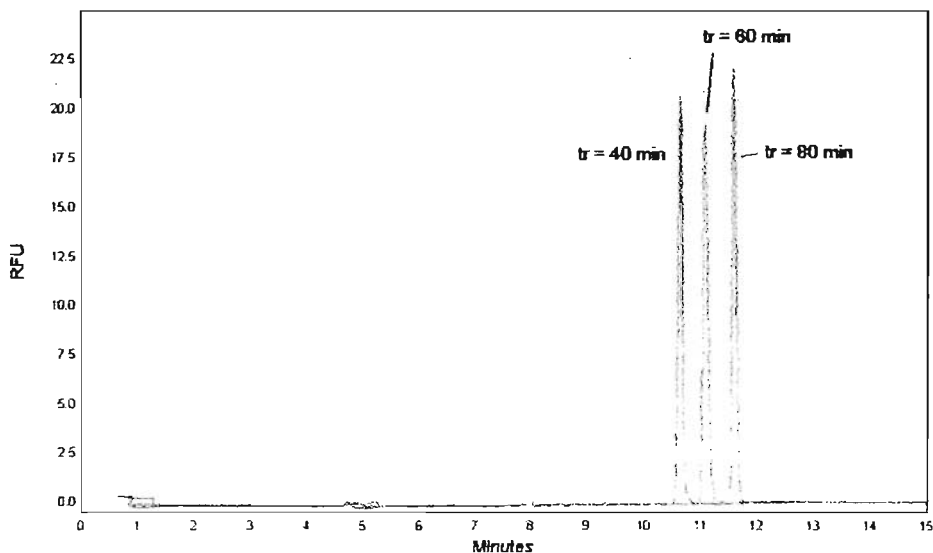


Figura 14. Electroferogramas registrados para el estándar GABA 0.3 mM cuando la muestras fueron incubadas a 40 °C durante 40, 60 y 80 minutos respectivamente. Solución amortiguadora de boratos 25 mM pH= 9.35, con SDC 40 mM y 10% de acetonitrilo, 20 KV, polaridad normal, columna negativa de 50 cm de longitud efectiva y 75 mM de diámetro interno.

Otro de los factores que se estudió fue el **orden de adición de los reactivos** durante la reacción de derivatización, pues considerando que el cianuro debe efectuar el ataque nucleofílico sobre uno de los grupos carbonilo del FQ, para que después el correspondiente grupo amino del neurotransmisor efectúe el ataque nucleofílico sobre ese mismo carbono, permitiendo la unión de las moléculas (Figura 9), se pensó que la adición del cianuro sobre el FQ antes de la amina, facilitaría la reacción y aumentaría el rendimiento en la formación de derivados. Sin embargo, no se encontró efecto alguno al añadir el cianuro o la muestra uno antes que otro, esto se debe a que, como se demostró anteriormente, la reacción requiere calentamiento para que se lleve a cabo.

#### 4.3.3. Efecto de la matriz de la muestra

La matriz de la muestra se refiere a la proporción de los disolventes que la forman. Este factor fue analizado debido a que el FQ y los derivatizados no son solubles en agua y entonces es necesario mantener una proporción suficiente de metanol para que los reactivos se mantengan en solución y de esta manera la reacción de derivatización y la separación sean óptimas.

El volumen de disolvente durante la reacción influye además en la dilución de la muestra y por lo tanto afecta el límite de detección, así que es deseable obtener la proporción agua-metanol óptima y de menor volumen posible. Para conseguirlo se optó por secar el metanol que disuelve la alícuota de FQ. Esto se logra creando vacío en un desecador y esperando el tiempo necesario. El secar el metanol permite reducir la dilución de la muestra, pues se agregan 10  $\mu\text{L}$  de FQ, equivalentes a 100 nmoles, (exceso suficiente para una reacción adecuada [16]), pero al secarlos este volumen se elimina en la cuenta final sin que diluya más la muestra. No obstante, es necesario resuspender en metanol para que la reacción ocurra en solución y los productos se encuentren solubles al momento de la inyección.

El medio acuoso de la muestra está constituido por el volumen de la mezcla de antioxidantes y LCRA del microdializado, el volumen del amortiguador de boratos del KCN y el volumen de agua del estándar de referencia. El medio orgánico está compuesto por el volumen de metanol requerido para solubilizar el FQ y los productos de la reacción.

Inicialmente se probó usar un porcentaje pequeño de metanol, pues de lo contrario se produce ensanchamiento de banda debido a una pobre distribución de los analitos en el amortiguador de corrida, pero se encontró que un porcentaje menor al 40% de metanol en la muestra, produce que se precipite y un porcentaje mayor al 50 % de metanol, origina que los picos se deformen.



Consecuentemente se varió la concentración de la solución de KCN con el fin de alterar el volumen acuoso en la reacción, así mismo se varió la cantidad de metanol usado para resuspender el FQ después de secarlo y se probó también añadir amortiguador de corrida diluido para ajustar la proporción y favorecer el acumulación de los picos en zonas determinadas aumentando su altura, sin embargo en muchas pruebas la dilución del analito era tan excesiva, que limitaba su detección, no se conseguía una muestra homogénea o los picos se deformaban en exceso.

Finalmente se encontró la proporción ideal al secar 10  $\mu\text{L}$  de FQ, resuspenderlos en 6  $\mu\text{L}$  de metanol, agregar 2  $\mu\text{L}$  de KCN 25 mM, 1  $\mu\text{L}$  de L-metil-o-treonina y 5  $\mu\text{L}$  de microdializado, pues no afecta el rendimiento de la reacción al conservar la relación FQ/aminas y KCN/aminas y además la muestra se mantiene disuelta desde el inicio de la reacción hasta el momento de la inyección y no se produce anomalía en la forma de los picos porque no se altera la distribución de los analitos en el amortiguador de corrida.

#### **4.4. CROMATOGRAFÍA ELECTROCINÉTICA MICELAR**

**Tipo y concentración de las sales del amortiguador de corrida:** El amortiguador de corrida más usado para electroforesis capilar es el de boratos. Se eligió trabajar con ácido bórico y borato de sodio porque es eficiente al mantener estable el pH, es transparente a los detectores y no interviene en la reacción de derivatización.

La concentración del amortiguador de corrida afecta la viscosidad y la fuerza iónica del medio de separación, lo que influye en el tiempo de migración, en la ventana de migración y en el ensanchamiento de banda originado por el calor de Joule. Con un amortiguador más concentrado todos los picos se retrasan, disminuye el flujo electroosmótico y la ventana de migración se abre, pero aumenta el calor de Joule. Fue seleccionada una concentración 25 mM de boratos, pues se reporta [22] que concentraciones mayores a 35 mM retrasan en exceso la migración de los compuestos y concentraciones menores a 20 mM, afectan la resolución de los picos.

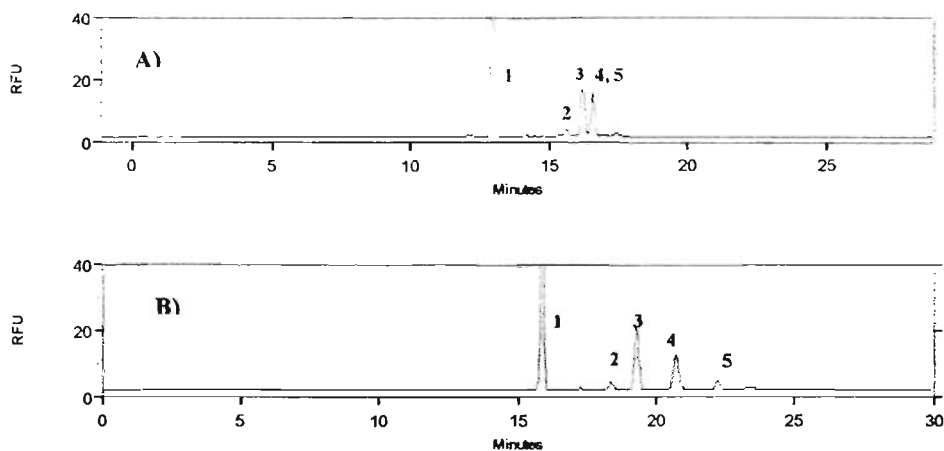
**Tipo de surfactante:** La elección del tipo de surfactante es una variable crítica para conseguir la separación por MEKC, pues se encuentra estrechamente relacionada con la resolución de la separación al intervenir en la partición, la selectividad, la eficiencia y en la ventana de migración. El tipo de surfactante empleado define el tipo de interacción que contribuirá en la partición de los analitos; además, dependiendo de su naturaleza se da el orden de migración.

Se investigó el efecto del uso de SDS o SDC durante la separación por MEKC. Ambos surfactantes son iónicos y forman micelas negativas. En ambos casos la separación, además de estar en función de la carga y el tamaño de los analitos, se dará por efecto de la hidrofobicidad de los compuestos, pero existen diferencias críticas entre estos dos surfactantes que conducen a elegir entre uno o el otro. En primera instancia, el SDS a concentración superior a la concentración micelar crítica, es jabonoso y ensucia la interfase del equipo y los tapones de los viales donde se dispensan las soluciones amortiguadoras. Esto origina la acumulación excesiva de sales que producen errores en la corriente y la suspensión de las corridas. Por otro lado, el SDC prácticamente no es jabonoso en comparación con el SDS a una concentración superior a su CMC y no produce arcos en el voltaje. Así mismo el SDS es incapaz de formar micelas en presencia de altos porcentajes de modificadores orgánicos y el SDC soporta la presencia de hasta un 50% de algún solvente orgánico.

El surfactante elegido fue el SDC, principalmente por su capacidad de formar micelas en presencia de altas concentraciones de solventes orgánicos, pues debido a que los compuestos que deseamos separar son altamente hidrofóbos es necesaria la presencia de algún modificador orgánico en el amortiguador de corrida para mejorar la partición, además evitamos las frecuentes caídas de corriente que se presentaron con el uso de SDS.

**Concentración del surfactante:** La concentración seleccionada para el SDC en el amortiguador de corrida fue 35 mM, pues a dicha concentración que es más alta que la concentración micelar crítica reportada (Tabla.2), se tiene la seguridad de que se han formado las micelas y no se prolonga el tiempo de análisis al aumentar en demasía la viscosidad del amortiguador de corrida

**pH y porcentaje de acetonitrilo en la solución amortiguadora de separación:** Una vez establecidos varios parámetros, tanto de las condiciones de reacción como de separación en análisis por separado, continuaron los análisis simultáneos para todos los analitos de interés. Resultó evidente que las condiciones de separación hasta entonces usadas no separaban los picos de los estándares (Figura 15-A). Para corregir el problema, se estudió el efecto del pH y del porcentaje de modificador orgánico en el medio de separación, sobre la resolución de los picos.



**Figura 15. (A)** Electroferograma registrado para la mezcla de los estándares de dopamina, GABA, glutamato, norepinefrina y l-metil-o-treonina. Amortiguador de boratos 25 mM, pH 9.3, SDC 35 mM, 10% de acetonitrilo, 20 KV, inyección a 0.7 psi por 5s, polaridad normal, capilar negativo de 50 cm con DI de 75 $\mu$ m. **(B)** Electroferograma obtenido con los valores de pH y %ACN obtenidos en el diseño experimental factorial.

Para la elección del pH y el porcentaje de acetonitrilo en la solución amortiguadora usada durante la separación, se practicó un diseño experimental factorial 2<sup>2</sup>. Los factores por analizar fueron las variables controlables antes mencionadas y la respuesta medida fue la resolución entre cada uno de los picos estándares de los NT bajo las condiciones señaladas.

Inicialmente se hizo el estudio con un nivel alto de acetonitrilo del 13% y un nivel bajo del 7%, y valores de pH de nivel alto de 9.7 y nivel bajo igual a 9.0. Con dichas condiciones se encontró que para 2 de los 4 amortiguadores separados no se registró separación, por lo que no fue posible obtener datos numéricos de la respuesta resolución y fue imposible analizar los resultados por diseño experimental. A pesar de esto, al analizar los electroferogramas es posible concluir que el amortiguador preparado con pH = 9.7 y con acetonitrilo al 13 % es el que mejor resolución ofrece. Tomando en cuenta lo anterior, se concluyó que era necesario practicar un nuevo estudio, ahora con un rango de menor amplitud para los niveles alto y bajo que se encontrara cercano al amortiguador que resultó con la resolución más aceptable (pH = 9.7 y acetonitrilo al 13 %).

### ESTUDIO DE AMORTIGUADORES

A= pH  
B= % ACN

Nivel	A	B
-1	9.5	10
+1	9.7	13
Promedio	9.6	11.5
Intervalo	0.2	3

RESOLUCIÓN 1,2					
A	B	EXPERIMENTO	REPLICA		SUMATORIA
			1	2	
-	-	9510	0.6580	0.9935	1.9593
+	-	9710	0.9658	0.9959	1.9617
-	+	9513	2.5942	2.6169	5.2112
+	+	9713	1.8713	1.9237	3.7950

RESOLUCIÓN 2.3					
A	B	EXPERIMENTO	REPLICA		SUMATORIA
			1	2	
-	-	9510	0.8432	0.9854	1.8286
+	-	9710	1.6683	1.4774	3.1457
-	+	9513	3.9629	3.8734	7.8364
+	+	9713	2.1958	2.2983	4.4942

RESOLUCIÓN 3,4					
A	B	EXPERIMENTO	REPLICA		SUMATORIA
			1	2	
-	-	9510	2.0820	1.7262	3.8082
+	-	9710	0.8686	0.5375	1.4062
-	+	9513	1.7320	1.7010	3.4330
+	+	9713	3.5015	3.4349	6.9360

**Resolución 1,2**

Método de Yates

Fuente	Experimento	$\Sigma$	1	2	Efecto	Coficiente
I	9510	1.9593	3.9211	12.9272	3.2318	1.6159
A	9710	1.9617	9.0061	-1.4137	-0.3534	-0.1767
B	9513	5.2112	0.0024	5.0851	1.2713	0.6356
AB	9713	3.7950	-1.4161	-1.4185	-0.3546	-0.1773

Ecnación:  $Y = 1.6159 - 0.1767A + 0.63B - 0.177AB$

**Resolución 2,3**

Método de Yates

Fuente	Experimento	$\Sigma$	1	2	Efecto	Coficiente
I	9510	1.8286	4.9743	17.3049	4.3262	2.1631
A	9710	3.1457	12.3306	-2.0251	-0.5063	-0.2531
B	9513	7.8364	1.3171	7.3563	1.8391	0.9195
AB	9713	4.4942	-3.3422	-4.6593	-1.1648	-0.5824

Ecnación:  $Y = 2.1631 - 0.2531A + 0.9195B - 0.5824AB$

**Resolución 3,4**

Método de Yates

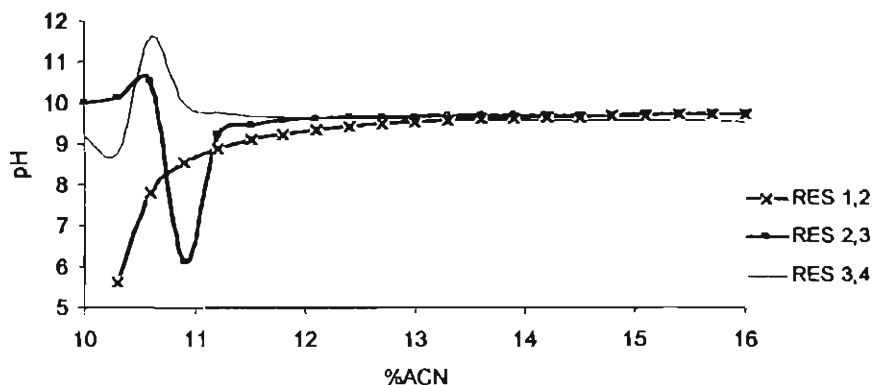
Fuente	Experimento	$\Sigma$	1	2	Efecto	Coefficiente
I	9510	3.8082	5.2144	15.5834	3.8959	1.9479
A	9710	1.4062	10.3690	4.5339	1.1335	0.5667
B	9513	3.4330	-2.4021	5.1546	1.2887	0.6443
AB	9713	6.9360	6.9360	6.9360	1.7340	0.8670

Ecuación:  $Y = 1.9479 + 0.5667A + 0.6443B + 0.8669AB$

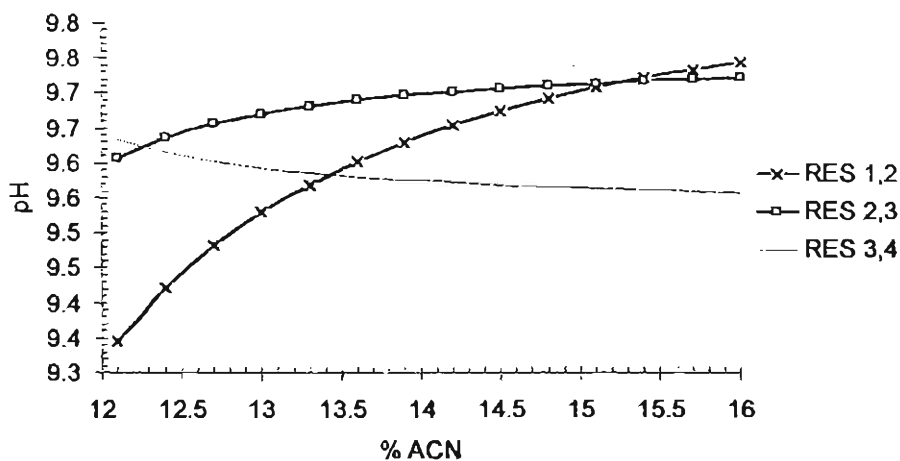
Se desea obtener una resolución igual a 2.5, por lo que se trazan las gráficas de contorno para hallar las condiciones de pH y contenido de acetonitrilo (ACN) en el amortiguador de separación, a las cuales se obtiene dicha respuesta.

Gráfica de contornos Resolución = 2.5			
% ACN	pH Res 1,2	pH Res 2,3	pH Res 3,4
16	9.745	9.721	9.556
15.7	9.733	9.719	9.558
15.4	9.721	9.716	9.560
15.1	9.707	9.713	9.562
14.8	9.691	9.710	9.565
14.5	9.673	9.706	9.568
14.2	9.652	9.701	9.571
13.9	9.629	9.696	9.575
13.6	9.601	9.689	9.580
13.3	9.569	9.681	9.586
13	9.530	9.670	9.594
12.7	9.482	9.655	9.603
12.4	9.422	9.636	9.615
12.1	9.346	9.606	9.632
11.8	9.243	9.559	9.657
11.5	9.100	9.467	9.697
11.2	8.884	9.219	9.773
10.9	8.525	6.101	9.968
10.6	7.805	10.522	11.616
10.3	5.633	10.104	8.758
10	5.401	9.982	9.201

### CONTORNOS RESOLUCIÓN=2.5



### CONTORNOS RESOLUCIÓN= 2.5



#### Grafica de contornos

Señala el valor que adquieren dos variables en función de una sola respuesta, la intersección de dos o mas respuestas indica que en dicho punto todas las respuestas comparten los mismos valores de pH y % ACN.

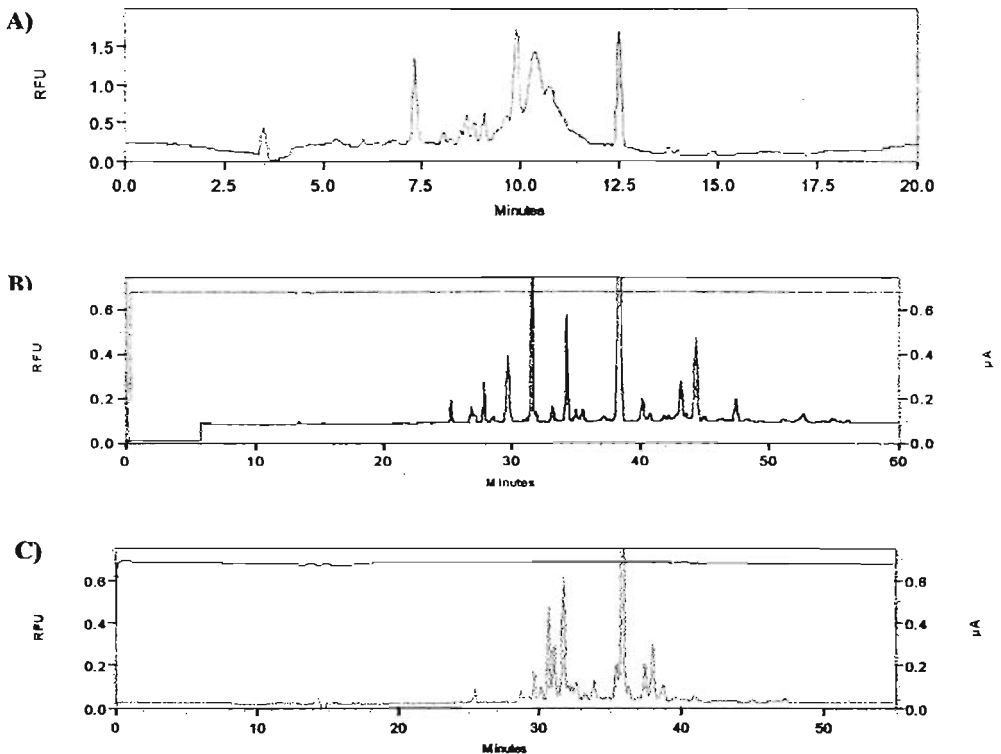
Como se puede observar en la gráfica de contornos, no se encontró intersección para las tres curvas con las condiciones analizadas, considerando la resolución 2,3 y 3,4 de prioridad porque son los picos que poseen menor resolución, se optó por usar los valores en los que se interceptan dichas curvas, estos son  $\text{pH} = 9.6$  y  $\% \text{ACN} = 12$ . Al sustituir los valores codificados correspondientes de  $\text{pH}$  y  $\%$  de ACN en cada una de las ecuaciones, se encuentra que a dichas condiciones la resolución 1,2 será de **1.82**, la resolución 2,3 de **2.46** y la resolución 3,4 de **2.16**. Todos los valores son mayores a 1.5 y muy cercanos o mayores a 2, por lo que se consideran apropiados (**Figura 15-B**).

**Efecto del tipo y concentración del modificador orgánico en la ventana de migración:** El incluir un solvente orgánico en la solución amortiguadora de separación, puede modificar la partición y la ventana de migración del análisis, pues se altera la polaridad de la fase acuosa, lo que conduce a aumentar la afinidad de algunos analitos por la fase externa y además disminuye el flujo electroosmótico y se abre la ventana de migración.

El amortiguador de corrida que se usó inicialmente para la separación contenía acetonitrilo al 12%, condición que permitía una buena resolución para el análisis simultáneo de los estándares, pero no así para el análisis de las muestras biológicas obtenidas por microdiálisis (**Figura 16-A**) ya este porcentaje de modificador orgánico no es suficiente ni para disminuir la partición ni para afectar efectivamente el FEO y abrir la ventana de migración. Es evidente la mala separación del microdializado debido a que la mayoría de los compuestos son altamente hidrofóbicos y se cargan del lado de la micela (alta partición) y por la ventana de migración reducida (menos de 20 minutos).



El acetonitrilo es un modificador orgánico que altera la partición pero no afecta el FEO ni siquiera a altas concentraciones. Debido a que la meta final era aumentar la resolución aumentando la ventana de migración y/o disminuyendo la partición, fue necesario sustituirlo. Se probó el efecto en la resolución por iguales porcentajes de metanol e isopropanol en el amortiguador de corrida (Figura 16-B vs 16-C), encontrando que ninguno disminuye significativamente la partición, pero el uso de metanol abre en mayor proporción la ventana de migración, aunque alarga el tiempo de análisis.



**Figura 16.** Electroferogramas registrados al analizar la misma muestra de microdializado con diferentes concentraciones de distintos modificadores orgánicos: Acetonitrilo 12% (A), metanol 27.5% (B), isopropanol 27.5% (C). Amortiguador de boratos 25 mM, pH 9.6, SDC 35 mM, 20 KV, inyección a 0.7 psi por 5 s, polaridad normal, capilar negativo de 50 cm con DI de 75 $\mu$ m.

**Tipo y longitud del capilar:** Se seleccionó el típico capilar de sílice fundida sin recubrimientos, pues a pesar de que es favorable disminuir el FEO, en MEKC resulta poco eficiente este método [10]. Originalmente se usó un capilar de 50 cm de longitud al detector para desarrollar el método, pero después de encontrar necesaria la adición de un alto porcentaje de metanol, lo que alarga el tiempo de análisis, se probó el efecto de capilares de 30 y 40 cm en la resolución y en el tiempo de análisis total. Se encontró que a mayor longitud, mejor resolución debido a que aumenta el número de platos teóricos y con esto la eficiencia de la separación. Se estudió la combinación longitud y porcentaje de ACN que ofreció la mejor resolución y menor tiempo de análisis, resultando 30% de ACN con 40 cm de longitud efectiva las mejores condiciones, pues se obtiene una separación casi tan buena como con el capilar de 50 cm de longitud efectiva y el tiempo de análisis se reduce aproximadamente en 15 minutos.

**Acondicionamiento del capilar:** El ciclo de acondicionamiento del capilar es fundamental para el tiempo de análisis y su reproducibilidad, por lo que resulta indispensable especificar el tiempo, presión, orden de lavado y tipos de solventes óptimos para el método.

Al montar un nuevo capilar dentro del equipo, debe ser acondicionado para que sirva como un soporte eficiente. Los capilares nuevos fueron tratados con lavados de 5 minutos de acetonitrilo al 1%, 5 min de HCL 1%, 5 min NaOH 1% y 5 min de la solución amortiguadora de corrida, intercalando en cada enjuague un lavado con agua desionizada y filtrada durante 3 minutos. Después de cada corrida se lavó el capilar con NaOH 1% durante 2 min, agua durante un minuto y amortiguador de corrida durante 4 minutos. De esta manera se extraen con lavados a presión (20 psi), todos los compuestos que permanezcan dentro del capilar después de la separación, sin importar su naturaleza química.

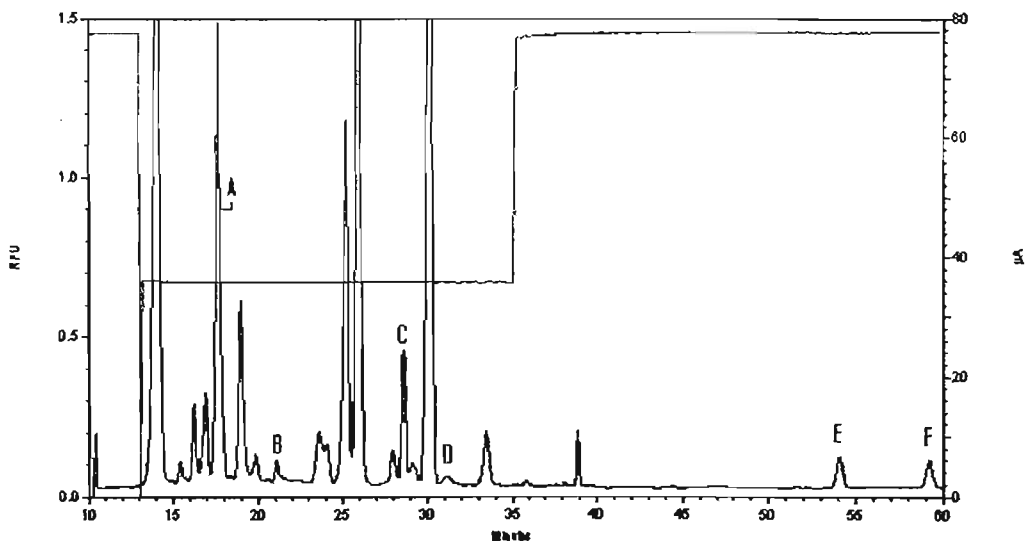
**Temperatura del capilar:** Se eligió mantener la temperatura del capilar en 15°C pues es la más baja posible en el equipo. Mantener una temperatura baja, mantiene una eficiente dispersión del calor de Joule y hace posible aplicar altos voltajes, que es altamente deseable en este caso para disminuir en todo lo posible el tiempo de análisis.

**Tipo, tiempo y presión de inyección:** Se optó por efectuar la inyección de la muestra de manera electrodinámica pues acelera el análisis, ya que de hacer la inyección electrocinética, la micela, junto con la mayoría de los compuestos, tardarían más en ser detectados en el electrodo negativo pues al tiempo de separación se le sumaría el tiempo en el que migran completamente desde el vial que contiene la muestra, hasta el interior del capilar.

Por otro lado, a mayor presión y a mayor tiempo de inyección, se carga una cantidad mayor de muestra dentro del capilar, favoreciendo la sensibilidad del método. Sin embargo, al mismo tiempo disminuye la relación superficie-volumen de la muestra dentro del capilar, lo que genera ensanchamiento de banda por el calor de Joule, se estableció que 0.7 psi por 5 s es la mejor opción.

**Polaridad de la separación:** Considerando que durante la separación se optó por el uso de SDC, surfactante iónico que forma micelas negativas y que el amortiguador de separación o corrida, posee un pH alto, al cual el flujo electroosmótico es potente, se concluyó que la separación debía efectuarse a polaridad normal, pues de lo contrario el flujo electroosmótico no permite la detección de los analitos.

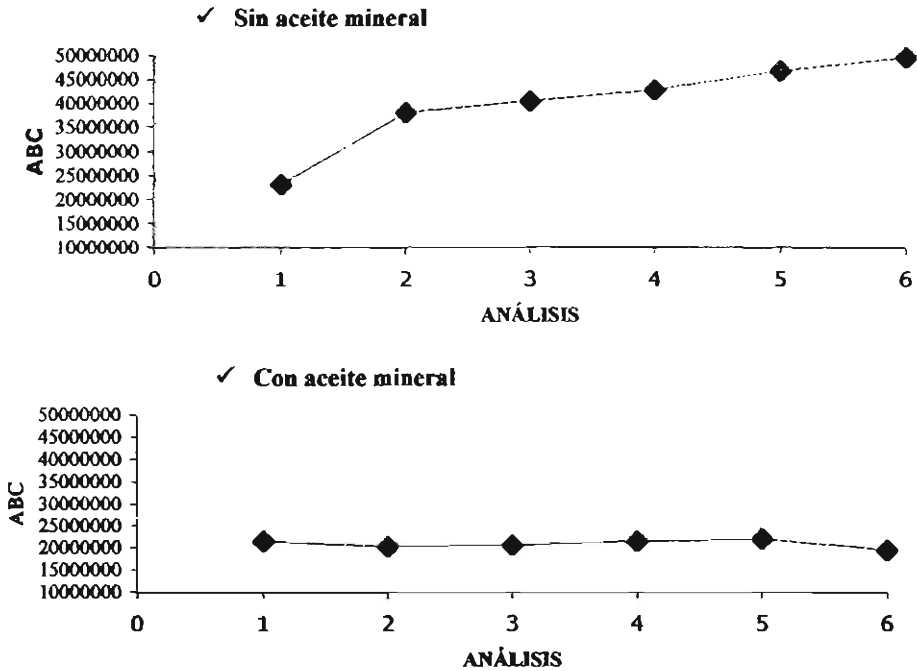
**Voltaje de la separación:** el voltaje durante la separación está altamente relacionado con el tiempo de análisis, pero un voltaje alto (30KV) causa que los picos migren muy juntos y no se puedan resolver. Se encontró que el voltaje óptimo para la separación de la muestra con un amortiguador de corrida de boratos 25 mM, pH de 9.6, con 35 mM de SDC y 30% de metanol es 20 KV en una columna de 40 cm de longitud al detector. Dichas condiciones producen un tiempo de corrida de 80 minutos con treinta minutos muertos antes del metanol y 20 minutos más entre la dopamina y el glutamato, por lo que se optó por variar el voltaje durante el análisis, disminuyendo así el tiempo de corrida a 60 minutos (Figura 17).



**Figura 17.** Electroferograma registrado en el análisis de un microdializado de corteza insular en condiciones básicas. Amortiguador de boratos 25 mM, pH 9.6, SDC 35 mM, 30% de metanol, inyección a 0.7 psi por 5 s, polaridad normal, capilar negativo de 40 cm con DI de 75 $\mu$ m. Voltaje variable durante el análisis: 30 KV los primeros minutos, luego 20 KV y finalmente 30 KV. El trazo superior corresponde al monitoreo de la corriente inducida por la aplicación de distintos voltajes, y el trazo inferior corresponde al monitoreo de la detección.

Los picos identificados en el electroferograma son: estándar de referencia l-metil-o-treonina (A), norepinefrina (B), GABA (C), dopamina (D), glutamato (E), aspartato (F).

**Pérdida de muestra:** Al momento de hacer análisis consecutivos de una misma muestra, se observó que el área registrada para un mismo analito aumentaba con respecto al tiempo. Esto se debe a dos factores importantes: el pequeño volumen que se carga dentro del equipo (10 $\mu$ L) para el análisis y a que la matriz de la muestra está compuesta por un alto porcentaje de metanol. Debido a esto, el disolvente se pierde con respecto al tiempo y entonces la muestra se concentra y consecuentemente se registran áreas cada vez mayores.



**Figura 18.** Variación de las áreas registradas por diferentes análisis con respecto al tiempo de una misma muestra de GABA 0.3 mM, usando aceite mineral para evitar la pérdida del disolvente y sin usarlo, respectivamente. Amortiguador de boratos 25 mM, pH= 9.35, SDC 40 mM, 10% de acetonitrilo, separación a 20 KV, polaridad normal.

Dicho problema limitaba uno de los principales objetivos del método, la automatización, pues la pérdida del disolvente con respecto al tiempo implicaba que las muestras no podrían permanecer dentro del equipo el tiempo requerido. Con el fin de encontrar una solución, se probó el uso de aceite mineral, a manera de cubierta para evitar la pérdida de muestra.

El procedimiento consistió en cargar los 10  $\mu\text{L}$  de muestra como normalmente se hacía. Posteriormente se medían 5  $\mu\text{L}$  de aceite mineral y se vertían cuidadosamente dentro del tubo de carga de muestra, a manera que se formaran dos capas, siendo la superior la del aceite, brindando protección y evitando que el disolvente de la matriz de la muestra se pierda.

En la **Figura 18** se presentan las gráficas trazadas de el área en función del tiempo para una misma muestra de estándar de GABA 0.3 mM, en la que no se usó aceite, resulta evidente una pendiente positiva, mientras que para los registros con aceite, la recta permanece constante.

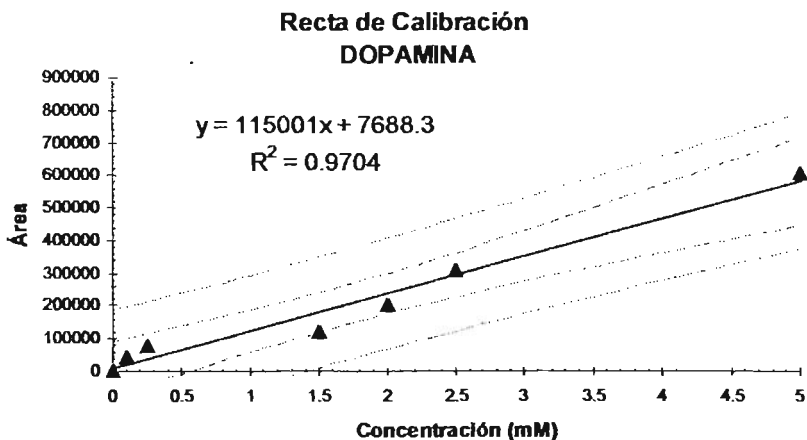
Conjuntamente se comprobó que la presencia de aceite no interfiriera con el análisis o con la inyección a presión, para lo cual no se encontró diferencia entre el análisis con y sin aceite, de un mismo estándar de GABA, a un mismo tiempo. Así mismo, se comprobó la estabilidad de la preparación (**Tabla 9**) como se mencionó anteriormente. Dicho estudio de estabilidad comprobó que las muestras son estables con este esquema de preparación hasta por 12 h. Su lapso corto de estabilidad se debe principalmente al aceite, pues debido a que los derivatizados son altamente hidrofóbicos, tienden a migrar hacia la fase conformada por el aceite, lo que es evidente al observar que después de algunas horas (más de 12 h), el aceite mineral presenta una coloración rojiza que es propia de la muestra, después de la reacción de derivatización.

#### 4.5. CALIBRACIÓN INICIAL

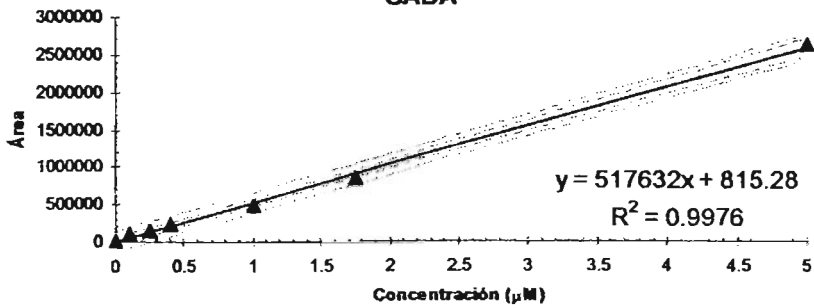
La calibración de un instrumento analítico se refiere a la obtención de la expresión matemática que indica la relación entre respuesta que arroja el instrumento para una concentración de analito determinada.

Entre la calibración por estándar interno o externo, se optó por la segunda por ser práctica y sencilla, supliendo sus desventajas con el uso del estándar de l-metil-o-treonina en cada corrida, pues permite monitorear la reacción de derivatización y corregir errores en la reproducibilidad de la inyección y la pérdida de muestra.

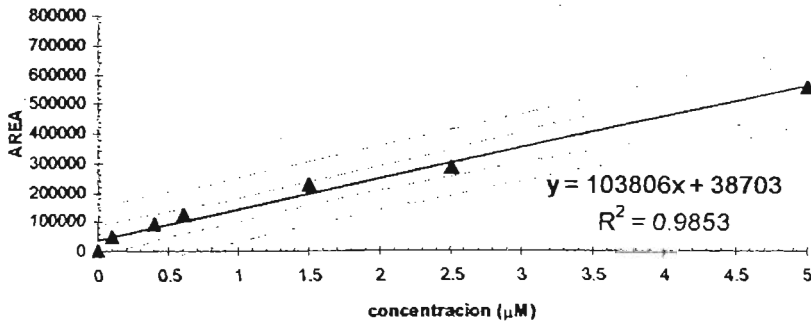
Considerando que se ha reportado una concentración basal de los neurotransmisores de alrededor de 1  $\mu\text{M}$  y que por efecto de la presentación de un estímulo gustativo nuevo o aversivo, la concentración podría aumentar hasta en un 300% de acuerdo a las publicaciones, se seleccionaron 6 puntos para cada curva, siendo el más alto el equivalente al 500% con respecto a la concentración basal esperada. Se prepararon diluciones de diferentes concentraciones de cada uno de los analitos de interés, se derivatizaron y analizaron, encontrando las siguientes curvas de calibración.



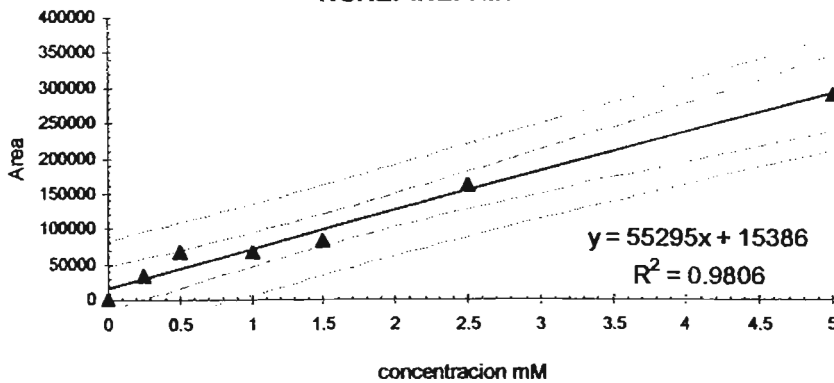
**Recta de Calibración  
GABA**



**Recta de Calibración  
GLUTAMATO**



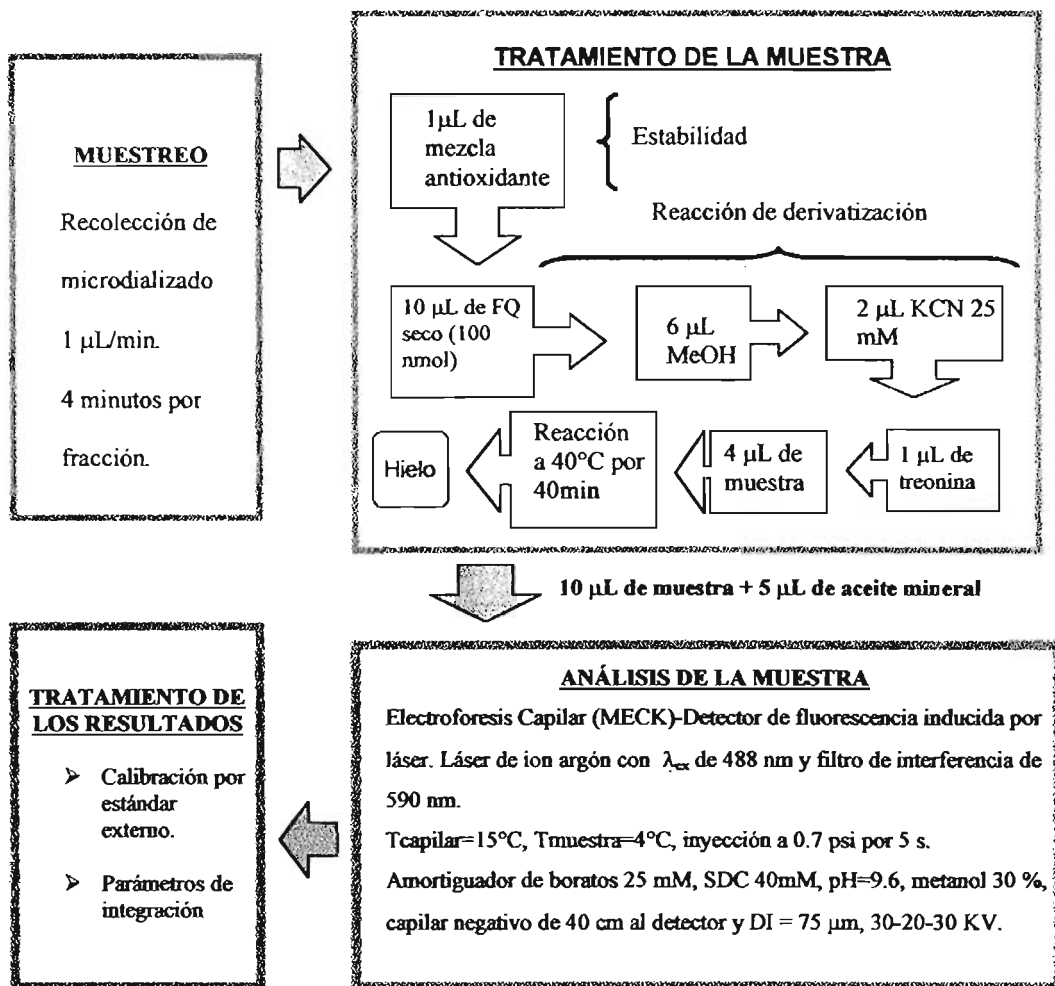
**Recta de Calibración  
NOREPINEFRINA**





En las rectas de calibración trazadas para cada neurotransmisor, se presenta la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación, así mismo se traza el llamado cinturón de confianza, el cual indica que tan confiable es cada respuesta en función de las demás. Los datos correspondientes a cada curva se presentan en el apéndice 2, así como los criterios de la calibración.

#### 4.6. EL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO Y LOS PARÁMETROS DEL DESARROLLO DEL MÉTODO



En e diagrama anterior se muestran los pasos de cada subprocesso del proceso analítico que se desarrolló así como los valores que se fijaron para cada variable, siguiendo la metodología descrita. Se hizo el estudio de estabilidad presentado en las tablas 7, 8 y 9, la calibración inicial por estándar externo y la cuantificación de las muestras.

#### 4.8. CUANTIFICACIÓN DE NOREPINEFRINA, GABA, DOPAMINA Y GLUTAMATO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Se determinó la concentración de cada neurotransmisor en corteza insular, encontrando que la concentración basal promedio en las muestras de microdializado fue de  $1.79 \pm 0.544 \mu\text{M}$  para glutamato,  $2.955 \pm 0.468 \mu\text{M}$  para norepinefrina,  $0.035 \pm 0.008 \mu\text{M}$  para GABA y  $0.206 \pm 0.121 \mu\text{M}$  para dopamina.

Con objeto de comprobar la resolución temporal que ofrece el método, a continuación se presenta la cinética de liberación de norepinefrina con respecto al tiempo para la presentación de sacarina 1%, en comparación con agua (control) y la cinética de liberación de glutamato tras la inyección del inductor del malestar gástrico (LiCl 0.4 M), en comparación con inyección de NaCl 0.4 M (control). Para el análisis estadístico se empleó una t de Student no pareada. Un valor de  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

Como se observa en la figura 19, al presentar la solución de sacarina se observa un incremento estadísticamente significativo de norepinefrina en las fracciones correspondientes a los 16 y 20 min (tras el consumo del sabor nuevo) de la cinética de liberación, con respecto al grupo que bebió agua, lo que indica que un estímulo gustativo nuevo produce cambios noradrenérgicos en CI, pero no así un estímulo familiar como el agua.

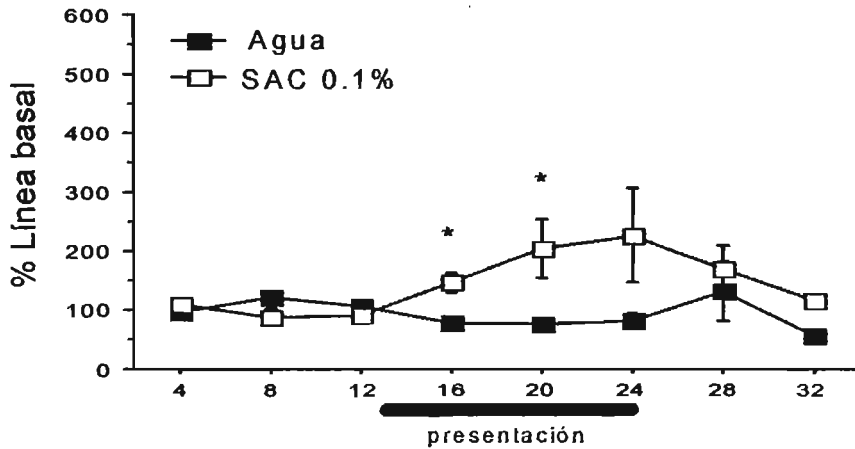
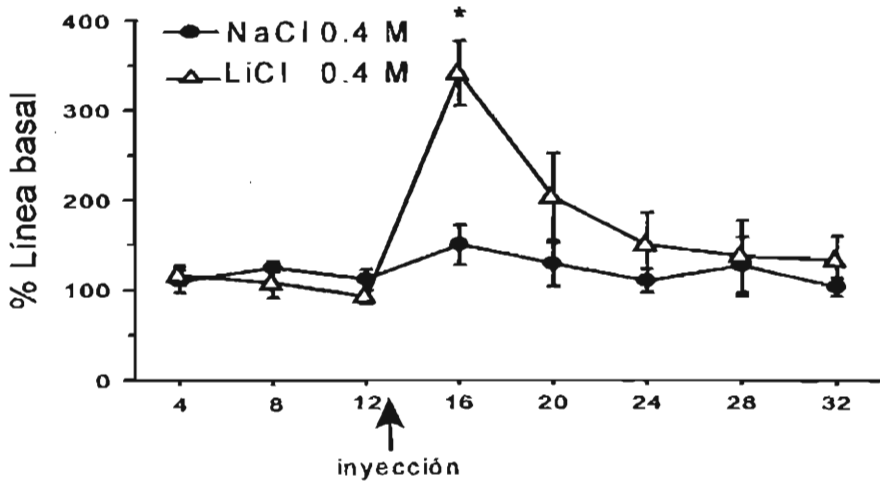
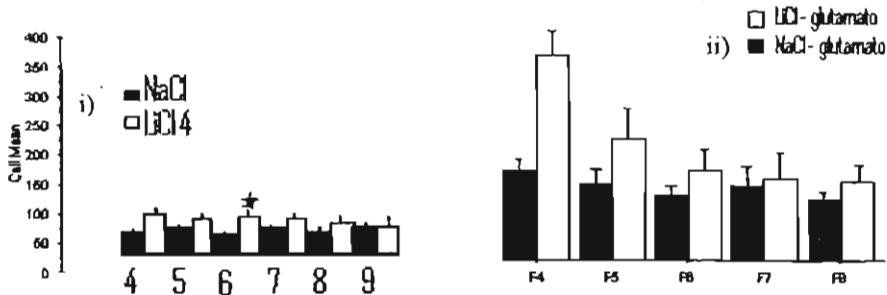


Fig. 19 Cinética de la liberación que muestra los cambios en el porcentaje de norepinefrina durante la presentación de una solución de sacarina al 0.1% y de agua. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos en las fracciones correspondientes a 16 y 20 min. Los datos se graficaron como porcentaje de línea basal de liberación, los cuadros negros corresponden a la cinética de liberación de glutamato del grupo al que se le presentó agua, los cuadros blancos corresponden a la cinética de liberación de glutamato del grupo al que se le presentó sacarina 0.1%. La barra negra corresponde al tiempo de presentación de agua o sacarina. \*  $P < 0.05$ . Para ambos grupos  $n = 4$ .

Durante la inyección de la solución de cloruro de litio 0.4 M, inductor del malestar gástrico, se encontraron resultados interesantes al comparar con respecto a la inyección de una solución control equimolar de NaCl. La figura 20 nos muestra que cuando se aplicó la inyección de LiCl 0.4M, la liberación de glutamato se incrementó alrededor de un 350 % de la línea base de liberación, aumento que no se presentó en el grupo al cual se le inyectó NaCl 0.4 M. La diferencia entre los grupos es estadísticamente significativa ( $t=4.251$ ,  $p < 0.05$ ) en la fracción que corresponde a los 16 min (tiempo al que se observa la respuesta a la inyección), lo que sugiere que la respuesta glutamatérgica en CI es debida al inductor de malestar gástrico específicamente puesto que la solución de sodio que no induce tal malestar no produce aumento significativo.



**Figura 20.** Cinética de liberación que muestra los cambios en el porcentaje de glutamato tras la inyección de LiCl 0.4 M para un grupo y NaCl 0.4 M para otro. Se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos en la fracción que indica la respuesta a la inyección. La flecha indica el momento de la inyección. \*P<0.05. Para ambos grupos n = 5.



**Figura 21.** Comparación entre la cinética de liberación para glutamato en corteza insular tras la aplicación del inyección de la solución inductora del malestar gástrico (LiCl 4M), usando como control inyección equimolar de NaCl. (i) Cinética reportada con HPLC- detector electroquímico [6], (ii) Cinética obtenida usando el método analítico desarrollado (EC-LIF).

Finalmente en la **Figura 21**, en donde se compara la cinética de liberación de glutamato obtenida por EC-LIF vs HPLC-detector electroquímico, se observa que en ambos resultados se expresa una tendencia similar, la cual señala un incremento en la liberación de dicho transmisor por efecto de la percepción del dolor visceral que produce la solución de LiCl y no por efecto del dolor por la inyección, así mismo es evidente que el método recién desarrollado ofrece una mejor resolución temporal para analizar muestras obtenidas por microdiálisis, ya que en el análisis (i) el tiempo total de muestreo es mayor pues cada fracción requiere ser de mayor volumen (20  $\mu\text{L}$ ) por lo que la respuesta se diluye y sólo se observa un incremento de aproximadamente 100% con respecto a la línea base, mientras que mediante EC (ii) se observa un incremento de 350%.

## V. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico que combina la técnica de microdiálisis de libre movimiento con la separación por cromatografía electrocinética micelar y la detección por fluorescencia inducida por láser.

Dicho método cuantifica la cantidad de norepinefrina, GABA, dopamina y glutamato que se liberan al espacio intersticial celular en corteza insular durante una sinápsis química, de manera conjunta.

El método desarrollado es capaz de analizar pequeños volúmenes de muestra (hasta 5  $\mu\text{L}$ ) y es altamente sensible, por lo que ofrece una muy buena resolución temporal, logrando hacer cinéticas de liberación de neurotransmisores muy detalladas, pues determina la concentración de cada uno de los cuatro neurotransmisores cada cuatro minutos.

El método desarrollado es completamente automático para el análisis de hasta 10 muestras, pues en el estudio de estabilidad se concluye que las muestras permanecen estables y si sufrir pérdida de disolvente hasta por 12 h, cada análisis dura 60 minutos y entre corrida y corrida es mínimo el tiempo de acondicionamiento del capilar.

La separación registrada es eficiente, aunque a costa del tiempo total de análisis, que se prolongó hasta 60 minutos. Se encontraron los valores óptimos de pH, % de modificador orgánico, voltaje, inyección y tipo y longitud del capilar para la separación.

La calibración que se practicó fue por estándar externo, las curvas ensayadas cubrieron el rango de concentraciones requeridas y presentaron un coeficiente de correlación aceptable. El uso del estándar de referencia L-metil-o-treonina, facilita el monitoreo de una reacción de derivatización adecuada y una detección correcta, sin afectar la resolución de la separación.

Tabla 10.

HPLC vs EC, para el análisis de muestras obtenidas por microdiálisis

Parámetro	Electroforesis Capilar	HPLC
Volumen mínimo de muestra requerido	5 $\mu$ L	20 $\mu$ L
Tiempo de análisis	60 minutos Determinación conjunta	30 minutos por cada neurotransmisor
Tiempo total de acondicionamiento de la columna (capilar).	Hasta 8 minutos	Hasta 10 horas
Resolución temporal	Una fracción cada minuto	Una fracción cada 20 minutos
Volumen de soluciones gastado	Menos de 1 mL por muestra analizada	54 mL por muestra analizada

Finalmente, al comparar los resultados obtenidos tiempo atrás en un trabajo desarrollado en este mismo laboratorio (Tabla 10), donde se determinó la cinética de liberación de glutamato tras la inyección del inductor gástrico, usando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica, se corroboraron los resultados, observando un efectivo aumento en la liberación después de la inyección. Sin embargo, se hacen evidentes las ventajas de este método, en cuanto a la resolución temporal, pues dicho aumento determinado en sólo 4 minutos es mucho más dramático que el reportado antes en 20 minutos, además en un mismo análisis es posible hacer el seguimiento de la liberación de cuatro neurotransmisores claves para el aprendizaje gustativo.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Purves D., Augustine G., Fitzpatrick D., Katz L., LaMantia A., McNamara J., *Invitación a la Neurociencia*, Editorial médica panamericana, Argentina 2001, pp. 93-95, 109-114.
- [2] Di Chiara, *Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection*, *Neuropharmacology*, (2004) 47, 227-241.
- [3] Everitt B.J., *Associative processes in addiction and reward. The role of amygdale-ventral striatal subsystems*, *Ann N Y Acad Sci*, (1999) 877, 413-438.
- [4] Mark G.P., Weinberg J.B., Rada P.V., Hoebel, B.G., *Extracellular acetylcholine is increased in the nucleus accumbens following the presentation of an aversively conditioned taste stimulus*, *Brain Research* (1995) 688, 184-188.
- [5] Miranda M.I., Ramírez-Lugo L., Bermúdez-Rattoni F., *Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus*, *Brain Research*, (2000) 230-235.
- [6] Miranda M.I., Ferreira G., Ramírez-Lugo L., Bermúdez-Rattoni F. *Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation*, *PNAS* 99, (2002), 17, 11417-11422.
- [7] Miranda M.I., LaLumiere R.T., Buen T.V., Bermudez-Rattoni F., McGaugh J. L. *Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory*, *European Journal of Neuroscience* (2003) 18, 2605-2610.



- [8] Moore H., Fadel J., Sarter M., Bruno J.P, *Role of accumbens and cortical dopamine receptors in the regulation of cortical acetylcholine release*, *Neuroscience*, (1999) 88(3) 811-822.
- [9] Monika Orłowska-Majdak, *Microdialysis of the brain structure: application of behavioral research on vasopressin and oxytocin*, *Acta Neurobiol Exp* 2004, 64: 177-188.
- [10] Landers James P. s, *Handbook of Capillary Electrophoresis*, segunda edición 1997, CRC press, USA.
- [11] Davis J. M., *Random-Walk theory of non-equilibrium plate height in micellar electrokinetic capillary chromatography*, *Anal. Chem.*, 61. 251. 1989.
- [12] Aiken J. H., and Huie, C. W., *Effects of 1-alkanols on separation performance in micellar electrokinetic capillary chromatography*, *J. Microcolumn Separations*. 5, 9, 1994.
- [13] Agilent technologies, <http://www.chem.agilent.com/temp/rad2C3ED/00016811.pdf>
- [14] Hong Wan, Lans G. Blomberg, *Chiral separation of aminoacids and peptides by Capillary electrophoresis*, *Journal of Chromatography A*. 875 (2000) 43-88.
- [15] kuhn R., *Capillary electrophoresis*, 1993, p 130.
- [16] Molecular Probes, ATTO-TAG™ CBQCA and ATTO-TAG™ FQ, Product information, 2001.

- [17] Presley A. D., Fuller K. M., Arriaga E. A., *MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*, Journal of Chromatography B, 793 (2003) 141–150.
- [18] Pinto D., Arriaga E. A., Schoenherr R. M., Shinn-Huey Chou, Dovichi N. J., *Kinetics and apparent activation energy of the reaction of the fluorogenic reagent 5-furoylquinoline-3-carboxaldehyde with ovalbumin*, Journal of Chromatography B, 793 (2003) 107–114.
- [19] Le Zhang, Shen Hu, Lillian Cook, Norman J. Dovichi, *Analysis of aminophospholipid molecular species by methyl-beta-cyclodextrin modified micellar electrokinetic capillary chromatography with LIF detection*, Electrophoresis. 2002 Sep;23(17):3071-7.
- [20] Berquist J., Gilman D. S., Ewin A. G., Ekman R., *Analysis of human cerebrospinal fluid by capillary Electrophoresis with laser induced fluorescence detection* (1994), Anal. Chem. 66; 3512-3518.
- [21] Chen Z., Wu J., Baker G.B., Parent M., Dovich N.J., *Aplication of Capillary Electrophoreis with laser-induced fluorescence detection to the determination of biogenic amines and aminoacids in brain mycrodialisate and homogenate samples* (2001) Journa of Chromatography A 914; 293-298.
- [22] Liu X., Yang L., Lu Y., *Determination of biogenic amines by 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde and Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection* (2003), Journal of Chromatography A. 998; 213-219.

[23] Wu J., Chen Z., Dovichi N.J., Reaction rate, activation energy and detection limit for the reaction of 5-furoylquinoline-3-carboxaldehyde with neurotransmitters in artificial cerebrospinal fluid (2000), *Journal of Chromatography B.* 741; 85-88.

[24] Thorré K., Pravda M., Sarre S., Ebinger G., Michotte Y., New antioxidant mixture for long term stability of serotonin, dopamine and their metabolites in automated microbore liquid chromatography with dual electrochemical detection, *Journal of Chromatography B.*, 694 (1997) 297-303.

[25] Biopharmaceutics Coordinating committee in the center for drug evaluation and research (CDER), Food and Drug Administration (FDA), Guidance for industry, *Bioanalytical Method Validation* (2002).

[26] Department of Health and human Services, Food and Drug administration, International Conferenca of Harmonisation; *Guidline on validation of analytical procedures: Definitions and terminology Availability* (1995).

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA