



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DETERMINACIÓN DE GABA Y GLUTAMATO  
POR ELECTROFORESIS CAPILAR EN EL  
HIPOCAMPO DE RATA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ANTONIO ROMANO LÓPEZ**



**MÉXICO, D. F.**

**2008**



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:** Profesora: Elia Brosla Naranjo Rodríguez

**VOCAL:** Profesora: Gloria García Ramírez

**SECRETARIO:** Profesora: Leonila Irma Laura Escobar Pérez

**1er. SUPLENTE:** Profesora: Maria Eva González Trujano

**2º SUPLENTE:** Profesor: José Guadalupe de la Rosa Canales

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Edificio A de investigación, laboratorio 510  
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina UNAM.

## **ASESOR DE TEMA**

---

**Dra. Leonila Irma Laura Escobar Pérez**

## **SUSTENTANTE**

---

**Antonio Romano López**

## **DEDICATORIA**

Dedico esta Tesis al autor y consumidor de la Fe

**“JESUCRISTO”**

**GRACIAS PADRE POR TU FIDELIDAD**

Quiero expresar mi gratitud  
a Ti que me has dado todo  
una oración no bastaría  
ni el tiempo de toda una vida

Quiero vivir agradecido  
en todo lo que soy  
que haya siempre la pasión  
de amarte con mi vida entera  
porque es más que palabras,  
y es más que una canción.

**Marcos Witt**

**A MIS PAPÁS**

**GRACIAS**

Por aceptarme como soy y ayudame a crecer  
y por darme su amor.

Por el esfuerzo que hicieron para que  
llegara hasta este día.

Los quiero y amo mucho.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Escobar por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por su asesoría, consejos y por apoyarme constantemente.

A la Q. Liliana Pérez por su asesoría técnica.

Al Dr. Oscar Prospéro y a la Psicol. Corinne J. Montes por su apoyo y por proporcionarnos el material biológico.

Al jurado Dra. Elia Brosla, QFB. Gloria García por sus observaciones a esta tesis.

A mis papás por su todo su amor, paciencia, sus consejos y apoyo incondicional en todo momento.

A mis hermanos Miryam y Luis por su amor y por soportarme todo el tiempo.

A toda mi familia tíos, tías, primos y primas.

A Miryam y Nahum por sus oraciones y consejos durante mi caminar con el Señor.

A Alejandro Mojarro y a su mamá Alejandra por sus oraciones, consejos, pero sobre todo por su darme a conocer la verdad que transformo mi vida.

A mi abuelita Marina que esta con el Señor y con sus consejos aprendí a llevarme mejor con mis padres.

A mis amigas de la carrera Cintia, Claudia, Nayeli, Jenny por su amistad, consejos y por aguantarme toda la carrera.

A mis demás amigas Elizabeth, Diana, Mónica, Maria Elena, Silvia, Penélope, Miriam, Paty, Lilian, Alma, Damaris.

A la guardia de las 12 en el buque Justo Sierra.

A todos mis compañeros y amigos del SADAPI (2001).

A todos mis profesores de la carrera (Bueno casi a todos). En especial a Ing. Manuel Vazquez Islas, QFB. Raúl Garza, Dra. Socoro Alpizar, Q. León Cedeño., QFB. Gloria García, Dra. Yolanda Quezada, por compartir su conocimiento.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 510: Carolina, Rolando, Liliana, Zinaeli, Bety, Ricardo y Cristian por su amistad y peculiar sentido del humor.

Espero que no me falte nadie.

## ÍNDICE

<b>Abreviaturas empleadas en esta Tesis</b>	Pág iii
<b>Resumen</b>	1
<b>Introducción</b>	2
Neurotransmisores	2
Aminoácidos neurotransmisores	3
Cortes de Tejido	4
Comparación de la metodologías para la determinación de neurotransmisores	4
Electroforesis Capilar (EC)	6
Formación de los derivados fluorescentes	19
Instrumentación EC-LIF	20
<b>Objetivos</b>	23
<b>Desarrollo Experimental</b>	24
Materiales	24
Equipo	24
Condiciones de trabajo en el laboratorio	24
Preparación de disoluciones	24
Obtención y tratamiento de las muestras de hipocampo de rata.	24
Síntesis de derivados fluorescentes	26
Estabilidad de los derivados fluorescentes	27
Eficiencia en la recuperación (% de recuperación)	27
Uso del equipo de electroforesis capilar	27
Columna. Acondicionamiento (lavados).	27
Inyección de los estándares y muestras biológicas.	27
<b>Resultados</b>	28
Estabilidad de derivados fluorescentes	28
Optimización de la separación	28
Optimización del método EC-LIF para análisis cuantitativo de los aminoácidos	32

Linealidad y precisión del método	32
Sensibilidad ( LDD y LDC)	35
Determinación de GABA y glutamato en homogenados de hipocampo.	36
Análisis de GABA	36
Análisis de glutamato	36
<b>Análisis y discusión de resultados</b>	38
<b>Conclusiones y perspectivas</b>	41
<b>Anexos</b>	42
<b>Bibliografía</b>	43

## ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTA TESIS

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
<b>min</b>	minutos	$\lambda$	conductividad molar de la solución (en termodinámica)
<b>l</b>	litro	$\lambda$	longitud de onda (en óptica)
<b>ml</b>	mililitro ( $10^{-3}$ l)	$\lambda_{\max}$	Longitud de onda máxima (en óptica)
<b><math>\mu</math>l</b>	microlitro ( $10^{-6}$ l)	<b>d</b>	diámetro
<b>nl</b>	nanolitro ( $10^{-9}$ l)	$\kappa_b$	conductividad del buffer
<b>M</b>	concentración molar	$\kappa_s$	conductividad de la muestra
<b>mM</b>	concentración milimolar ( $10^{-3}$ M)	<b>LIF</b>	Laser-Induced fluorescence Fluorescencia inducida por láser
<b>kV</b>	kilovoltios ( $10^3$ V)	<b>C</b>	concentración
<b>pH</b>	potencial de hidrógeno	<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate dodecil sulfato de sodio
<b>m</b>	metro	<b>PM</b>	peso molecular
<b>cm</b>	centímetro ( $10^{-2}$ m)	<b>Fig.</b>	figura
<b>mm</b>	milímetro ( $10^{-3}$ m)	<b>g</b>	gramos
<b><math>\mu</math>m</b>	micrómetro, micra ( $10^{-6}$ m)	<b>GABA</b>	$\gamma$ - ácido aminobutírico
<b>°C</b>	grados Celsius	<b>E, glut</b>	glutamato
<b>D</b>	exceso de carga	<b>EC</b>	electroforesis capilar
<b><math>r_D</math></b>	radio de Debye	<b>CMC</b>	concentración micelar crítica
$\epsilon$	constante dieléctrica	<b>UV</b>	ultravioleta
<b>I</b>	fuerza iónica	<b>CBQCA</b>	(3-(4carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde)
<b>F</b>	fuerza eléctrica	<b>DER</b>	desviación estándar relativa (%)
<b>q</b>	carga	<b>BBS</b>	buffer de boratos

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
<b>E</b>	campo eléctrico	<b>t</b>	tiempo
<b>V</b>	voltaje	<b><math>\Delta T</math></b>	variación de temperatura
<b>f</b>	fuerza de fricción	<b><math>\Delta P</math></b>	variación de presión
<b><math>\eta</math></b>	viscosidad	<b><math>\zeta</math></b>	potencial z
<b>r</b>	radio	<b><math>C_T</math></b>	Concentración total del agente micelar
<b><math>\mu_{ef}</math></b>	movilidad electroforetica	<b>NA</b>	Número de agregación
<b><math>\mu_{eo}</math></b>	movilidad electroosmótica	<b><math>\lambda_D</math></b>	Longitud de Debye
<b><math>\mu_{ap}</math></b>	movilidad aparente	<b>CLAR-EL</b>	cromatografía de líquidos acoplado a detector electroquímico
<b>v</b>	velocidad	<b>LDD</b>	Límite de detección
<b>CLAR</b>	cromatografía de líquidos de alta resolución	<b>LDQ</b>	Límite de cuantificación
<b>HPCE</b>	High Performance Capillary Electrophoresis	<b>IP3</b>	Inositol trifosfato
<b>ECZ</b>	Electroforesis Capilar de Zona	<b>AMPc</b>	Adenosin monofosfato cíclico
<b>MEKC</b>	Micellar Electrokinetic Chromatography	<b>OPA</b>	o-phthalaldehyde
<b>ECG</b>	Electroforesis Capilar de gel	<b>FITC</b>	Fluorescein isothiocyanate
<b>e</b>	carga eléctrica	<b>NDA</b>	Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde
<b><math>\kappa</math></b>	Constante de Boltzman	<b>FQ</b>	5-furoylquinoline-3-carboxaldehyde
<b>T</b>	temperatura	<b>DANZYL</b>	Dansyl chloride
<b><math>L_d</math></b>	longitud de la columna desde el punto de inyección hasta el detector		
<b><math>L_t</math></b>	longitud total de la columna		

## RESUMEN

La aplicación de la electroforesis capilar se ha desarrollado en los últimos años con el objetivo de mejorar la comprensión de la compleja química del cerebro. El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitor responsable de la hiperpolarización de las neuronas en el sistema nervioso central de los mamíferos. En contraparte, el glutamato es el principal neurotransmisor excitador.

Principalmente se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de estos aminoácidos, pero con baja sensibilidad en algunas aplicaciones.

La electroforesis capilar ha ganado popularidad como herramienta analítica por su alta eficiencia en la separación, su rapidez, así como el bajo consumo de reactivos y la exclusión de disolventes orgánicos, además de no requerir gradientes de elusión.

Aunque el detector más ampliamente utilizado es el detector de absorbancia ultravioleta (UV), no es aplicable al análisis de los aminoácidos, péptidos biológicamente activos o proteínas y tejidos a concentraciones a una concentración en un intervalo de  $10^{-11}$  -  $10^{-13}$  M. El sistema de detección por fluorescencia inducida por láser es una de las más sensibles hasta el momento por lo cual los componentes de las muestras que tienen poca absorbancia o no la tienen en absoluto, pueden ser detectados convirtiéndolos en derivados fluorescentes.

El objetivo de trabajo fue aplicar la electroforesis capilar de alta resolución para la determinación de GABA y glutamato en un homogenado de hipocampo de rata, con detector de fluorescencia inducida por láser y derivatización con CBQCA.

# **INTRODUCCIÓN**

## **NEUROTRANSMISORES**

Como primera aproximación, podemos definir a un neurotransmisor como una sustancia liberada por una neurona en el espacio sináptico para afectar de forma específica a una o más neuronas (membrana postsináptica), o una fibra muscular. Normalmente, los neurotransmisores difieren de las hormonas en que la célula postsináptica está próxima al lugar de liberación del neurotransmisor, mientras las hormonas se liberan al torrente sanguíneo para actuar sobre objetivos distantes. Otra característica importante de los neurotransmisores es que sus efectos son transitorios y duran desde milisegundos a minutos. Sin embargo, su acción puede provocar cambios a largo plazo en la célula que duran desde horas hasta días.

Para que una sustancia sea considerada como neurotransmisor debe cumplir con los siguientes criterios (Cooper R. 2003).:

- Es sintetizada en la neurona.
- Está presente en la terminal presináptica y se libera en cantidad suficiente como para ejercer una acción definida en la neurona postsináptica u órgano efector.
- Cuando se administra desde el exterior (como un fármaco) en concentraciones razonables, imita exactamente la acción del neurotransmisor de liberación endógena.
- Existe un mecanismo específico para eliminarla de su lugar de acción (el espacio sináptico).

El sistema nervioso emplea para la transmisión de señales dos tipos fundamentales de sustancias químicas: transmisores como moléculas pequeñas y péptidos neuroactivos, que son polímeros cortos de aminoácidos. Ambas clases de transmisores están alojados en vesículas, pequeñas y grandes. La mayoría de las neuronas contiene ambos tipos de vesículas, pero en proporciones diferentes. (Cooper R. 2003).

Hay cuatro principales tipos de neurotransmisores:

- Acetilcolina.
- Aminas ( dopamina, noradrenalina, serotonina, histamina).
- Aminoácidos: excitadores (glutamato, aspartato) e inhibidores (GABA, glicina).
- Péptidos ( opiáceos, neuropéptido Y, sustancia P, somatostatina).

## **AMINOÁCIDOS NEUROTRANSMISORES**

### **Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA)**

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitor predominante del SNC de mamíferos. En los años 50 se observó que el GABA estaba en la retina y el cerebro, y en este último es muy abundante ya que esta presente en el orden de milimoles por gramo (Cooper R. 2003).

El GABA se forma a partir de otro aminoácido también abundante en el cerebro: el l- glutamato. Paradójicamente, este precursor es un neurotransmisor excitador.

La enzima que hace esta conversión es la glutamato-descarboxilasa (GAD), de la que se han encontrado dos isoformas diferentes; ambas producen GABA y están codificadas en diferentes genes; sin embargo, no sabemos aún el porqué. La GAD necesita para su funcionamiento de vitamina B6 (fosfato de piridoxal). (Cooper R. 2003).

Se han descrito dos tipos de receptor del GABA: el GABA<sub>A</sub> y el GABA<sub>B</sub>. La ocupación del receptor GABA<sub>A</sub> por un agonista produce aumento de la permeabilidad membranal al cloro. En cambio, la activación del receptor GABA<sub>B</sub> es metabotrópico, es decir, esta acoplado a proteínas Gi).

### **El glutamato**

Se encuentra principalmente concentrado en el sistema nervioso, y ejerce potentes efectos excitadores sobre la actividad neuronal. El cerebro contiene entre 8-13 milimoles por gramo (Cooper R. 2003). Se ha relacionado al glutamato con un tipo de memoria conocida como potenciación a largo plazo a nivel de la sinapsis. Todos estos factores han contribuido a estimular la investigación sobre los aminoácidos excitadores.

Hasta la fecha, se han descrito al menos cinco subtipos de receptor del glutamato. Tres de ellos se han definido por los efectos excitadores (despolarizantes) de agonistas específicos: N-metil-D-aspartato (NMDA) kainato y quisqualato (o AMPA, el nombre de otro agonista más específico) y por los de sus antagonistas específicos. Un cuarto receptor, el del I-2-amino-4-fosfonobutirato (AP4) que parece representar a un autoreceptor inhibitor. Y un quinto receptor, activado por el ácido transamino-ciclopentano-dicarboxílico (ACPD) y que constituye un receptor metabotrópico (mGluR1 y mGluR5) pues tiene efectos sobre el metabolismo de los derivados fosfatados intracelulares (  $\uparrow$ IP<sub>3</sub>  $\downarrow$ AMP<sub>c</sub>) (Bruno y col. 2001)

## **TÉCNICAS DE MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

## **Cortes del Cerebro**

Varios trabajos han reportado la preparación de muestras de cerebro para la medición de los aminoácidos (Lerma J., Tossman U., Ajit J. Shah, Szyndler J., Balcom G.J.). El primer paso en común es la separación de las proteínas solubles y péptidos de los aminoácidos libres. La desproteínización de las muestras del cerebro se puede hacer por la homogenización del tejido en ácido perclórico 0.1M (A.J.Shah, 1999), con metanol (P.T.Francis, 1993), etanol a baja temperatura (U. Tossman, 1986), o cloroformo (Hua Li, 2002), y la separación de la matriz insoluble por centrifugación. Si se usan soluciones fuertemente ácidas puede ocurrir la hidrólisis de la asparagina y la glutamina en aspartato y glutamato, respectivamente. En algunos casos los analitos son removidos del sobrenadante mediante una extracción sólido-líquido o líquido-líquido (A. D'Aniello, 1998) o son analizados directamente. En cualquiera de los dos casos los analitos se pueden derivatizar (hacer reaccionar con algún marcador) para el análisis y cuantificación de los aminoácidos.

## **COMPARACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS QUE SE APLICAN EN LA DETERMINACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS NEUROTRANSMISORES**

### **Ensayo enzimático**

Esta metodología se basa en la generación de NADPH para la cuantificación de GABA y en la formación de NADH para la cuantificación de glutamato. El NADPH y el NADH son fluorescentes. Presume de ser un método con alta especificidad, simple y rápido, sin embargo para muestras pequeñas o dializados donde los volúmenes son muy pequeños (1-5  $\mu$ l), el volumen de la muestra utilizada (100  $\mu$ l) hacen de esta metodología poco viable. (Graham L.T. 1966, Balcom G.J. 1974).

### **Voltamperometría**

Es una técnica polarográfica para medir in situ y en tiempo real por la oxidación y reducción de las sustancias químicas, sin la necesidad de preparar la muestra como en el caso de un análisis cromatográfico. Se tienen diferentes tipos de voltamperometría pero entre las más usadas para los estudios biológicos están la cronoamperometría, la voltamperometría lineal, la voltamperometría cíclica y la voltamperometría por pulsos. La técnica permite estudiar:

- reversibilidad de reacciones
- determinación del número de electrones transferidos en una reacción redox
- determinación de constantes de equilibrio para reacciones químicas acopladas.

Son poco populares estas metodologías. En estudios in vivo se utiliza principalmente un barrido lineal voltamperométrico, y se obtiene alta sensibilidad con electrodos con base de carbón para

la vitamina C. Algunos autores dicen que los niveles extracelulares de vitamina C reflejan la liberación de los aminoácidos neurotransmisores en el cerebro ( F.Crespi 1990).

### **Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detección por fluorescencia o electroquímica**

La mayoría los aminoácidos son moléculas alifáticas y pequeñas que no poseen fluorescencia absorción en el UV-visible. Así el análisis por CLAR con UV-visible o fluorescencia no puede ser usado para la determinación de estas moléculas. La manera de medir los aminoácidos es por la formación de derivados. Se utilizan agentes derivatizantes como FITC, DANZYL, PITC, OPA, NDA. Los reactivos OPA y NDA forman derivados fluorescentes y además electroactivos, pero los derivados formados tiene una estabilidad limitada que puede corregirse con iones sulfito, sin embargo los iones sulfito pueden interferir en el análisis por HPLC en los ensayos al usar la detección electroquímica (P.D Montigny 1987).

### **Cromatografía de gases acoplado a masas**

Para analizar los aminoácidos por cromatografía de gases (CG) se tienen que convertir a compuestos más volátiles, lo cual implica hacer una esterificación seguida de una perfluoroacilación. Los aminoácidos son usualmente esterificados con isobutanol o isopropanol o el correspondiente alcohol perfluoronidado, dando como resultado un éster que puede ser acilado con trifluoroacético anhidro o pentafluoroacético. LA CG tiene una gran desventaja en los tiempos para tratar la muestra y el proceso de limpieza no son comparables con los del HPLC o EC que son relativamente mas simples y ofrecen una selectividad similar

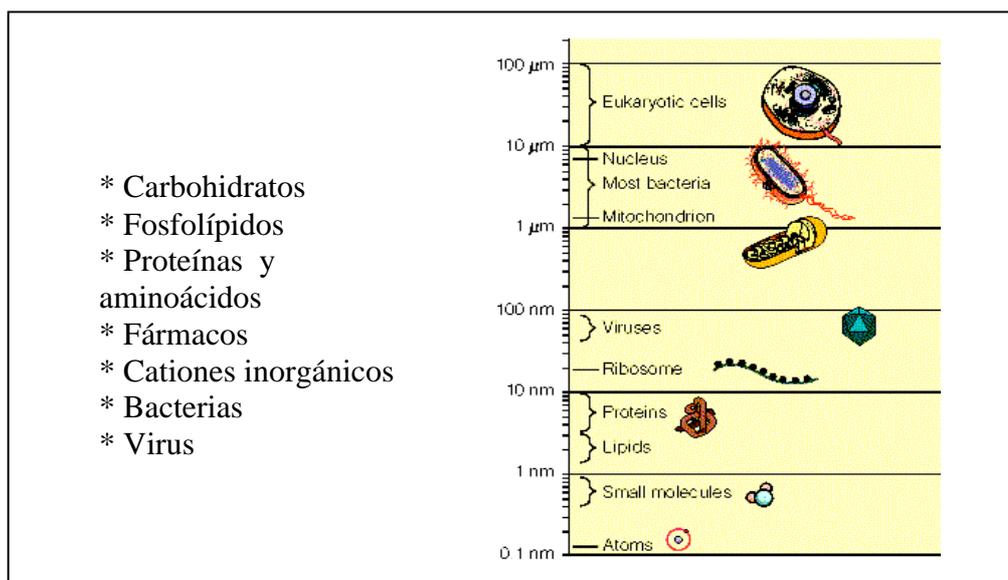
### **Electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser (LIF)**

El análisis de las concentraciones traza de neurotransmisores como son los aminoácidos, aminas y catecolaminas en muestras pequeñas es importante para entender los procesos biológicos. La electroforesis capilar acoplada a LIF ha sido una solución propuesta a este difícil reto (Robert, F. 1995). Los aminoácidos se han sido cuantificado por EC-LIF desde hace varios años; en general esos experimentos involucran un paso de preparación que consiste en una derivatización de aminas usando FITC, CBQCA y FQ en un grado menor. El uso del CBQCA es interesante por que es un reactivo fluoróforo que provee de buena fluorescencia por su especificidad con aminas primarias formando derivados estables y no presenta fluorescencia nativa a diferencia de FITC que además presenta varias impurezas y nanoanalitos marcados que no se han identificado (Natalie Siri, 2006).

## ELECTROFORESIS CAPILAR

### Desarrollo

La electroforesis capilar de alta eficiencia (HPCE), o simplemente electroforesis capilar (EC), es una poderosa técnica analítica para la separación, determinación y cuantificación de moléculas grandes y pequeñas. Su historia es muy reciente, pues fue en 1971 que se empezó a utilizar en la separación de compuestos como una alternativa a la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) que en esa época y por dos décadas más ha sido considerada como la técnica de separación e identificación por excelencia. Desde entonces la electroforesis capilar ha aprovechado la experiencia acumulada en la CLAE y actualmente la supera por mucho en sensibilidad, resolución y velocidad, gracias a que separa los diferentes componentes de una mezcla con base en la distinta movilidad que experimentan las especies cuando son sometidas a un campo eléctrico intenso (300-400 V/cm) en el interior de un tubo capilar. La EC puede ser aplicada a la separación de una gran variedad de especies iónicas, neutras, incluso bacterias y células (Fig. 1).



**Fig. 1** Compuestos que se pueden separar con la electroforesis capilar al usar columnas con diámetros variables y diferentes detectores a los que se puede acoplar el equipo. (Castillo R., Revilla V. 2005)

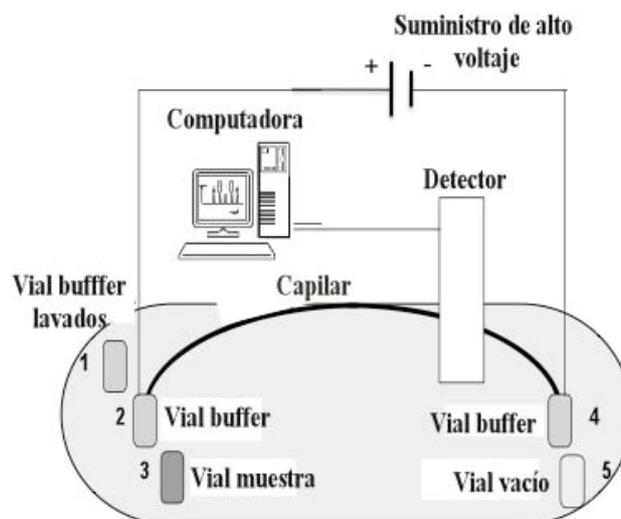
La necesidad de optimizar las separaciones de una gran variedad de compuestos, tiene como resultado la aplicación de diferentes modalidades de trabajo con el mismo equipo. Las modalidades que se trabajan hasta el momento son:

- Electroforesis Capilar de Zona (ECZ, en inglés CZE)

- Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar (CCEM, en inglés MEKC)
- Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico (ECEI, en inglés CIEF)
- Isotacoforesis Capilar (en inglés ITP)
- Electroforesis Capilar en Gel (ECG, en inglés CGE)
- Electro cromatografía Capilar (ECC, en inglés CEC)

Una de las ventajas de la electroforesis es que esta completamente automatizada, disminuyendo así errores debidos tanto al manejo de la muestra como de los electrolitos. La columna donde se realiza la separación tiene una vida útil muy larga y por sus dimensiones (diámetro interno de 10 a 300  $\mu\text{m}$  y longitud de 20 a 100 cm), se disminuye el riesgo de generar gradientes de temperatura que impidan la separación. Gracias a que el volumen de la muestra que se necesita es del orden de nanolitros (nl), la electroforesis capilar se considera una técnica ideal para hacer microanálisis.

Los componentes principales del instrumento son: una fuente de alto voltaje, un capilar, un sistema de detección conectado a un sistema de adquisición y tratamiento de los datos, un sistema de inyección, un sistema de refrigeración del capilar (parte sombreada), un sistema de muestreo automático en donde se colocan los viales que contendrán las muestras y disoluciones de los electrolitos. Todo ello es controlado por una computadora. Para comenzar cualquier separación el capilar se llena con el buffer o electrolito de separación, a continuación se inyecta la muestra en el lado opuesto al detector y al terminar de cargarla se colocan los extremos del capilar junto con los electrodos en dos viales que contienen el electrolito de separación.( Fig.2).



**Fig. 2 Esquema básico de un instrumento de electroforesis capilar (modificado USP 29)**

La electroforesis es el movimiento de partículas cargadas eléctricamente o iones en un medio líquido conductor, usualmente acuoso, bajo la influencia de un campo eléctrico.

La separación electroforética se basa en las diferencias de velocidad de los analitos en presencia de un campo eléctrico. La velocidad de un analito está dada por la ecuación 1:

$$v = \mu_{ef} E \quad (1)$$

E es el campo eléctrico y  $\mu_{ef}$  es la movilidad electroforética para un ión específico y se define como la constante de proporcionalidad entre la velocidad del ión y el campo eléctrico.

Existe una relación entre el voltaje aplicado y la longitud del capilar en volts/cm. La movilidad de un ión es una constante, la que puede determinarse por el coeficiente de fricción a través de un medio elegido.

$$\mu_{ef} = \frac{\text{fuerza eléctrica } (F_E)}{\text{fuerza de fricción } (F_F)} \quad (2)$$

La fuerza eléctrica esta representada en la siguiente ecuación siguiente:

$$F_E = q E \quad (3)$$

Y para un ión esférico la fuerza de fricción está determinada por la ecuación:

$$F_F = -6 \pi \eta r v \quad (4)$$

donde  $q$ : carga iónica del analito,  $\eta$ : viscosidad de la solución,  $r$ : radio iónico,  $v$ : velocidad del ión.

En un campo eléctrico constante las fuerzas son iguales y opuestas:

$$q E = 6 \pi \eta r v \quad (5)$$

si se despeja la velocidad de la ecuación (5) y se sustituye en la ecuación (1) se tiene una ecuación que describe la movilidad en términos de parámetros fisicoquímicos

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6 \pi \eta r} \quad (6)$$

Algunas especies pueden existir en solución bajo varias formas iónicas en equilibrio, la movilidad electroforética se deduce de las movilidades absolutas de sus diferentes formas iónicas según:

$$\mu_{ef} = \sum \alpha \mu_{ef}^0 \quad (7)$$

donde  $\alpha$ : coeficiente de disociación de la especie iónica, que puede calcularse a partir de las constantes de equilibrio y de la composición del medio. Las movilidades absolutas dependen de la fuerza iónica I del medio.

Para un electrolito, según la teoría de Debye-Hückel:

$$\mu_{ef} = \frac{D \zeta_{ef}}{6\pi\eta} \quad (8)$$

donde  $\epsilon$  es la constante dieléctrica del medio y  $\zeta_{ef}$  es el potencial zeta electroforético que se define como:

$$\zeta_{ef} = \frac{4\pi r_D D}{\epsilon} \quad (9)$$

donde  $D$  es el exceso de carga total en la solución por unidad de área,  $r_D$ : radio de Debye definido como:

$$r_D = \frac{\epsilon \kappa T}{8\pi e^2 I} \quad (10)$$

donde  $\kappa$ : constante de Boltzman,  $T$ : temperatura absoluta,  $I$ : fuerza iónica del medio,  $e$ : carga eléctrica del ión. Por otro lado, la movilidad del ión,  $\mu_{ef}$ , se relaciona con su conductividad iónica  $\lambda$ , a través de la ecuación de Nernst-Einstein:

$$\lambda = F \mu_{ef} \quad (11)$$

donde  $F$ : constante de Faraday.

Es decir, la movilidad electroforética de una especie dependerá del pH, de la fuerza iónica (ecuación 8) y de la naturaleza del disolvente (viscosidad, solvatación) (ecuación 6). Además, la movilidad aumenta con la temperatura alrededor del 2 % por grado centígrado. Por otro lado, de la ecuación (6) es evidente que especies o analitos altamente cargados y pequeños tienen alta movilidad, mientras que especies cargadas con gran peso molecular muestran baja movilidad.

Si sólo se considerase la movilidad electroforética, no se explicaría completamente el comportamiento migratorio de las especies dentro del capilar, ya que dicho comportamiento depende también del flujo electroosmótico (FEO). El FEO es el fenómeno de transporte de moléculas de disolvente como resultado de la existencia de una doble capa eléctrica en una interfase sólido-líquido. Al aplicar un campo eléctrico tangencial a esta interfase, las cargas netas de la región difusa en el seno del líquido, comenzarán a moverse arrastrando consigo moléculas del disolvente, dándole, por tanto, un movimiento de velocidad lineal  $v_{eo}$  (denominada velocidad electroosmótica), que será proporcional al campo eléctrico aplicado.

$$v_{eo} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} E = \mu_{eo} E \quad (12)$$

donde:  $\mu_{eo}$ : movilidad electroosmótica,  $D$ : constante dieléctrica,  $\eta$ : viscosidad del disolvente  $\zeta$ : potencial zeta,  $E$ : campo eléctrico aplicado.

El potencial zeta es proporcional a la densidad de carga de la superficie ( $\sigma$ ) y al espesor de la capa eléctrica ( $\delta$ ), por lo tanto al aumentar la concentración del electrolito resulta una

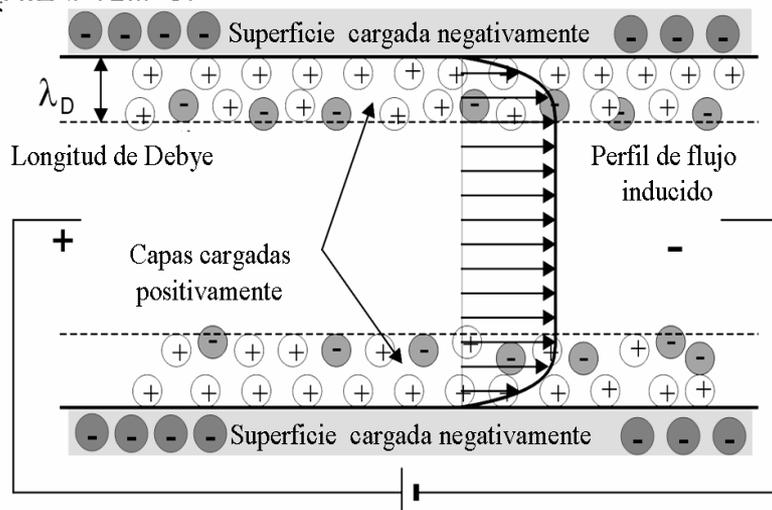
compresión de la doble capa disminuyendo su espesor y, como consecuencia, el potencial y el FEO.

$$\zeta = \frac{\delta\sigma}{\varepsilon} \quad (13)$$

Resulta por tanto, que el flujo electroosmótico es proporcional a la densidad de carga. El sentido de dicho flujo es hacia el electrodo negativo si la superficie del capilar es portadora de cargas negativas ( $\sigma < 0$ ) y por lo tanto la carga neta en el interior del líquido es positiva. Y al contrario cuando la carga de la superficie es positiva ( $\sigma > 0$ ).

### El flujo electroosmótico (Baker D., 1995) (Castillo R., Revilla V. 2005)

La columna más empleada es la de sílice fundida pues además de que no absorbe en el ultravioleta, posee cargas superficiales negativas en disolución acuosa que adquieren a partir de un pH de 4 permitiendo la separación de una gran variedad de compuestos. Cuando la sílice está en contacto con una disolución acuosa, su superficie se hidroliza para dar lugar a grupos silanol. Estos grupos pueden estar cargados positivamente, tener carga negativa, o estar neutros dependiendo del pH de la disolución acuosa. Los contraiones tienden a ser adsorbidos en la pared por atracciones de tipo electrostático para compensar el efecto de carga, formándose así una doble capa rígida de iones a la que se superpone una doble capa difusa de iones. Cuando se aplica una diferencia de potencial a lo largo del capilar, los cationes que forman parte de la doble capa difusa son atraídos hacia el cátodo y como están solvatados, arrastran en su movimiento al resto de la disolución que hay en el capilar, constituyendo el FEO. Aunque el punto exacto de la ionización de la sílice es difícil de determinar, el FEO comienza a tener un valor significativo a valores mayores de  $\sim \text{pH } 4$  ( $\text{p}K_a \approx 2$ ).



**Fig. 3 Perfil del FEO el cual arrastra las partículas cargadas negativamente hacia el cátodo.**

Tomado de <http://www.scot.bristol.ac.uk>.

Si se toma en cuenta el flujo electroosmótico generado por la doble capa del capilar, la velocidad observada (también llamada aparente) de cada ión resulta de la suma de su movilidad electroforética y de su movilidad electroosmótica:

$$v_{ap} = (\mu_{ef} + \mu_{eo}) E \quad (14)$$

Como resultado, los aniones pueden ser forzados a moverse en la misma dirección que los cationes si la magnitud del flujo electroosmótico es mayor que la movilidad electroforética de los aniones. Los compuestos neutros pueden migrar a la misma velocidad que el flujo electroosmótico (fig.3). El paso de la corriente eléctrica a través del medio de separación, origina la disipación de una cierta cantidad de calor (efecto Joule), determinado por las dimensiones del capilar, conductividad del buffer y del voltaje aplicado. Los instrumentos de EC cuentan con un sistema regulador de temperatura que hace pasar un líquido enfriador alrededor de toda la columna para mantener una temperatura constante durante todo el proceso de separación (Castillo R., Revilla V. 2005).

La introducción de la muestra dentro del sistema electroforético puede llevarse a cabo por diferentes métodos, los más comunes son la inyección hidrodinámica y la inyección electrocinética.

El método más utilizado es la inyección hidrodinámica, que a su vez puede ser realizada de tres formas diferentes (Castillo R., Revilla V. 2005):

- Por aplicación de una presión sobre el vial de la muestra.
- Por aplicación de vacío en el extremo de la salida del capilar cuando el extremo de la entrada está sumergido en la muestra.
- Por elevación del vial donde se encuentra la muestra, lo que permite que ésta se introduzca. Este caso es el menos utilizado.

Mediante la inyección hidrodinámica, la composición de la muestra que se introduce en el interior del capilar es igual que la del vial de la muestra, y el volumen inyectado se puede obtener mediante la ecuación de Poiseuille:

$$V = \left( \frac{\Delta P r^4 \pi t}{8 \eta L_t} \right) \quad (15)$$

donde  $\Delta P$ : diferencia de presión (Pa),  $r$ : radio interno del capilar (m),  $t$ : tiempo de inyección (s),  $\eta$ : viscosidad (Pa),  $L_t$ : longitud total del capilar.

La inyección electrocinética se lleva a cabo introduciendo el extremo del capilar en el recipiente de muestra y aplicando una diferencia de potencial en el extremo, que suele ser de 3 a 5 veces menor que la utilizada en la separación, durante cierto periodo de tiempo (unos segundos).

Los analitos migrarán de acuerdo a sus movilidades y al FEO, también de acuerdo con el voltaje y el tiempo aplicados, la concentración de analitos presente y el radio del capilar. Por estas

características, este tipo de inyección es más selectiva que la inyección hidrodinámica y alcanza mayor sensibilidad.

El volumen inyectado en este caso viene dado por la siguiente expresión:

$$V = (V_{\text{ana}} + V_{\text{eo}}) \pi r^2 t \quad (16)$$

La cantidad introducida de una determinada especie, puede ser controlada variando el voltaje, el tiempo, la concentración o el diámetro interno del capilar. Además, depende de la movilidad de un determinado ión y de la movilidad del FEO. Esto quiere decir que este tipo de inyección es selectiva para aquellos iones que poseen mayor velocidad electroforética frente a los de menor velocidad electroforética. Además los iones de movilidad contraria al FEO sólo entrarán en el capilar si el valor absoluto de ésta es inferior al del FEO. Una variación en la conductividad de la muestra, debido a la composición de su matriz, puede suponer una alteración en la cantidad inyectada. Como consecuencia de este fenómeno, la inyección electrocinética no es tan reproducible como la inyección hidrodinámica. (Baker D., 1995).

Si el volumen de la inyección llega a ser muy grande la longitud del capilar que esté ocupado por la muestra puede ser de algunos milímetros, lo cual llega a ser de importancia para las columnas que en ocasiones apenas alcanzan los 20 cm de largo, pues disminuye la longitud de separación de la muestra. Por lo que la resolución disminuye y para aumentar la sensibilidad se utilizan diferentes técnicas de preconcentración antes o durante la introducción de la muestra.

Estas técnicas se pueden reunir en tres grupos (Baker D., 1995):

- **Stacking.**- partiendo de la base de que el analito se encuentra disuelto en una matriz que presenta una conductividad menor que el electrolito soporte del capilar, éste experimentará un aumento en la intensidad del campo eléctrico local. Como consecuencia, migrará a una velocidad más alta hasta que sobrepase la interfase entre la matriz de la muestra y el electrolito soporte. En este momento su velocidad disminuirá porque se encuentra en un campo eléctrico de intensidad más baja. Por tanto, se puede concluir que el efecto final es que el analito se focaliza en una zona estrecha en la interfase señalada. Atendiendo a este fenómeno siempre interesa inyectar la muestra en un medio con una conductividad lo más baja posible. Además, si el tipo de inyección es electrocinética y se presenta la situación descrita, la cantidad de analito que se inyectará será mayor que si la muestra posee igual o mayor fuerza iónica que el medio de separación.
- **Inyección de grandes volúmenes de muestra.**- aprovechando el fenómeno de la diferencia de campo eléctrico entre la muestra y el medio de separación junto con el

FEO, se pueden inyectar grandes volúmenes de muestra en el interior del capilar para realizar separaciones en la modalidad de ECZ.

- Técnicas de inyección de amplificación de campo para analitos neutros.- las dos técnicas anteriores están diseñadas para focalizar analitos que presentan carga. Si la muestra está compuesta por analitos neutros existe la posibilidad de amplificación de campo en la modalidad de MEKC cuando se utilizan micelas de tipo aniónico. En este caso la muestra de inyección debe tener una conductividad mucho mayor que el buffer de separación, es decir, lo contrario a los casos descritos para analitos iónicos. (Baker D., 1995).

La versatilidad de la EC, al igual que en cromatografía líquida, se debe parcialmente a sus numerosos modos de separación. Los principales son los que se muestran en la tabla 1 así como el fundamento de la separación. La mayor parte de ellos pueden obtenerse cambiando simplemente la composición de la solución que llena el capilar.

<b>Tabla 1. Modos de separación de EC, fundamento de separación y usos.</b>		
<b>MODO</b>	<b>FUNDAMENTO DE LA SEPARACIÓN</b>	<b>APLICACIONES BIOANÁLITICAS *</b>
Electroforesis capilar en zona (ECZ)	Movilidad en solución libre	Poliaminas, catecolaminas, aminoácidos
Electroforesis capilar electrocinética micelar (MEKC)	Interacciones iónicas o hidrofóbicas con micelas	Aminoácidos, péptidos, proteínas, ensayos enzimáticos
Electroforesis capilar en gel (ECG)	Tamaño y carga	Purificación de proteínas
Isoelectroenfoque capilar (CIEF)	Puntos isoelectrónicos	Proteómica, lisados celulares
Isotacoforesis capilar (CITP)	Migración entre electrolitos limitantes, conductor y terminal	Proteínas
Electrocromatografía capilar (CEC)	Afinidad analito-fase estacionaria	Péptidos y proteínas

\* Dovich J, 2006.

Por lo tanto la EC ofrece una conveniente alternativa a la CLAR.

Hasta el momento, todas las propiedades descritas de la electroforesis capilar corresponden a la electroforesis capilar de zona a menos que se haya indicado otra cosa. La ECZ es uno de los modos más utilizados debido a la simplicidad de operación y a su gran versatilidad. En esta técnica la separación de los solutos ocurre debido a que éstos emigran en zonas discretas a diferentes velocidades, en un capilar lleno de un electrolito adecuado. Gracias al flujo electroosmótico es posible llevar a cabo la separación de cationes y aniones. Las moléculas neutras no se separan y eluyen junto al disolvente. (Baker D., 1995).

La selectividad en ECZ puede alterarse fácilmente al cambiar el pH del medio de separación, se controla por medio de buffers. Existen numerosas publicaciones donde se hace referencia a la influencia de la concentración del buffer sobre la movilidad electroforética y el FEO. Así, un buen buffer de separación deberá reunir los requisitos siguientes:

- Buena capacidad amortiguadora en el intervalo de pH elegido.
- El pH debe mostrar pequeñas variaciones con la temperatura.
- No presentar interferencias con el sistema de detección utilizado.
- La movilidad del buffer debe ser similar a las movilidades de los analitos para evitar la electrodispersión.
- La movilidad de los contraiones del buffer debe ser lo menor posible para minimizar el calor generado por el efecto Joule.

El pH del buffer de separación es un parámetro importante debido a la alta estabilidad de los capilares de sílice fundida y puede estar comprendido entre 2 y 12. Se puede utilizar una extensa variedad de buffers, entre los que destacan TRIS, borato, histidina y CAPS (ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico). Estos buffers se caracterizan por poseer iones voluminosos que hacen que puedan ser usados a concentraciones elevadas sin generar corrientes demasiado altas, la desventaja es que presentan fuerte absorción en la zona del UV. Otra forma de alterar la selectividad es mediante la adición de sustancias al buffer de la separación. Las sustancias más utilizadas están: detergentes, selectores quirales, disolventes orgánicos, iones metálicos y urea. Las moléculas de detergente, a concentraciones por debajo de la concentración crítica micelar, pueden actuar como agentes solubilizadores de solutos hidrofóbicos, o como modificadores de la pared del capilar para conseguir alteraciones del FEO. Cuando el detergente se utiliza por encima de la concentración crítica micelar, nos encontramos en otra modalidad de separación electroforética. El disolvente orgánico altera la polaridad y la viscosidad del electrolito, modificando la movilidad electroosmótica de los iones y la movilidad del FEO. Mejora la solubilización de las moléculas y reduce la interacción de éstas con la pared del capilar. Los selectores quirales se utilizan para llevar a cabo el análisis de compuestos quirales,

el cual tiene importancia en las industrias alimentarias y farmacéuticas. Como aditivos se utilizan ciclodextrinas, éteres corona y sales biliares.

### **Electroforesis capilar electrocinética micelar (MEKC).**

Este modo de electroforesis es el que se utilizó para llevar a cabo la separación y determinación de GABA y glutamato en esta tesis. La electroforesis capilar electrocinética micelar (MEKC), fue introducida en el año 1984 por Terabe y col. y supuso un gran avance en la electroforesis capilar. Es una técnica muy utilizada ya que en una sola operación es posible llevar a cabo la separación de moléculas neutras y cargadas. Este método combina el mecanismo de separación de la cromatografía con el movimiento electroforético y electroosmótico de los analitos y de la disolución. Se utiliza la misma instrumentación que para el desarrollo de ECZ, pero en MEKC se utilizan detergentes, también llamados agentes micelares o tensoactivos, en concentraciones superiores a la concentración crítica micelar (CCM) forman micelas. Los monómeros poseen una estructura de tipo R-X, donde R es una cadena hidrocarbonada, normalmente lineal, de 8 a 18 átomos de carbono que forma la cola hidrofóbica, y X es un grupo polar o iónico denominado cabeza. Las moléculas se unen libremente en una forma aproximadamente esférica con las cabezas hacia el exterior y las cadenas orgánicas juntas hacia el interior.

En la tabla 2 se muestra la clasificación de los principales detergentes, también se aportan datos de la CCM y del número de agregación (NA), que es el número de moléculas que conforman la micela en cada caso. La concentración de monómeros del agente micelar en equilibrio con las micelas es, aproximadamente, constante e igual a la CCM. Así, un aumento de la concentración de detergente por encima de CCM conduce a un aumento en el número de micelas en disolución sin modificar sustancialmente la concentración de monómeros libres. La concentración de micelas en disolución acuosa puede calcularse a partir de la concentración total del agente micelar ( $C_T$ ), la CCM y el NA:

$$\text{Micelas} = (C_T - \text{CCM})/\text{NA} \quad (17)$$

<b>Tabla 2 Clases de detergentes y propiedades (Castillo R., Revilla V. 2005)</b>			
<b>Detergente</b>	<b>Tipo</b>	<b>CCM</b>	<b>Agregación</b>
SDS	Aniónico	$8,3 \times 10^{-3}$	62
CTAB	Catiónico	$9,2 \times 10^{-4}$	170
BRIJ-35	No iónico	$1,0 \times 10^{-4}$	40
Sulfobetaína	zwitteriónico	$3,3 \times 10^{-3}$	55

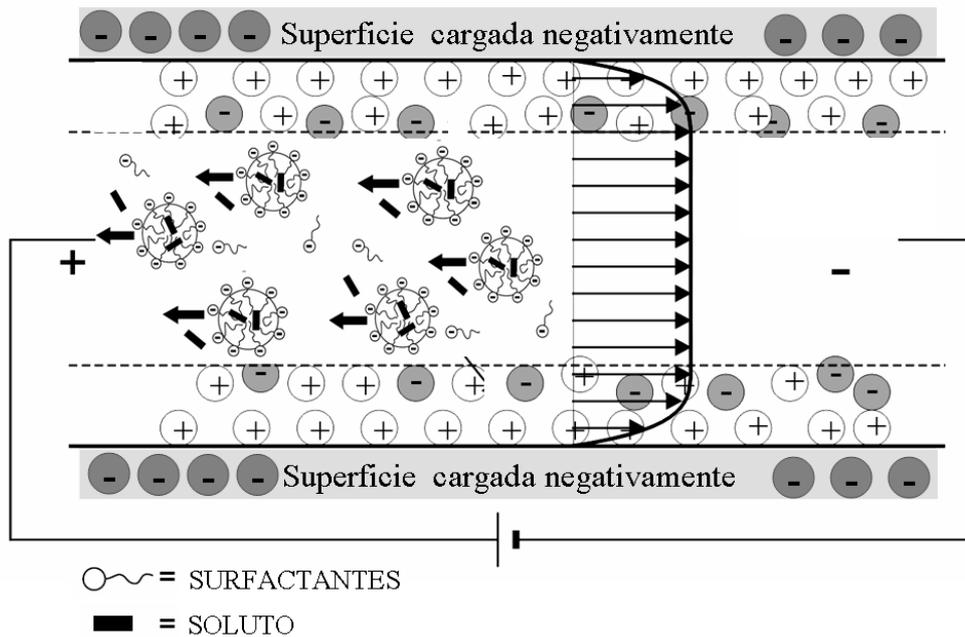
La propiedad más importante de las micelas es su poder para disolver hidrocarburos, reactivos neutros, etc., es decir, sobre especies poco solubles o insolubles en fase acuosa. El proceso de disolución micelar es un proceso dinámico donde el soluto está en equilibrio entre la micela y la fase acuosa. Otra propiedad importante de los medios micelares es su capacidad para concentrar o separar reactivos. La disolución selectiva de los reactivos en la micela los acerca respecto a su situación en la disolución acuosa y se ven favorecidas reacciones que en fase acuosa son lentas.

La tercera propiedad de las micelas es su capacidad para alterar el microentorno del soluto que se ha disuelto. Se producen cambios sustanciales de la fase acuosa al interior de la micela tales como la acidez, la viscosidad, la constante dieléctrica o la polaridad. La consecuencia inmediata son los cambios en los equilibrios, en las propiedades espectrales y en la reactividad del soluto disuelto. La elección del tensoactivo, por lo tanto, es importante y debe reunir las características siguientes(Castillo R., Revilla V. 2005):

- Debe presentar suficiente solubilidad en el buffer para que pueda estar en forma de micelas.
- La solución micelar debe ser homogénea y no absorber en el UV.

El detergente y por tanto las micelas están normalmente con carga, por lo que al aplicar el campo eléctrico migran hacia un electrodo u otro, dependiendo de la carga. Los detergentes aniónicos, como el SDS migrarían hacia el ánodo, es decir en dirección opuesta al FEO. En las condiciones de trabajo (pH neutros o básicos) el FEO es más rápido que la movilidad de las micelas y por tanto el movimiento neto es en la dirección del FEO. Al inyectar una muestra en el interior del capilar que contiene la fase micelar, los solutos neutros se separarán debido a sus diferencias en la constante de reparto entre la fase acuosa y el interior micelar (hidrofóbico). Las moléculas muy hidrofóbicas se incorporan en las micelas Los solutos cargados pueden asimismo interactuar con las micelas por fuerzas electrostáticas o formar pares iónicos con las moléculas

libres de detergente. Cuando el soluto no interacciona con la micela migrará a la velocidad del FEO.



**Fig. 4 Esquema del principio de separación por MEKC.**  
 Tomado de <http://www.scot.bristol.ac.uk>. (Esquema modificado)

La forma usual de trabajar en esta técnica es utilizar detergentes aniónicos, si el flujo electrostático se dirige al cátodo y, viceversa. Por lo que las velocidades de migración de los solutos neutros estarán comprendidas entre la velocidad del FEO y la velocidad de las micelas, por tanto los tiempos de migración de los solutos neutros están comprendidos entre el tiempo de migración de un soluto que viaja a la velocidad del FEO,  $t_0$ , y el tiempo de migración micelar,  $t_{mc}$ , esto se conoce como ventana de tiempos. Para determinar el tiempo micelar se utiliza una sustancia altamente hidrófoba como el Sudan III o el Sudan IV y, para determinar el tiempo del FEO se suele utilizar una sustancia hidrofílica que no se introduce en la micela como es el metanol. El tiempo de migración de un compuesto neutro,  $t_R$ , viene determinado por su factor de capacidad,  $k'$ , que se define como el número de moles de soluto dentro de la micela y el número de moles en la fase acuosa, relacionado asimismo con el tiempo de migración y con el coeficiente de partición del soluto (Castillo R., Revilla V. 2005):

$$k' = \frac{n_{mc}}{n_{ac}} = \frac{(t_R - t_0)}{t_0 \left( 1 - \frac{t_R}{t_{mc}} \right)} = K \left( \frac{V_{mc}}{V_{ac}} \right) \quad (18)$$

donde  $t_R$ : tiempo de retención del soluto.  $t_0$ : tiempo de migración de un soluto no retenido y que se mueve a la velocidad del FEO,  $t_{mc}$ : tiempo de retención de la micela.  $K$ : coeficiente de partición.

$V_{mc}$ : volumen de la fase micelar.  $V_{ac}$ : volumen de la fase acuosa.

De la ecuación anterior se deduce que:

$$t_R = \frac{1 + k'}{1 + \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right)k'} t_0 \quad (19)$$

Es decir:

- Cuando el  $t_R = t_0$ ,  $k' = 0$  y el analito no interacciona con la micela.
- Cuando  $t_R = t_{mc}$ ,  $k' = 4$  y el analito se incorpora totalmente al interior de la micela.

De forma general, el factor de capacidad de un soluto aumentará linealmente con la concentración del detergente, y está limitado por la corriente generada que incluso trabajando con capilares muy estrechos (25 a 50  $\mu\text{m}$ ), se requiere una refrigeración eficaz del mismo. Los valores óptimos para este parámetro están entre 0.5 y 10.

Además de la concentración de buffer, existen otros efectos que ejercen una influencia importante sobre la separación por MEKC: naturaleza del tensoactivo, temperatura del buffer, utilización de aditivos como los modificadores orgánicos.

Efecto de la temperatura

La temperatura tiene un efecto importante en la separación en MEKC debido a varios factores:

- Las micelas sólo se forman cuando se sobrepasa una temperatura crítica micelar denominada punto de Kraft, independiente de la concentración del tensoactivo.
- Influye en el coeficiente de partición del soluto de forma que un aumento de la temperatura provoca una disminución del coeficiente de partición.
- Influye sobre el factor de capacidad,  $k'$ , y en la eficiencia, observándose una disminución en estos factores con el aumento de la temperatura.
- Disminuye el tiempo de análisis y, normalmente, disminuye la resolución.

## FORMACIÓN DE LOS DERIVADOS FLUORESCENTES

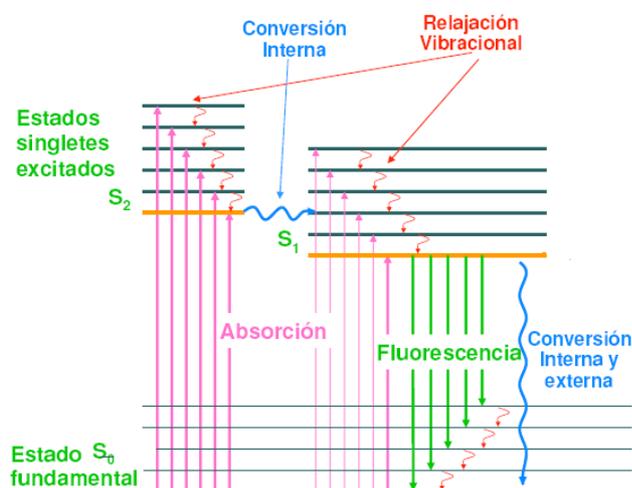
La mayoría de los aminoácidos son moléculas alifáticas y pequeñas que no poseen fluorescencia o características para una absorción en el UV-Visible. En consecuencia el análisis por UV-Vis o fluorescencia no puede ser usado a excepción de los aminoácidos aromáticos. Por ello, una alternativa es la formación de derivados fluorescentes (derivatización) para poder inducir fluorescencia a través de un láser lo que se conoce como Fluorescencia inducida por láser (LIF). La derivatización se puede clasificar por el tipo de reacción entre el analito y el reactivo de derivatización. Las reacciones que forman enlaces covalentes y todos los tipos de reacciones por ejemplo par iónico, fotólisis, redox y las reacciones electroquímicas ( H.A.Bardelmeijer, 1998). Otra forma de clasificar las reacciones de derivatización se basa en el lugar donde se lleve a cabo: antes (pre-columna), durante (sobre columna) o después (post-columna) de la separación electroforética. La más conveniente dependerá de porque se introdujo la derivatización, el número de muestras que se tengan por analizar, las propiedades fisicoquímicas del analito y el derivatizante etc. La forma en pre-columna es la más utilizada en EC. Cuando se trabaja con este modo se tienen las ventajas siguientes( H.A.Bardelmeijer, 1998).:

- se tiene cierta libertad para elegir las condiciones de reacción, la posibilidad de seleccionar los disolventes cuando estos sean incompatibles con el sistema de EC.
- se puede pasar por alto la cinética de reacción, a menos que un solo derivado sea formado con el analito. Las principales desventajas en los procesos en pre-columna son:
- la formación de otros productos y derivados con otros compuestos de la muestra, esto es perjudicial cuando se realizan estudios sobre nivel de trazas.
- como se tiene al aire libre, a menudo se presentan contaminación de la muestra debido al aire de laboratorio o constituyentes de los disolventes.
- se pueden presentar pérdidas del analito durante la evaporación de los disolventes o por la adsorción a las paredes de los viales utilizados, así como pérdidas de la sensibilidad por inyectar muestras diluídas. La técnica en pre-columna es comúnmente utilizada en forma manual pero también se puede realizar de manera automatizada. A diferencia de las derivatizaciones en la CLAE la separación de los derivados ocurre sin mayor problema, porque la base de la separación en la EC se basa principalmente en la relación carga-masa de la molécula y no de su polaridad.

## INSTRUMENTACIÓN EC-LIF (Baker D., 1995)

La fluorescencia es la emisión de luz acompañada por la transición electrónica de un estado excitado hasta un estado fundamental. Cuando se forma un enlace entre dos átomos en una molécula, los orbitales atómicos de cada uno de los átomos que forman el enlace generan dos orbitales: uno enlazante de baja energía y otro antienlazante de energía mucho mayor.

Cuando la molécula no está excitada, los electrones que forman un enlace específico se encuentran ocupando los orbitales enlazantes, debido a que estos son de energía menor y por lo tanto de esta manera la molécula es más estable. Asociados a cada nivel electrónico se encuentran diferentes niveles vibracionales, por lo que cuando una molécula es irradiada con energía de cierta frecuencia o longitud de onda esta puede pasar a diferentes niveles vibracionales de alguno de los estados excitados  $S_0$  y  $S_1$  (Fig. 5).



**Fig. 5 Diagrama en que se muestran las transiciones electrónicas que participan en la excitación, absorción y fluorescencia. (Las distancias verticales representan energía). (Stock S., 2006)**

Una vez que la especie ha sido excitada a niveles energéticos superiores, la desactivación o pérdida de la energía en exceso se puede efectuar a través de diferentes procesos. El camino más probable hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida del estado excitado. Por tanto, si la desactivación por fluorescencia es rápida con respecto a los procesos sin radiación, se observa tal emisión.

En la mayor parte de las especies químicas, la desactivación por relajaciones no radiativas (choques moleculares de la especie excitada con el solvente) es la ruta cinéticamente favorecida, ya que el número de especies fluorescentes es muy pequeño en comparación con las especies no fluorescentes. El fenómeno de fluorescencia está restringido a un número relativamente pequeño de sistemas que poseen características estructurales y ambientales que hacen que la velocidad de los procesos de relajación o desactivación sin radiación se reduzca hasta el punto que la reacción

de emisión puede competir cinéticamente. Los procesos que pueden ocurrir en una molécula que tiene niveles de energía similares a los mostrados en la Figura 6 son los siguientes:

Conversión externa.- Este es el proceso que ocurre más frecuentemente en las especies atómicas y moleculares. Durante este proceso y el exceso de energía que tiene la especie excitada se pierde por choques moleculares entre la especie excitada y el solvente, el resultado neto es una transferencia de energía de la especie excitada a las moléculas vecinas y un incremento mínimo en la temperatura del solvente.

Conversión interna.- En este proceso una molécula excitada pasa del estado electrónico más alto al estado electrónico más bajo ocasionando una serie de relajaciones vibracionales sin emisión de radiación se favorece cuando dos niveles electrónicos son de energía similar y puede ocurrir un traslapamiento. (Stock S., 2006)

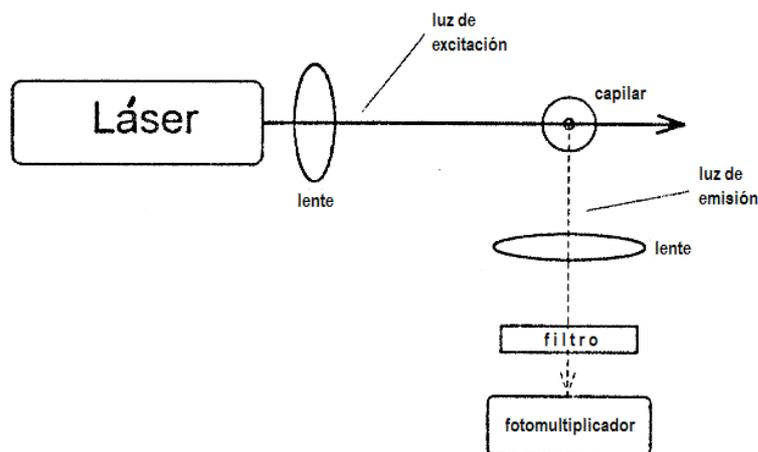
El espectro de absorción electrónico (de una molécula capaz de sufrir fluorescencia) también se conoce como su espectro de excitación. De la misma manera que se determina un espectro de absorción, es posible un espectro de fluorescencia (fig 6).

**Fig. 6 Relación entre el espectro de excitación (línea rosa) y el espectro de emisión fluorescencia (línea verde). Se muestra cada estado electrónico con tres niveles de energía de vibración. (Stock S., 2006)**

Para que una molécula presente fluorescencia es necesario que dicha molécula excitada vuelva al estado fundamental mediante una transición radiactiva desde el singulete excitado. Una condición necesaria para que se de fluorescencia es si duda que la molécula tenga fuerte absorción. La fluorescencia es influenciada por la presencia de ciertos grupos funcionales, por la naturaleza y por el grado de interacción con los disolventes utilizados (García-Campaña, 2007). Se pueden proponer algunas reglas sobre los sustituyentes que influyen en la fluorescencia aunque puede haber excepciones.

Los hidrocarburos aromáticos y los análogos de heteroátomos que son donadores de electrones como los grupos funcionales  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHR}$ ,  $-\text{NR}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_3$  pueden favorecer la fluorescencia: la presencia de estos grupos funcionales normalmente causa un cambio (movimiento) en el máximo de excitación a longitudes de onda más grandes. Por otra parte los grupos  $-\text{CHO}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{F}$ ,  $-\text{Cl}$ , tienen un efecto negativo en la fluorescencia. Con respecto a la influencia de los disolventes, los dipolares y con interacciones de puentes de hidrógeno son particularmente importantes. Otra posibilidad de aumentar la sensibilidad de la fluorescencia es de transferir los solutos fluorescentes a un ambiente micelar aplicando MEKC. Los cambios en la temperatura afectan el número de colisiones de las moléculas del fluoróforo con las moléculas del disolvente. Para la mayoría de los compuestos se observa que la fluorescencia decrece entre 1-2% al aumentar  $10^\circ\text{C}$  la temperatura.

Para la detección por fluorescencia los detectores convencionales son de deuterio, mercurio, tungsteno o xenon. La sensibilidad alcanzada para estos detectores esta en el intervalo de  $10^{-8}\text{M}$  -  $10^{-9}\text{M}$  para un compuesto que fluorese fuertemente. Para incrementar la sensibilidad se induce la fluorescencia con láser de argón con alta densidad de poder de luz emitida. La metodología LIF (fluorescencia inducida por láser) está generalmente basada en el empleo de fluoróforos que absorben en el intervalo de longitudes de onda de 350-650 nm. LIF ofrece la más alta sensibilidad para la determinación de los aminoácidos en comparación con el UV-Vis o la amperometría. Al aplicar EC-LIF se incrementa dramáticamente la eficiencia y la sensibilidad. (Zhang Le 1998).



**Fig. 7 Diagrama del LIF. La luz desde el láser es focalizada por un lente antes del capilar. La luz emitida es captada a un segundo lente y después filtrada y detectada por el fotomultiplicador. (Baker D., 1995)**

## **OBJETIVO PRINCIPAL**

Cuantificación de los aminoácidos GABA y glutamato en el hipocampo de ratas normales mediante la técnica de electroforesis capilar.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar la estabilidad de los derivados fluorescentes CBQCA-GABA y CBQCA-E.
- Evaluar la recuperación absoluta del método analítico.
- Caracterizar analíticamente el método en la determinación de los neurotransmisores en el hipocampo de la rata.
- Determinar la concentración de GABA y glutamato en homogenados de hipocampo.

## **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **MATERIALES**

El GABA y el ácido glutámico se adquirieron de los laboratorios de SIGMA. El electrolito de trabajo se preparó con ácido bórico de SIGMA CHEMICAL CO. USA. El hidróxido de sodio de MERCK-MÉXICO y el ácido clorhídrico de J.T. BAKER-MÉXICO. Para precipitar proteínas se utilizó cloroformo grado Biología Molecular de SIGMA-ALDRICH Inc. USA. El agua desionizada se obtuvo de un sistema purificador de agua Nano-Pure Infinity, y se empleó en la preparación de todas las disoluciones.

### **EQUIPO**

Se utilizó un equipo de Electroforesis Capilar de Alta Resolución de la Compañía Beckman Coulter de la serie P/ACE 5010 equipado con detector LIF: láser de Argón con 488 nm (longitud de onda de excitación) y 520 nm (longitud de onda de emisión).

### **CONDICIONES DE TRABAJO DEL LABORATORIO**

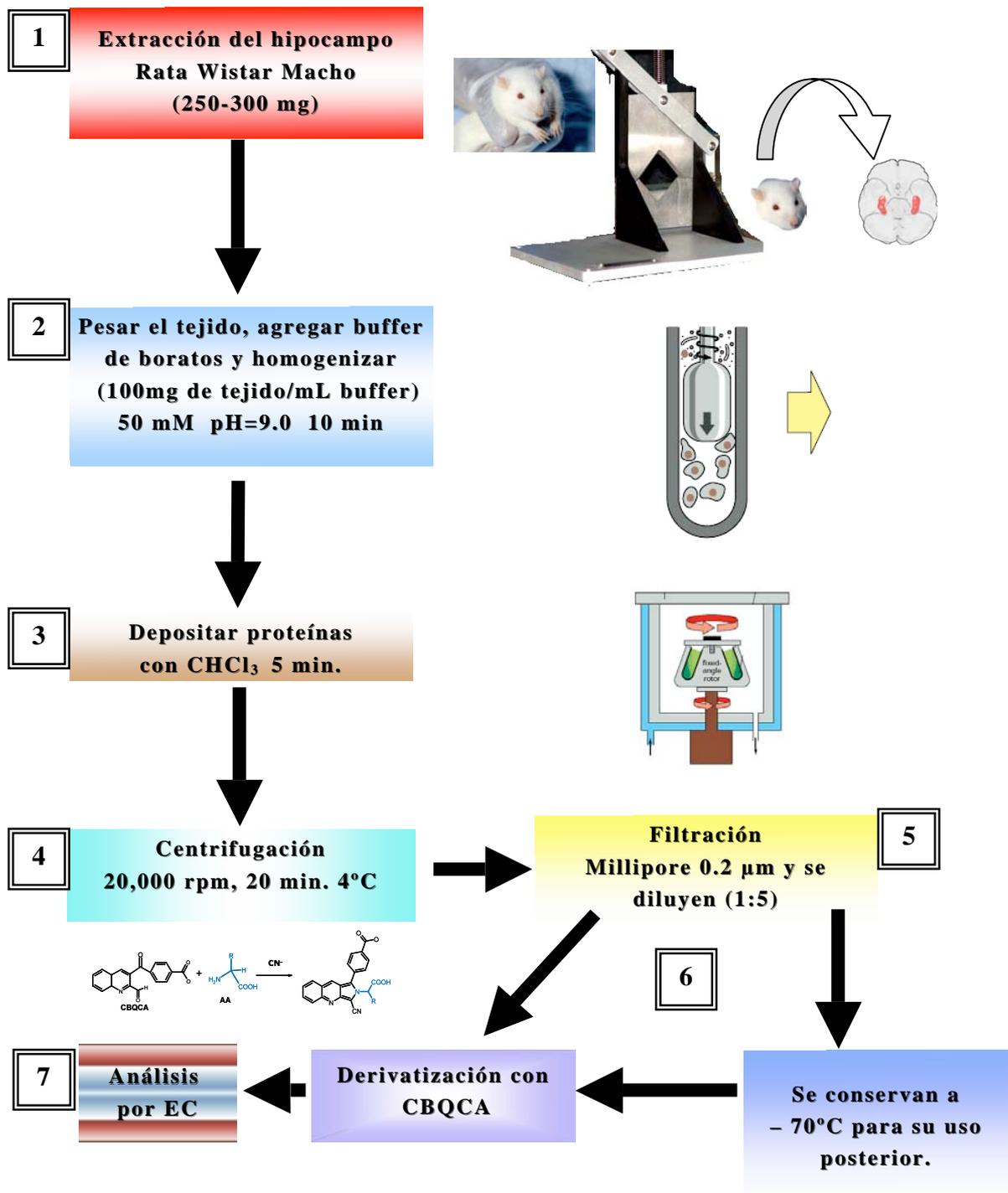
Las condiciones utilizadas en este trabajo para la determinación de GABA y glutamato se basaron en las reportadas en la bibliografía con algunas modificaciones (Bergquist J., 1996). Después de evaluar la concentración, voltaje, y las condiciones de lavado de la columna, se decidió trabajar con una solución de ácido bórico 200 mM y 70 mM de SDS a pH 9.3. La temperatura fue de 25 °C y el voltaje de 22 kV los primeros 7.5 min. y 15 kV el resto de la separación; una columna de sílice fundida de 57 cm de longitud total, 50 cm al detector y un diámetro interno de 75 µm. Se inyectaron 23 nl de muestra en 6s.

### **PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES ESTANDAR**

Se preparó una solución stock de 5mM de GABA y de glutamato, después se hicieron diluciones con las concentraciones finales de 0.2, 2, 5, 10, 15, y 20 X 10<sup>-6</sup> M. Con estas diluciones se determinaron la linealidad del método y los límites de cuantificación y detección del método.

### **OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE HIPOCAMPO**

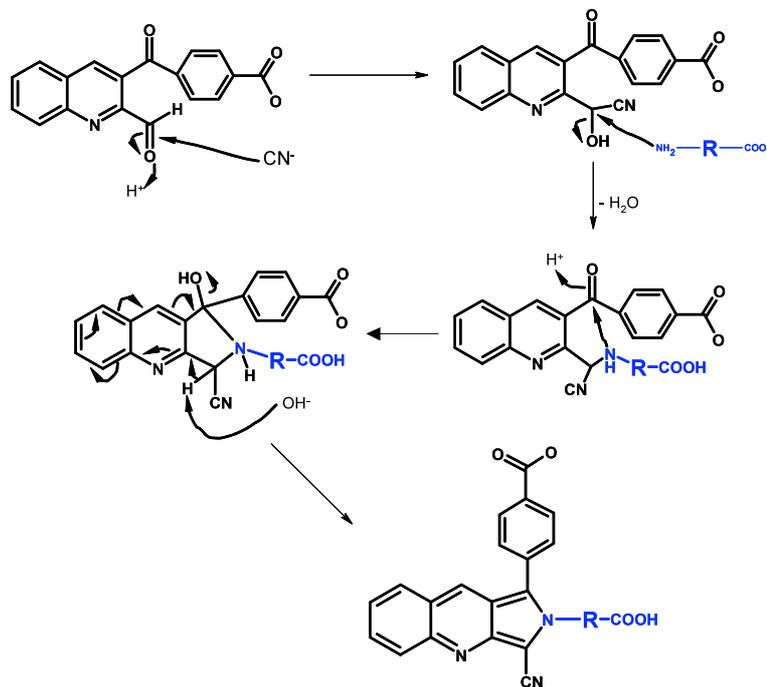
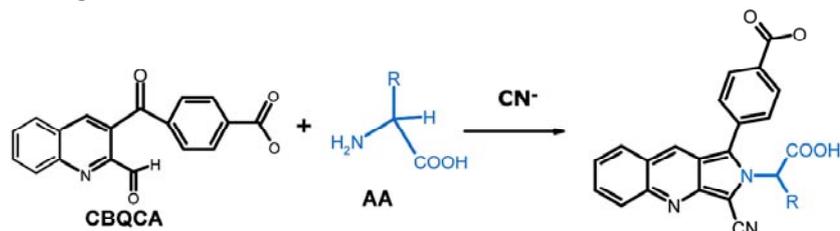
Las muestras de hipocampo fueron obtenidas en el laboratorio del Dr. Oscar Próspero García por la Psicóloga. Corinne J. Montes Rodríguez del Grupo de Neurociencias del Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina. Los homogenados de hipocampo se prepararon (ver imagen 8): decapitando a la rata sin anestesia (1), después se extrajo el hipocampo, se pesó y se le agregó el buffer (100mg/ml de buffer) (2), se precipitaron las proteínas con cloroformo (3) y se centrifugó (4) se filtró el sobrenadante (5), se diluyó (1:5) y se guardó el material para su derivatización (6). Las muestras se inyectaron al equipo (7). Ver diagrama.

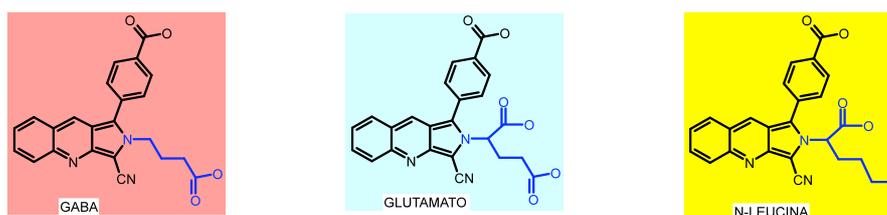


**Fig. 8 Diagrama de flujo para la obtención y tratamiento de las muestras de hipocampo.**

**SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS FLUORESCENTES.**

Los homogenados de hipocampos diluidos 1:5 fueron derivatizados como lo describe Novotny et al., 1991. Brevemente se mezclaron 1µl de aminoácido de una solución stock con 9µl de CBQCA (10mM), 4µl de estándar interno (0,5mM) y 6 µL de KCN (10mM) se añaden 27 µl de buffer de boratos pH=9.0. La mezcla se mantiene a temperatura ambiente (20 °C) por 2.5 horas. La muestra se inyecta por presión hidrodinámica durante 6s (23 nl). Cuando se trata la muestra biológica se agregan 1µL de homogenado en lugar de solución estándar. El iniciador de la reacción es el KCN por lo que se agrega al último.





**Fig.9 Mecanismo de reacción del CBQCA con aminas primarias para la obtención de los derivados fluorescentes formados de CBQCA-GABA (rojo), CBQCA-glutamato (azul) y CBQCA- Nor-leucina (estándar interno) (amarillo).**

### **ESTABILIDAD DE LOS DERIVADOS FLUORESCENTES**

Para evaluar la estabilidad de los derivados fluorescentes se realiza la reacción de derivatización la cual se realizó como se describió anteriormente. La mezcla de reacción se inyectó al equipo cada 2 horas y se evaluó el área bajo la curva.

Las concentraciones en la reacción son: 0.2 mM de aminoácido, 0.11 mM de estándar interno, 30 mM de buffer de boratos, 2 mM, 6.6 mM de KCN. Nótese que el derivatizante se encuentra en exceso sobre los aminoácidos y el estándar interno.

### **EFICIENCIA EN LA RECUPERACIÓN (% recuperación de GABA y glutamato)**

Para ver el efecto del tratamiento en la cuantificación de los neurotransmisores se determinó el % de recuperación. El homogenado se dividió en 2 partes una mitad del homogenado se trata sin cambios, otra mitad se le añade una concentración conocida de los aminoácidos y después se sigue con el tratamiento de la muestra normalmente.

Sébase que:

$$[\text{aa añadido}]_{\text{teórica}} = 2 \text{ mM}$$

En el tubo a cual se le añade una concentración conocida de los aminoácidos se deduce lo siguiente:

$$[\text{aa total}] = [\text{aa nativo}] + [\text{aa añadido}]_{\text{experimental}}$$

por lo tanto despejando

$$[\text{aa añadido}]_{\text{experimental}} = [\text{aa total}] - [\text{aa nativo}]$$

La concentración del aminoácido nativo en la muestra se determinó del homogenado tratado sin añadirle nada. El porcentaje de recuperación se expresa como:

$$\% \text{ recuperación} = [\text{aa añadido}]_{\text{experimental}} / [\text{aa añadido}]_{\text{teórica}} * 100$$

## USO DEL EQUIPO DE EC

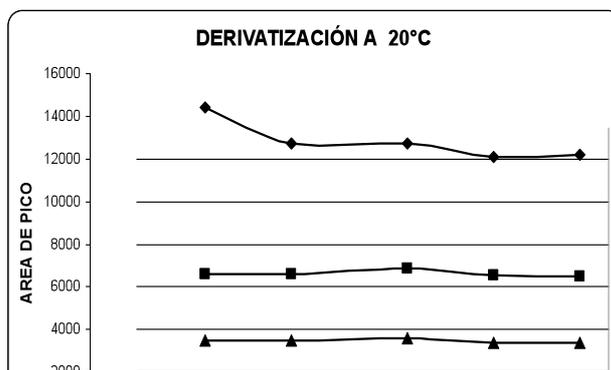
Estabilización de la columna. Se le realizan lavados a la columna con ácido clorhídrico 0.1 M por 5 min, agua desionizada por 3 min, hidróxido de sodio 0.1 M por 5 min, agua desionizada por 3 min., y el electrolito de trabajo por 10 min. Para los lavados del capilar entre corridas se empleó durante 4 min agua desionizada y el electrolito de trabajo por 3 min.

Se inyectan aproximadamente 23 nL de muestra y ésta pasa del vial en el que está contenida hacia el capilar y al final de éste se encuentra un vial con el electrolito de trabajo. Durante la separación, a la entrada del capilar y a la salida se encuentran viales con el electrolito de trabajo. Se utilizan diferentes viales para los lavados y para la separación. Al finalizar los ensayos se lava con agua desionizada 3 min., hidróxido de sodio 0.1 M por 5 min., agua desionizada 3 min., y al final con aire para evitar que la columna se deteriore. Además se hace una limpieza semanal de los electrodos, los extremos de la columna, la ventana del capilar y el área de la interfase entre los viales y el cartucho de la columna para el buen funcionamiento del equipo.

## RESULTADOS

### EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS DERIVADOS FLUORESCENTES

Se sabe que las temperaturas arriba de 30°C descomponen los derivados fluorescentes con CBQCA (Novatechev N. 2001) . Se realizó una curva para monitorear la estabilidad de los derivados a 20°C para mantener constante el área de pico durante 8h de reacción. Con la curva que se muestra en la figura 11 se observa que a partir de las 2.5- 3 horas de reacción no hay cambios significativos en el área del pico.



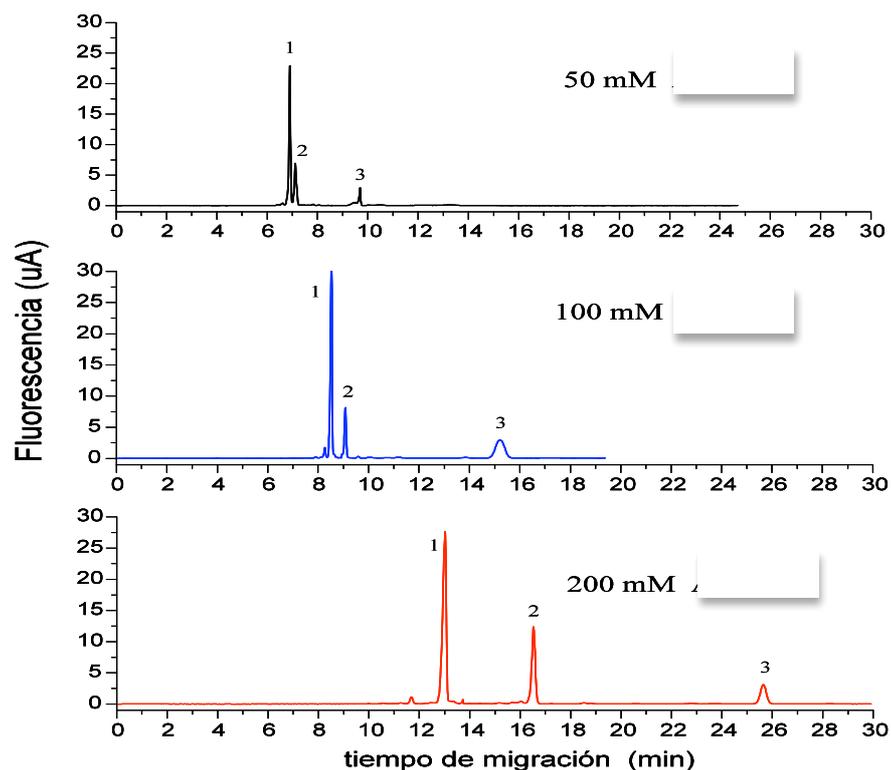
**Fig. 11 Gráfico que muestra que la estabilidad de los derivados fluorescentes N-leucina y glutamato se alcanza a las 2 h, mientras la del GABA hasta las 3 h.**

En la identificación del GABA y el glutamato por electroforesis capilar se estudió el efecto de variar la concentración del ácido bórico, del SDS y el pH del buffer. Para esto se realizaron tres determinaciones en cada caso, utilizando soluciones de GABA y glutamato en H<sub>2</sub>O.

#### **Efecto de la concentración del ácido bórico**

En este caso para un valor constante de pH = 9.3 se utilizaron tres concentraciones de ácido bórico evaluándose cada una de ellas por triplicado (Tabla 3). Se obtiene un mayor número de platos teóricos con la concentración del buffer más alta usada 200 mM (ver anexo 2).

<b>Tabla 3. Efecto de la concentración del buffer boratos</b>			
<b>Concentración (mM)</b>	<b>No de platos teóricos</b>		
	<b>GABA</b>	<b>glutamato</b>	<b>Nor-leucina</b>
50	206612	410235	225821
100	177725	92276	201914
200	183878	527285	674781

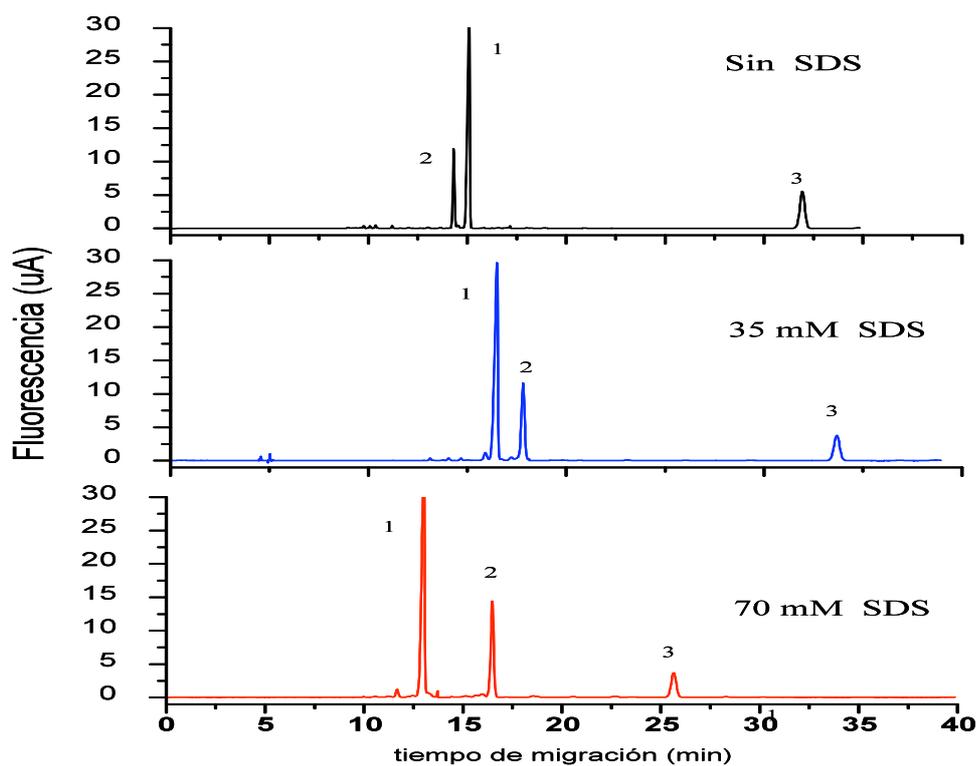


**Fig. 12** Efecto de la variación de la concentración del ácido bórico (AcBo). GABA (1), Nor-leucina (2), glutamato (3) con las condiciones de separación antes mencionadas.

#### Efecto de la concentración del SDS

En este caso se mantuvo constante la concentración del buffer a 200 mM de ácido bórico y el pH a 9.3. Se obtienen un mayor número de platos teóricos con la concentración mayor de SDS usada en el ensayo: 70 mM (ver anexo 2).

<b>Tabla 4. Efecto de la concentración de SDS</b>			
<b>Concentración de SDS (mM)</b>	<b>No de platos teóricos</b>		
	<b>GABA</b>	<b>glutamato</b>	<b>Nor-leucina</b>
0	204765	423765	554321
35	306411	318674	281275
70	362263	302107	439080



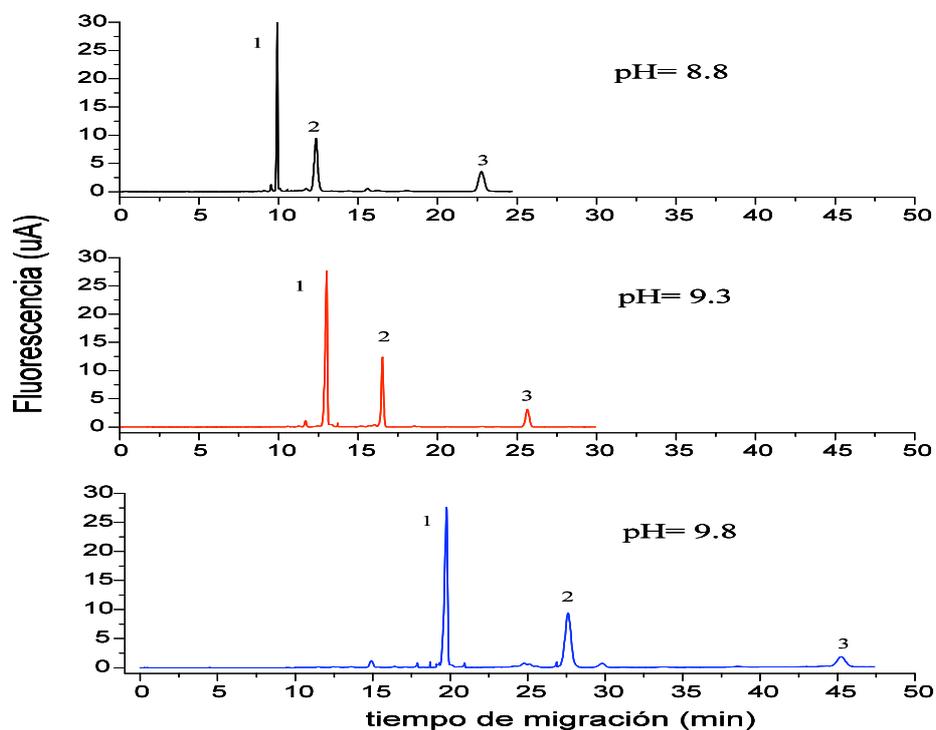
**Fig. 13 Efecto de la variación de la concentración de SDS. GABA (1), Nor-leucina (2), glutamato (3) con las condiciones de separación antes mencionadas.**

**Efecto del pH del buffer**

En este caso para un valor constante de concentración de ácido bórico (200mM) y SDS (70mM) se utilizaron tres valores de pH evaluándose cada una de ellas por triplicado (Tabla 5). Se obtiene un mayor número de platos teóricos con el pH de 9.3 usado en el ensayo (ver anexo 2).

Tabla 5. Efecto del pH del buffer			
pH	No de platos teóricos		
	GABA	glutamato	Nor-leucina
8.8	369546	212196	139143

9.3	155113	390160	452270
9.8	353071	302497	231569



**Fig. 14 Efecto de la variación del pH del buffer. GABA (1), Nor-leucina (2), glutamato (3) con las condiciones de separación antes mencionadas.**

El pH óptimo fue de 9.3, ya que se logró una buena separación y el menor tiempo de separación.

Con base en estos resultados se estableció que el buffer de boratos se debe utilizar en una concentración 200 mM + 70mM SDS a un pH = 9.3 en las determinaciones de GABA y glutamato. (Fig. 14,15,16 en color rojo).

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

T = 25 °C

V = 15 kV

Columna = 50 cm x 75 μm D.I.

Tiempo de inyección = 6 segundos por presión.

Volumen de la muestra inyectado: 23 nl

Electrolito de trabajo: Ácido bórico 200 mM y SDS 70 mM a pH 9.3

donde: T es la temperatura de separación, V es el voltaje aplicado durante la separación, D.I. es diámetro interno del capilar.

## OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

### Linealidad y precisión del método

Se determinó la linealidad del método con soluciones estándar de 0.2 – 20  $\mu\text{M}$  y se graficó la relación fluorescencia del aminoácido entre la fluorescencia del estándar interno (aminoácido/ EI) contra la concentración del aminoácido. Se obtuvo mediante regresión por mínimos cuadrados el coeficiente de correlación r, el intercepto (b) y la pendiente (m) de la recta de cada una de las curvas así como el promedio. (Tablas 6 y 7).

Tabla 6. Linealidad y precisión del método para el GABA.						
Concentración GABA $10^{-6}$ M	Fluorescencia (n=3)			Media	DE	CV(%)
	GABA <sub>1</sub> /EI	GABA <sub>2</sub> /EI	GABA <sub>3</sub> /EI			
<b>0.2</b>	0,0408	0,0410	0,0399	0,0404	6,0854E-4	1,505
<b>2</b>	0,3448	0,3459	0,3447	0,3453	6,7924E-4	0,197
<b>5</b>	0,8506	0,8517	0,8506	0,8512	6,5152E-4	0,077
<b>10</b>	1,6560	1,6684	1,6572	1,6628	6,8267E-3	0,411
<b>15</b>	2,4486	2,4611	2,4499	2,4555	6,8597E-3	0,279
<b>20</b>	3,3813	3,3825	3,3713	3,3769	6,1546E-3	0,182
<b>Intercepto (b)</b>	0,00368	0,00562	0,00502			
<b>Pendiente (m)</b>	1,6666E5	1,6698E5	1,6635E5			
<b>Correlación (r)</b>	0,9996	0,9996	0,9996			
<b>S<sub>y/x</sub></b>	0,037	0,038	0,027			
<b>%S<sub>y/x</sub></b>	2,550	2,551	2,540			

Tabla 7. Linealidad y precisión del método para el glutamato (E).						
Concentración glutamato $10^{-6}$ M	Fluorescencia (n=3)			Media	DE	CV(%)
	E <sub>1</sub> /EI	E <sub>2</sub> /EI	E <sub>3</sub> /EI			
<b>0.2</b>	0,0081	0,0082	0,0080	0,0081	1,062E-04	1,305
<b>2</b>	0,0571	0,0582	0,0571	0,0577	6,487E-04	1,125

<b>5</b>	0,1391	0,1403	0,1392	0,1398	6,827E-04	0,488
<b>10</b>	0,2959	0,2970	0,2959	0,2964	6,483E-04	0,219
<b>15</b>	0,3993	0,4006	0,3995	0,4000	7,210E-04	0,180
<b>20</b>	0,5471	0,5483	0,5472	0,5478	6,790E-04	0,124
<b>Intercepto (b)</b>	0,00267	0,00198	0,00199			
<b>Pendiente (m)</b>	2,6952E4	2,6917E4	2,6918E4			
<b>Correlación (r)</b>	0,9995	0,9996	0,9996			
<b>S<sub>y/x</sub></b>	0,0450	0,0462	0,0451			
<b>%S<sub>y/x</sub></b>	2,179	2,180	2,1791			

### Exactitud

Se determinó la exactitud del método a partir de los datos obtenidos en las tres gráficas de linealidad. Se usó la fórmula que se proporciona en la Fig 15 (ver la Tabla 8 y 9). Se evaluó para cada una de las concentraciones de la curva promedio, de acuerdo a la ecuación siguiente:

$$DEA\% = \left| \frac{\text{Concentración no minimal} - \text{Concentración experimental}}{\text{Concentración no minimal}} \right| \times 100$$

Si el valor de la DEA% (desviación absoluta) es menor o igual al 3%, el método es exacto.

<b>Tabla 8. Exactitud del método para GABA</b>					
Concentración Nominal GABA	Concentración experimental GABA 10 <sup>-6</sup> M			Promedio	% DEA.
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
<b>2,00E-07</b>	2,071E-07	2,080E-07	2,013E-07	2,055E-07	2,727
<b>2,00E-06</b>	2,028E-06	2,034E-06	2,027E-06	2,030E-06	1,489
<b>5,00E-06</b>	5,057E-06	5,064E-06	5,057E-06	5,059E-06	1,187
<b>1,00E-05</b>	9,881E-06	9,955E-06	9,888E-06	9,908E-06	0,921
<b>1,50E-05</b>	1,463E-05	1,470E-05	1,464E-05	1,466E-05	2,297
<b>2,00E-05</b>	2,021E-05	2,022E-05	2,015E-05	2,020E-05	0,984

<b>Tabla 9. Exactitud del método para glutamato</b>			
Concentración	Concentración experimental glutamato 10 <sup>-6</sup> M	Promedio	% DEA.

Nominal glutamato	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
2,00E-07	2,030E-07	2,071E-07	1,993E-07	2,031E-07	1,567
2,00E-06	2,021E-06	2,063E-06	2,022E-06	2,035E-06	1,773
5,00E-06	5,065E-06	5,111E-06	5,069E-06	5,082E-06	1,639
1,00E-05	1,089E-05	1,093E-05	1,089E-05	1,090E-05	1,806
1,50E-05	1,472E-05	1,477E-05	1,473E-05	1,474E-05	1,713
2,00E-05	2,021E-05	2,026E-05	2,022E-05	2,023E-05	1,143

Tabla 10. Resultados de la optimización			
Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Dictamen
Linealidad del método	Valor de r superior a 0.99 $S_{y/x} \leq$ al 3.0 %	GABA $S_{y/x} = 2.51\%$	Aceptado
		glutamato $S_{y/x} = 2.17\%$	Aceptado
Precisión del método Repetibilidad	CV $\leq$ al 3.0 %	GABA CV = 0,44 %	Aceptado
		glutamato CV = 0,57 %	Aceptado
Exactitud del método	DEA $\leq$ al 3.0 %	GABA DEA = 0,528 %	Aceptado
		glutamato DEA = 0,434 %	Aceptado

Tabla 11. tiempo de migración, DER del tiempo y del área			
Analito	Tiempo de migración (min)	% DER (n=6)	
		tiempo	Área
GABA	13.11	0,55	0,15
glutamato	26.06	0,94	0,07

**Limites de detección (LDD) y cuantificación (LDC)**

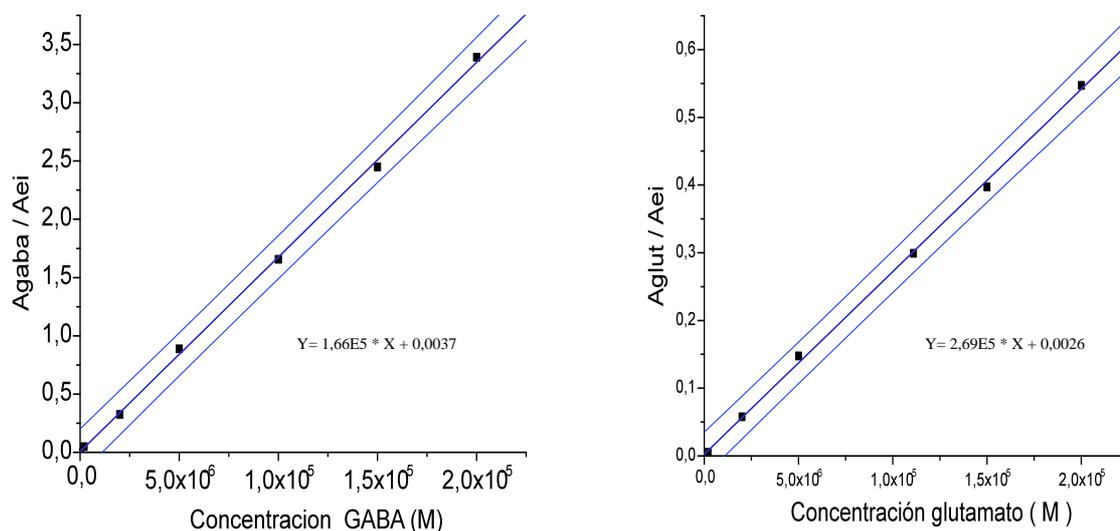
El límite de detección es la mínima cantidad de analito que se puede detectar de manera confiable y corresponde a una señal que es 3 veces la desviación estándar del blanco ( $3\sigma$ ). El límite de cuantificación es la mínima cantidad de analito que se puede determinar de manera confiable ( $10\sigma$ ). Los límites de detección y cuantificación se determinan al construir una curva de calibración, en este caso se realizó una calibración por el método del estándar interno. Los LDD y los LDC pueden ser expresados en concentración (nM) o en masa (amol o fmol) al considerar el volumen de inyección.

### Límites de detección

Aminoácido	LDDc (nM)	LDDm (amol)
GABA	0.33	7.6
glutamato	0.64	14.7

### Límites de cuantificación

Aminoácido	LDCc (nM)	LDCm (fmol)
GABA	7.0	1.7
glutamato	2.0	0.05



**Fig 15. Gráfica para evaluar el intervalo lineal del método para la determinación de GABA y glutamato con la indicación de su intervalo de confianza.**

### % de Recuperación

Los aminoácidos tienen un % de recuperación cercano al 100% siendo satisfactorios los resultados.

<b>Aminoácido</b>	<b>% recuperación</b>
<b>GABA</b>	<b>99,5</b>
<b>glutamato</b>	<b>102</b>

### **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GABA Y GLUTAMATO EN EL HIPOCAMPO DE RATAS SANAS.**

Las muestras A, B, C, D, E, y F corresponden a homogenados de hipocampos de ratas sanas que se diluyeron 1:5 y se derivatizaron como se mencionó anteriormente. Se realizaron curvas de calibración con las cuales se determinó la concentración de las muestras analizadas en el transcurso de ese día.

Los resultados se presentan en la tabla 13 y se puede observar que el error es mínimo y que los valores se encuentran dentro de lo reportado en otros trabajos.

<b>RATA</b>	<b>Concentración GABA (μmol/g tejido)</b>	<b>Concentración glutamato (μmol/g tejido)</b>
<b>A</b>	1,694	9,177
<b>B</b>	1,993	12,037
<b>C</b>	2,255	12,267
<b>D</b>	2,138	10,806
<b>E</b>	2,369	10,828
<b>F</b>	2,212	10,636
<b>PROMEDIO</b>	2,110	10,958
<b>ERROR</b>	0,098	0,454



Fig. 16 Concentración de GABA y glutamato ( $\mu\text{mol/g}$  tejido) en homogenados de hipocampo en ratas control. (n=6)

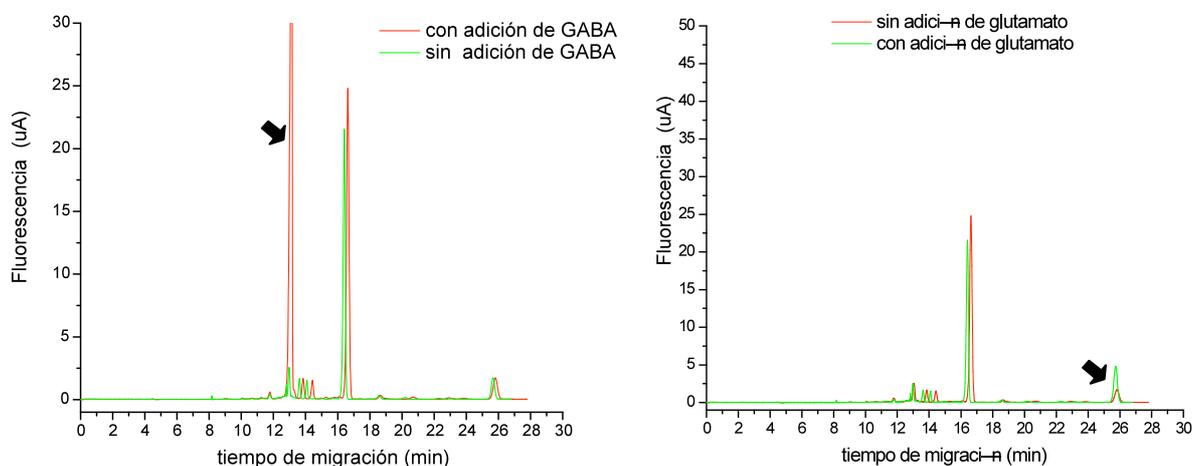
## **Análisis y Discusión de los resultados**

La MEKC es el método que satisface las condiciones para la separación de GABA y el glutamato. El GABA es un zwitterion (ver anexo A) como otros otros amino ácidos neutros del sistema nervioso central como son: treonina, valina, glutamina y tirosina (Rada P. 1999). MEKC aumenta la sensibilidad para detectar de los compuestos neutros ya que incorpora al derivado fluorescente en su interior evitando la pérdida de fluorescencia por que da un efecto protector atenuando las colisiones y disminuye la difusión del O<sub>2</sub> que genera pérdida de fluorescencia al generarse un micro ambiente (Zhou L. 2008). Para evitar traslape de picos en las muestras del homogenado se estudió el efecto de la concentración del SDS en la separación y con 70 mM de SDS se observó una mayor resolución de los picos y un menor tiempo de migración.

El efecto de aumentar la concentración de ácido bórico en el buffer y el pH tuvo como consecuencia una aumento en el tiempo de migración. De acuerdo a las ecuaciones 1 , 6 y 9 al aumentar la concentración del electrolito, aumenta la viscosidad, la fuerza iónica y en consecuencia la movilidad electroforética disminuye, En el caso de aumentar el pH se aumenta la carga negativa. De acuerdo con la ecuación 1 el efecto de aumentar la carga provoca una mayor movilidad que al ir en contra del flujo electroosmótico también genera un mayor tiempo de migración.

La curva de calibración del GABA y del glutamato fue lineal en una rango de concentración de 0,2- 20  $\mu$ M y presentó un coeficiente de determinación ( $r^2 = 0.9996$ ) y de 0.9995, respectivamente.

Debido a que el homogenado del hipocampo presenta una mayor fuerza iónica se observa una variación significativa en el tiempo de migración con respecto a los tiempos de los estándares. En consecuencia fue necesario agregar a las muestras de hipocampo alícuotas de las disoluciones estándar del GABA y del glutamato como un control. Al aumentar el pico correspondiente al GABA y al glutamato respectivamente se confirmó el tiempo de migración y la presencia de los aminoácidos (Fig. 17).



**Fig. 17 Identificación del GABA y del glutamato en los homogenados de hipocampo.**

Los límites de detección y cuantificación se encuentran dentro del rango de nM reportado para esta metodología EC-LIF (Dovich J., 2006). Aunque para el GABA se obtuvo un mejor LDD que para glutamato, esto se debe a que el GABA se separa en las micelas y el SDS disminuye la pérdida de fluorescencia al minimizar las colisiones de GABA, lo que permite que presente mayor resolución en la separación, además de que puede presentar mejor eficiencia en la reacción con el CBQCA, y como consecuencia mayor valor de fluorescencia.

Respecto al proceso de extracción de los neurotransmisores se obtuvieron para el GABA 99,5 % y para glutamato 102 % de recuperación, por lo que se recupera prácticamente toda la muestra en el proceso.

Los resultados obtenidos por este método se compararon con las concentraciones reportadas previamente con otras metodologías (Tabla 14).

Tabla 14. Comparación de la determinación de GABA y glutamato en hipocampo de rata por Electroforesis Capilar y otros métodos						
	Presente estudio	Lerma J.	TossmanU.	Ajit J. Shah	Szyndler J.	Balcom.G.J.
Método	EC-LIF Derivados con CBQCA	Autoanalizador CLAR	CLAR- LIF Derivados con OPA	CLAR-LIF Derivados con NDA	CLAR- electroquímico Derivados con OPA	Ensayo enzimático Detector fluorométrico
Número de	6	10	5	6	10	6

determinaciones						
unidades	$\mu\text{mol/g tejido} \pm \text{ES}$					
GABA	$2,11 \pm 0,01$	$2,08 \pm 0,15$	$2,5 \pm 0,2$	$9,6 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,15$	$2,02 \pm 0,05$
glutamato	$10,98 \pm 0,45$	$11,80 \pm 0,38$	$10,00 \pm 0,5$	$10,80 \pm 0,4$	$15,0 \pm 0,3$	$10,76 \pm 0,5$

ES: error estándar

Se puede observar que no hay diferencias significativas entre el autoanalizador CLAR y CLAR-LIF con derivados de OPA, sin embargo con CLAR-NDA se muestra niveles de GABA mayores y en el caso de CLAR-OPA con el detector electroquímico los niveles de glutamato son más altos.

Respecto a la reproducibilidad de la metodología el uso del CBQCA nos da mayor seguridad ya que los derivados que se forman son más estables que los formados por OPA o NDA (Novotny M. 1991), aunque el CBQCA requiere mas tiempo para formar los derivados fluorescentes (2 h) que OPA (4 min). Pero el CBQCA es mejor cuando se requiere gran sensibilidad en la identificación de los compuestos.

La electroforesis capilar muestra muchas ventajas con respecto a las técnicas cromatograficas, en la adecuabilidad del sistema no hay desperdicio de fase móvil y no se requiere el consumo de disolventes orgánicos para la separación. El volumen de la muestra que se necesita para electroforesis capilar es de nL mientras que en todas las otras técnicas se requieren  $\mu\text{L}$ , lo cual es muy importante cuando se trata de muestras pequeñas o cuando no se cuenta con mucha muestra como en el caso de los microdialisados. La electroforesis capilar es ideal para análisis a microescala.

Al comparar con la técnica fluorométrica solo queda decir que la EC esta acoplado con LIF que le aporta mayor sensibilidad al método. Además la EC es más económica que la CLAR porque no se requieren de grandes volúmenes de fase móvil y las columnas son muy manejables.

## **Conclusiones**

- Se pudo identificar y cuantificar de forma confiable el GABA y el glutamato en muestras de hipocampo de rata.
- La electroforesis capilar (EC) es una técnica muy sensible en la detección del GABA y el glutamato.
- Los valores de LDD y LDQ son parecidos para los de la CLAR pero la electroforesis capilar presenta la ventaja de un menor tiempo de análisis.
- La recuperación absoluta de GABA y glutamato fue muy cercana al 100% por lo que la metodología es eficiente.
- La Electroforesis capilar usa volúmenes de muestra muy pequeños (nl), bajo consumo de reactivos, disolventes acuosos, poca fase móvil (<20 ml) que la hace incomparable con los otros métodos y muy adecuada para la determinación de los neurotransmisores en el área de las Neurociencias.

## **Perspectivas**

Se aplicará esta metodología a la medición de GABA y glutamato en el hipocampo de ratas privadas de sueño en colaboración con el laboratorio del Dr. Oscar Prospéro García.

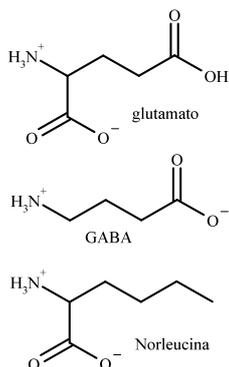
También se podrán evaluar muestras de microdiálisis de regiones específicas del cerebro.

## ANEXO A

La proporción de GABA, en forma de catión, zwitterion y anión (Thwaites, David T. 2000).

## ANEXO B

Valores pKa de GABA, glutamato y Nor-leucina



Aminoácido	pKa - COOH	pKa -NH <sub>3</sub>
glutamato	2,19 // 4,25	9,67
GABA	4,23	10,43
norleucina	2,39	9,76

## ANEXO C

Para evaluar la calidad de la señal obtenida, se determinó la cantidad de platos teóricos para un electroferograma representativo de cada grupo de determinaciones de acuerdo a la ecuación:

$$N = \frac{16t_m^2}{W_b} \quad (20)$$

donde: N es el número de platos teóricos,  $t_m$  es el tiempo de migración en minutos y  $w_b$  es el ancho de la banda a la mitad de la altura de la misma. Entre mayor sea el número de platos teóricos es mejor la resolución de la banda.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 **Ajit J.S., Crespi F.** “Amino acid neurotransmitters: separation approaches and diagnostic value”. *J. Chromatography B.* 2002, 781, 151-153.
- 2 **Albin M. Weinberger R.** “Fluorescence detection in capillary electrophoresis: Evaluation of derivatizing reagents and techniques” *Anal. Chem.* 1991, 63, 417-422
- 3 **Baker D.,** Capillary Electrophoresis (Techniques in Analytical Chemistry), Ed. Wiley Interscience, 1995.
- 4 **Balcom G. J. Lenox R. H.** “Regional  $\gamma$ -aminobutyric acid levels in rat brain determined after microwave fixation”. *J. of Neurochemistry*, 1975, 24, 609-613.
- 5 **Balcom G. J. Lenox R. H.** “Regional glutamate levels in rat brain determined after microwave fixation”. *J. of Neurochemistry*, 1976, 26, 423-425.
- 6 **Bardelmeijer H.A. Lingeman H.** “Derivatization in capillary electrophoresis”. *J. Chromatography A.* 1998, 807, 3-26
- 7 **Bergquist J., Gilman D.** “Analysis of human cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection”. *Anal. Chem.* 1994, 66, 3512-3518.
- 8 **Bergquist J, Vona M.J.,** “Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: a sensitive method for monitoring extracellular concentrations of amino acids in the periaqueductal grey matter”, *J. Neuroscience Methods*, 1996, 65, 33-42.
- 9 **Bodzon-Kulakowska A., Bierczynska- Krzysik A.** “Methods for samples preparation in proteomic research”. *J. Chromatography B.* 2007, 849, 1-31.
- 10 **Bruno V. et al.** “Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes as Targets for Neuroprotective Drugs” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2001. 21,1013–1033
- 11 **Castillo M., Revilla A. López R.** Fundamentos de Electroforesis Capilar. 1ª edición. Ed. UNAM FES- Cuautitlán. México. 2005
- 12 **Cooper R., Bloom F., Roth R. H..** “The Biochemical Basis of Neuropharmacology”, Oxford Press 2003.
- 13 **Dovich J. N., Kraly J.** “Bioanalytical Applications of Capillary Electrophoresis”. *Anal. Chem.* 2006, 78, 4097.
- 14 **Ehlen C.J., Albers E.H.** “MEKC-LIF of  $\gamma$ -amino butyric acid in microdialysate: systematic optimization of separation conditions by factorial analysis”. *J. of Neuroscience Methods.* 2005, 147, 36-37.
- 15 **Garcia-Campaña A., Taverna M.** “LIF detection of peptides and proteins in CE”. *Electrophoresis.* 2007, 28, 208-232.
- 16 **Gooijer C., Arjan J.G.** “Laser spectroscopy in analytical chemistry: light on the next millennium”. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 400, 281-295.
- 17 **Graham L. T. Aprison M. H.** “Fluorometric determination of aspartate, glutamate, and  $\gamma$  aminobutyrate in nerve tissue using enzymic methods”. *Analytical Biochemistry* 1966, 15, 487-497.
- 18 **Harris D.,** Analisis Químico Cuantitativo, 6ª edición, Ed. Reverté S.A., España, 2006.
- 19 **Hörtnagl H. Berger M.L.** “Regional Heterogeneity in the distribution of neurotransmitter markers in the rat hippocampus.” *Neuroscience.* 1991, 45, 261-272.
- 20 **Jeltsch H., Cassel J.C.** “Hippocampal amino acid concentrations after raphe and/or septal cell suspension grafts in rats with fimbria-fornix lesions” *Neuroscience.* 1994, 63, 41-45.
- 21 **Köhr G..** “NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution” *Cell Tissue Res.* 2006, 326, 436-446.
- 22 **Kopec S., Holzgrabe U.** “Amino acids: aspects of impurity profiling by means of CE”. *Electrophoresis.* 2007, 28, 2153-2167.
- 23 **Lerma J., Herranz A.S.** “In vivo Determination of extracellular concentration of amino acids in the rat Hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis”. *Brain Research,* 1986, 384, 145-155.

- 24 **Li H., Hong W.** "Determination of amino acid neurotransmitters in cerebral cortex of rats administered with baicalin prior to cerebral ischemia by capillary electrophoresis-laser induced detection". *J. Chromatography B*, 2003, 788, 93-101.
- 25 **Miller J. Jope R.** "Brain amino acid concentrations in rats killed by decapitation and microwave irradiation" *J. of Neuroscience Methods*. 1990, 31, 187-192.
- 26 **Miller J.C., Miller J.N.**, Estadística para Química Analítica, Ed. Addison Wesley Iberoamericana, U.S.A., 1993.
- 27 **Möhler H.** "GABA<sub>A</sub> receptor diversity and pharmacology" *Cell Tissue Res*. 2006, 226, 505-516.
- 28 **Molilna M., Silva M.**, "Micellar electrokinetic chromatography: current developments and future", *Electrophoresis*, 2002, 23, 3907-3921.
- 29 **Montigny Pierre de, S. J.** "Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde/Cyanide ion: a rationally designed fluorogenic reagent for primary amines". *Anal. Chem.* 1987, 59, 1096-1101.
- 30 **Nick Andrews, Barnes N.** "A comparison of rat brain amino acid and monoamine content in diazepam withdrawal and after exposure to a phobic stimulus". *Br. J. Pharmacol.* 1993, 109, 171-174.
- 31 **Novatchev N., Holzgrabe U.** "Evaluation of amino sugar, low molecular peptide and amino acid impurities of biotechnologically produced amino acids by means of EC". *J Pharmaceuicals and Biomedical Analysis*, 2002, 28, 475-486.
- 32 **Novotny M., Jinping Liu.** "Design of 3-(4-Carboxybenzoyl)-2quinolinecarboxaldehyde as a Reagent for Ultrasensitive Determination of Primary Amines by Capillary Electrophoresis Using Laser Fluorescence Detection". *Anal. Chem.* 1991, 63, 408-412.
- 33 **Nussbaum M., Prezedwiecki J.** "Electrochemical characteristics of aminoacids and peptides derivatized". *Anal. Chem.* 1992, 64, 1259-1264.
- 34 **Ottersen O.P.** "Excitatory and Inhibitory Amino Acids in the Hipocampus." *The Hippocampus-New vistas Liss. A.R. Inc.*, 1989, 97-117.
- 35 **Rada P., Tucci S. Teneud L.** "Monitoring  $\gamma$ -aminobutyric acid in human brain and plasma microdialysates using micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection". *J. Chromatography B* 1999, 735, 1-10.
- 36 **Ramek M., Nagy P.** "Theoretical investigation of the neutral/zwitterionic equilibrium of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) conformers in aqueous solution". *J.Phys. Chem.* 2000, 104, 6844-6854
- 37 **Silva M.** "MEKC: An update focusing on practical aspects". *Electrophoresis*. 2007, 28, 174-192.
- 38 **Siri N., Lacroix M.** "HPLC-fluorescence detection and MEKC-LIF detection for the study of amino acids and catecholamines labelled with naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde" *Electrophoresis*. 2006, 27, 4446-4455.
- 39 **Stock S., Martínez M., Moctezuma C.** Espectrofluorometría. Ed UNAM –IBT. México 2006
- 40 **Suñol C. Tusell J. M.** "Regional concentrations of GABA, serotonin and noradrenalina in brain at onset of seizures induced by lindane ( $\gamma$ -hexachlorocyclohexane)". *Neuropharmacology*, 1988, 27, 671-681.
- 41 **Szyndler J., Piechal A.** "Effect of kindled seizures on rat behavior in water morris maze test and amino acid concentrations in brain structures". *Pharmacological reports*. 2006, 58, 75-82.
- 42 **Terabe S., Muijselaar PG, Otsuka K.** "Micelles as pseudo-stationary phases in micellar electrokinetic chromatography" *J. Chromatography A*. 1997;780(1-2):41-61.
- 43 **The United States Pharmacopeia, USP** 29, 2936-2940.
- 44 **Thwaites T.D., Basterfield L.** "Gamma-aminobutyric acid (GABA) transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cell monolayers". *British Journal of Pharmacology*, 2000, 129, 457-464.
- 45 **Tossamn, U. Jonsson G.** "Regional distribution and extracellular levels of amino acids in rat central nervous system". *Acta Physiol. Scand.*, 1986, 127, 533-545.
- 46 **Ummadi M. Weimer B.C.** "Use of capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence for attomole detection of amino acids". *J. Chromatography A*. 2002, 964, 243-253.

- 47 **Wood P., Khan M.** “Neurochemical analysis of amino acids, polyamines and carboxylic acids: GC-MS quantitation of tBDMS derivatives using ammonia positive chemical ionization”. *J. Chromatography B.* 2006, 831, 313-319.
- 48 **Zhang L., Chen H..** “Determination of the amino acid neurotransmitters in the dorsal root ganglion of the rat by capillary electrophoresis with a laser induced fluorescence-charge couple device. *J. Chromatography B.* 1998, 707, 59-67.
- 49 **Zhou Lei, Weiping Wang.** “Nonaqueous capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: A case study of comparison with aqueous media” *Analytica Chimica Acta* 2008, 611, 212-219.
- 50 [http://www.scat.bristol.ac.uk/online\\_learning/lecture\\_notes/course1/Course\\_microfluidics\\_intro.pdf](http://www.scat.bristol.ac.uk/online_learning/lecture_notes/course1/Course_microfluidics_intro.pdf)  
[Consulta 10/03/08]