



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

“Determinación de la integridad estructural del toxoide tetánico como proteína estructural de inmunógeno contra opiáceos por cromatografía de exclusión molecular”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

DARÍO MENESES GARMENDIA

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. BENITO ANTÓN PALMA
ASESOR: Dr. JUAN CARLOS VÁZQUEZ LIRA**

Ciudad de México, 2016.



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.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mis Abuelos David Meneses Ahuatzin y Carmen Ortega
Escoto que me cuidan y guían desde el cielo. Gracias a su apoyo y motivación
sigo adelante tratando de lograr mis metas.

Agradecimientos

Agradezco a mi madre, mi padre y a mi hermana por el apoyo y amor incondicional e invaluable que me han brindado. Ustedes son los cimientos de mi desarrollo. Los quiero

Agradezco sinceramente a mis directores de tesis el Dr. Benito Antón y al Ing. Rodolfo Acevedo por ser mi guía para realizar este trabajo, por sus conocimientos y orientaciones. También agradezco a Juan Carlos, Maura, Edgar, Salomón, Paty, Ricardo y Susana por brindarme su amistad y compartir sus conocimientos

Agradezco al Dr. Juan Carlos Vázquez Lira por brindarme su sabiduría, paciencia, tiempo y apoyo

A Ely por la ayuda que me has brindado ha sido sumamente importante, estuviste a mi lado inclusive en los momentos y situaciones más difíciles, siempre ayudándome. No fue sencillo culminar con éxito este proyecto, sin embargo siempre me motivaste y dijiste que lo lograría perfectamente. Me ayudaste hasta donde te fue posible incluso más que eso, muchas gracias amor

Agradezco a NIDA (*NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE*) por el financiamiento al proyecto, así como al CONACYT, la FGRA, CONADIC y el INPRF.

Agradezco al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz por ser la sede del desarrollo del trabajo de tesis, en la Unidad de investigación biopsicosocial en adicciones.

Gracias a la vida por este nuevo triunfo, gracias a todas las personas que me apoyaron y creyeron en mí para la realización de esta tesis.

“La salud de todos los pueblos es una condición fundamental de la paz mundial y de la seguridad, depende de la cooperación más estrecha posible entre los estados y entre los individuos...”

Tabla de contenido

	Pág.
I. Nomenclatura	8
II. Resumen	10
III. Introducción	12
Fundamentos teóricos	16
IV. Técnicas de separación por Cromatografía	16
V. Caracterización por cromatografía	19
VI. Cromatografía de líquidos en columna	19
VII. Cromatografía de líquidos de Fase enlazada	23
VIII. Cromatografía de Fase normal (CFN)	23
IX. Cromatografía de Fase Reversa (CFR)	23
X. Cromatografía de intercambio iónico	25
XI. Cromatografía de Exclusión por tamaño molecular (CEM)	26
1. Mecanismo de Retención	28
2. Fases estacionarias para cromatografía de exclusión molecular	29
3. Fases móviles para cromatografía de exclusión por molecular	31
4. Consideraciones prácticas	31
XII. Componentes básicos de un sistema para CLAR.	32
1. Sistema para el tratamiento de los disolventes	34
2. Sistemas de bombeo	34

3.	Sistema de inyección de la muestra	35
4.	Termostatos	35
5.	Detectores	36
5.1	Detector de absorbancia	36
5.2	Detector de dispositivo de diodos	37
5.3	Detector de fluorescencia	37
5.4	Detector de infrarrojo	38
5.5	Detector de índice de refracción	39
6.	Columnas	39
6.1	Tipos de rellenos	40
XIII.	Parámetros cromatográficos generales	40
1.	Factor de capacidad	41
2.	Eficiencia	42
3.	Selectividad	43
4.	Resolución	43
XIV.	Parámetros para cromatografía de exclusión molecular	44
1.	Curva de selectividad y medios de selección	46
2.	Resolución	47
3.	Análisis cuantitativo	48
4.	Normalización de área	48
5.	Calibración con estándar externo	49
6.	Calibración con estándar interno	49
7.	Adición de estándar	49
		50

8.	Determinación de la masa molecular	50
9.	Método de calibración para determinar la masa molecular	
XV.	Farmacología de los compuestos opiáceos	52
1.	Clasificación de los compuestos opiáceos	53
2.	Tratamiento para la Adicción	56
XVI.	Proteínas: composición y estructura	58
1.	Clasificación de las proteínas	60
2.	Estructura primaria	61
3.	Estructura secundaria	62
4.	Estructura terciaria	62
5.	Estructura cuaternaria	63
6.	Desnaturalización proteica	64
XVII.	Toxina tetánica	65
1.	Vacunas con toxinas inactivadas	67
2.	Producción de toxoides bacterianos e inactivación	67
3.	Aislamiento	69
XVIII.	Vacunas conjugadas	70
XIX.	Estudio de Estabilidad para vacunas utilizando toxoides	71
XX.	Planteamiento del problema	75
XXI.	Objetivo general	77
XXII.	Hipótesis	78
XXIII.	Diseño experimental	79
XXIV.	Diagrama de Flujo	80

XXV. Materiales y recursos	82
1. Condiciones cromatográficas	82
XXVI. Condiciones del estudio de integridad estructural	83
XXVII. Metodología	84
1. Preparación de la fase móvil	84
2. Preparación del estándar para CLAR por filtración en gel Bio-RAD	84
XXVIII. Resultados	85
1. Marcadores de masa molecular	85
2. Recta de calibración	86
3. Linealidad del sistema tomando a la proteína del Toxoide Tetánico como analito	87
4. Límite de detección	89
5. Límite de Cuantificación	91
6. Caracterización de la muestra	91
XXIX. Discusión	102
XXX. Conclusiones	106
XXXI. Perspectivas	107
XXXII. Referencias	108
XXXIII. Glosario de términos	112
XXXIV. Anexo 1	116
XXXV. Anexo 2	117
XXXVI. Anexo 3	118

Nomenclatura

AU Unidades de absorbancia	K_d Coeficiente de distribución
AIR Actividad intrínseca relativa	K_{p promedio} Coeficiente de reparto
BPL Buenas prácticas de laboratorio	k' Factor de capacidad o razón de reparto
CAF Cromatografía de afinidad	LC Límite de cuantificación
CCF Cromatografía en capa fina	LD Límite de detección
CEM Cromatografía de exclusión por tamaño molecular	Lf Límite de floculación
CFR Cromatografía de fase reversa	MM Masa molecular
CFG Cromatografía de filtración en gel	mg Miligramos
CFN Cromatografía de fase normal	ml Mililitros
CL Cromatografía de líquidos	μl Micro litros
CLAP Cromatografía de líquidos de alta presión	μg Microgramos
CLAR o HPLC Cromatografía de líquidos de alta resolución o por sus siglas en inglés High performance liquid chromatography	n Número de mediciones o muestras o determinaciones
CLUR o UPLC Cromatografía de líquidos de ultra resolución o por sus siglas en inglés Ultra performance liquid chromatography	N Número de platos teóricos
CP Cromatografía en papel	PCB policlorobifenilos o bifenilos policlorados son una serie de compuestos organoclorados
CV Coeficiente de variación o Desviación estándar relativa	pI Carga eléctrica
DL₅₀ Dosis requerida para matar al 50% de animales en un grupo dentro de un tiempo específico	R Resolución
FG Filtración en gel	α Retención relativa o selectividad o separación entre picos
K Coeficiente termodinámico de repartición	S Desviación estándar
	SNC Sistema nervioso central
	Ref. Sustancia de referencia
	T_R Tiempo de retención

TT Toxoide tetánico

t₀ Tiempo muerto

V_R Volumen de retención

V_E Volumen de la fase estacionaria

V_e Volumen de elución

V₀ Volumen vacío

Resumen

Se describe un método de cromatografía líquida de alta resolución por filtración en gel (CLAR-FG), para realizar estudios experimentales acerca de la integridad en la estructura proteica del Toxoide Tetánico (TT) del lote: TAM137 y su conjugado hapteno-proteína (M-TT lote: 2) durante el almacenamiento a baja temperatura ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) y sobre los efectos que causa la exposición prolongada a diferentes temperaturas sobre la conformación estructural de la proteína del TT y su conjugado.

El TT es utilizado como proteína acarreadora en una formulación hapteno-proteína, este conjugado es utilizado en un modelo de inmunógeno dirigido contra compuestos opiáceos causantes de generar dependencia física, psicológica y abuso a estas sustancias con un potencial altamente adictivo. Con el objetivo de desarrollar un tratamiento que genere anticuerpos específicos contra dichas sustancias y su bloqueo en sangre periférica evite que surta efecto positivo en el SNC.

Los resultados mostraron que el método diseñado por CLAR-FG logra la caracterización de la materia prima y del conjugado (TT y M-TT) mediante una columna Shodex PROTEIN KW-803. Para el TT lote: TAM137 un T_R de 9.04 min y para el conjugado M-TT lote: 2 presenta dos compuestos importantes detectados a 280 nm de λ el primero con T_R **a** 9.202 min y el segundo con T_R **b** 16.341 min. Los ensayos realizados demuestran los cambios en la conformación de la proteína del TT durante el almacenamiento en disolución y a temperatura controlada se muestra paulatinamente el cambio por el fenómeno de agregación a lo largo del estudio (2 años y 2 meses) donde se observa que la mayor área bajo la curva corresponde a compuestos de alta masa molecular y durante el envejecimiento no se produce fragmentación o compuestos de baja molecularidad, por lo que se considera que la temperatura óptima de almacenamiento es $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Por otro lado, los estudios realizados a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ no mostraron

tener efecto en la integridad de la estructura proteica, sin embargo los ensayos mostraron que después de someter la proteína a temperaturas mayores (37-50 °C) durante una semana presenta una fragmentación acelerada. Asimismo, la evaluación del conjugado muestra que la integridad en la estructura varía a lo largo de tres años después de ser formulado, los perfiles cromatográficos muestran una agregación para la estructura proteica (**a**) y fragmentación para los compuestos de menor masa molecular (**b**). Los perfiles cromatográficos obtenidos para las muestras del conjugado que fueron sometidas a 22°C demuestran que mantiene el mismo perfil y por tanto la estructura no presenta cambios en su conformación. El ensayo para la proteína después de ser sometida a temperatura de 37°C presenta una modificación en la integridad de su estructura por fragmentación a compuestos de menor masa molecular. En tanto, la muestra sometida a 55°C tiene un efecto de agregación para la estructura que corresponde a la proteína (**a**) y fragmentación para compuestos derivados de menor masa molecular (**b**) debido a las interacciones intermoleculares y del medio por las altas temperaturas.

Los resultados obtenidos mediante el método descrito demuestran que existen modificaciones en la conformación de la estructura de la proteína del TT debido al tiempo que permanece en almacenamiento, estos cambios se dan de forma gradual, por lo que se requiere llevar controles de calidad y periodos de análisis más frecuentes para evaluar la calidad de los lotes de proteína utilizados en la formulación del conjugado. El método por CLR-FG resultó ser útil para el control de calidad para la proteína del TT y su conjugado. El estudio de integridad estructural del TT y su conjugado a diferentes temperaturas muestra que la proteína es lábil a temperaturas mayores de 22°C, ya que la capacidad inmunizante está relacionada con la estructura proteica es importante controlar la temperatura durante el almacenamiento de dicho conjugado utilizado en la formulación de un modelo de inmunógeno contra opiáceos.

Introducción

La cromatografía se introduce en los métodos de separación en 1903 y su posterior desarrollo y evolución se produce hacia 1930. La primera persona que definió la cromatografía fue el botánico ruso Miguel Tswett (1872-1913) en 1906 y eligió el término cromatografía procedente de las palabras griegas khromatos (color) y graphos (escrito) ya que utilizó el término cromatografía para describir la separación de pigmentos vegetales en distintas zonas coloreadas⁽¹⁾. Aunque la mayor parte de las separaciones que se realizan actualmente son de compuestos incoloros, el término inicial cromatografía se ha mantenido. El mayor avance se produce en 1930 con Lederer cuando consigue separar los colorantes de la yema de huevo. Posteriormente los químicos Khun, Kamer y Ruzucca desarrollan la cromatografía en el campo de la química orgánica e inorgánica, y obtienen el premio Nobel por sus trabajos en 1937, 1938, 1939 respectivamente.

A partir de 1940 los métodos cromatográficos adquieren extensión mundial de forma que, en 1940 Tiselius divide los métodos cromatográficos en cromatografía por análisis frontal, desarrollo por elución y desarrollo por desplazamiento, obtuvo el premio Nobel por sus trabajos en 1948. Al mismo tiempo la cromatografía se aplicaba en el campo de la bioquímica, y así Martin consigue separar algunos aminoácidos acetilados.

A partir de estos descubrimientos el uso de la cromatografía se ha extendido debido a su gran versatilidad y sencillez en algunos casos como la cromatografía en papel (CP) la cual fue desarrollada por Martin. Y que tiene como soporte papel de celulosa. La CP adquirió una gran extensión por su sencillez y presenta la ventaja de poder utilizar mg y μg , además presenta la opción de utilizar tanto la técnica descendente (en columna) como la técnica ascendente. La cromatografía en capa fina (CCF) fue originada por los trabajos de los investigadores rusos Izmailov y Schraiberen en 1938 al separar mezclas de tinturas

farmacéuticas. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria se extiende sobre un soporte inerte, la dificultad que presentaba el método era el crear una capa homogénea, sin ningún tipo de rugosidad. La CCF tuvo valor limitado hasta que Stahl estandarizó el método para elaborar capas finas por métodos mecánicos. En 1954, Martín y James empleaban una bureta automática para detectar y determinar aminoácidos ⁽²⁾. El verdadero potencial no se pudo alcanzar hasta la publicación de Ray, del primer cromatograma hasta 1954, el detector utilizado fue conductividad térmica. La cromatografía es una de las técnicas más utilizadas e importantes, de forma que ha revolucionado el campo de la química analítica y la biotecnología entre otros, debido a la amplia gama de compuestos desarrollados como fases estacionarias y materiales de empaque, columnas, fases móviles y accesorios que permite tener aplicaciones en muchos campos de la ciencia.

El desarrollo de la CFG por Flodin y Porath en 1958 descubre que utilizando como fase estacionaria geles se consigue separar polímeros sintéticos de alta masa molecular ⁽³⁾.

La cromatografía de afinidad (CAF) ideada por Porath en 1967, usando como fuente un péptido o proteína unida covalentemente a un ligando fue utilizada para la separación de moléculas protéicas.

En la actualidad, existe una necesidad de desarrollar nuevos métodos analíticos que puedan ayudar a determinar la integridad estructural de biomoléculas que son utilizadas para generar una respuesta inmune en contra de fármacos que actúan sobre el SNC, y que tienen gran trascendencia, tanto desde la terapéutica como desde la toxicología, ya que este factor influye directamente en la calidad, seguridad y eficacia de cualquier producto utilizado con fines preventivos o terapéuticos. ⁽⁴⁾

Desde el punto de vista neurobiológico, es necesario conocer el modo en que actúan los psicofármacos para poder desarrollar nuevas estrategias, lo que se traduce en un espectro más amplio de enfoques posibles para el tratamiento de la adicción como enfermedad mental. ⁽⁵⁾

En el proceso de vacunación, se usa la capacidad innata del cuerpo de protegerse a sí mismo frente a agentes dañinos inmunizando el cuerpo con antígenos que no provocarán la enfermedad pero que estimularán la formación de anticuerpos que protegerán frente a la enfermedad. Sin embargo, no siempre es posible estimular la formación de anticuerpos simplemente inyectando el agente extraño. ⁽⁶⁾

La preparación de una vacuna debe ser inmunógena, es decir, debe ser capaz de inducir una respuesta inmune durante periodos prolongados de tiempo. Ciertos agentes tales como el toxoide tetánico (TT) son inmunógenos de manera innata, y pueden administrarse en vacunas sin modificación después de almacenarlo por varios meses a bajas temperaturas. Sin embargo, otros agentes importantes como algunos fármacos que crean dependencia no son inmunógenos y deben convertirse en moléculas inmunógenas antes de que puedan inducir una respuesta inmune. El uso de vacunas que median la respuesta a través del sistema inmune por medio de la acción de anticuerpos, son dirigidas en un intento de bloquear la sustancia en la sangre periférica y evitar su llegada al SNC, con el fin de evitar que la respuesta fisiológica a la conducta adictiva surta efecto positivo. Para ello se realiza un conjugado hapteno-proteína. Dicha conjugación promueve las respuestas de anticuerpo potenciadas al motivo, donde el motivo es cualquier sustancia que es capaz de estimular la respuesta inmune por si misma o una vez acoplada. Los motivos incluyen haptenos, antígenos o combinaciones de los mismos. ⁽⁷⁾

Los métodos de análisis que se aplican tanto a la proteína inmunógena como al conjugado deben evaluar su identidad, pureza y actividad. La cromatografía de líquidos de alta

resolución (CLAR) es ampliamente utilizada en el estudio, desarrollo y control de biomoléculas, con fines analíticos, a microescala o preparativos, en procesos de laboratorio o industriales, para purificar diversas sustancias. Existen variantes las cuales se basan en características inherentes al analito, en este caso las proteínas pueden aislarse de acuerdo al tamaño, solubilidad, polaridad, adsorción, y afinidad. La cromatografía de exclusión molecular (CEM) se caracteriza por ser una técnica de separación de biomoléculas basada en el tamaño molecular, al hacer pasar la mezcla a través de una columna con una matriz con esferas porosas a alta presión se consigue la separación de acuerdo con el tamaño molecular, eluirán primero los componentes de mayor masa molecular seguido de los de menor tamaño, la CEM es una técnica rápida, sencilla, confiable, fácil de reproducir, requiere de un equipamiento sencillo, las preparaciones cromatográficas presentan buena resolución y no dependen de factores fisicoquímicos como lo son pH, temperatura y concentración. ⁽⁸⁻⁹⁾

Fundamentación teórica

Técnicas de separación por Cromatografía

Existen muchas técnicas cromatográficas, el objetivo de todas es separar las sustancias que forman una mezcla y enviarlas secuencialmente a un detector para que las determine y cuantifique. Todas se basan en el mismo fenómeno: permitir que las sustancias que forman una mezcla entren en contacto con dos fases. Una de las fases es estática y tenderá a retener las sustancias en mayor o menor grado; la otra, fase móvil, tenderá a arrastrarlas. Cada sustancia química tiene distinta tendencia a ser retenida y a ser arrastrada. Dependiendo de la naturaleza de la fase estática y de la fase móvil se pueden distinguir distintos tipos de cromatografía.

- a) Cromatografía sólido-líquido. La fase estacionaria es un sólido y la móvil un líquido.

- b) Cromatografía líquido-líquido. La fase móvil es líquida y la estacionaria es un líquido anclado a un soporte sólido.

- c) Cromatografía líquido-gas. La fase estática o estacionaria es un líquido no volátil impregnado en un sólido y la fase móvil es un gas.

- d) Cromatografía sólido-gas. La fase estacionaria es un sólido y la móvil un gas.

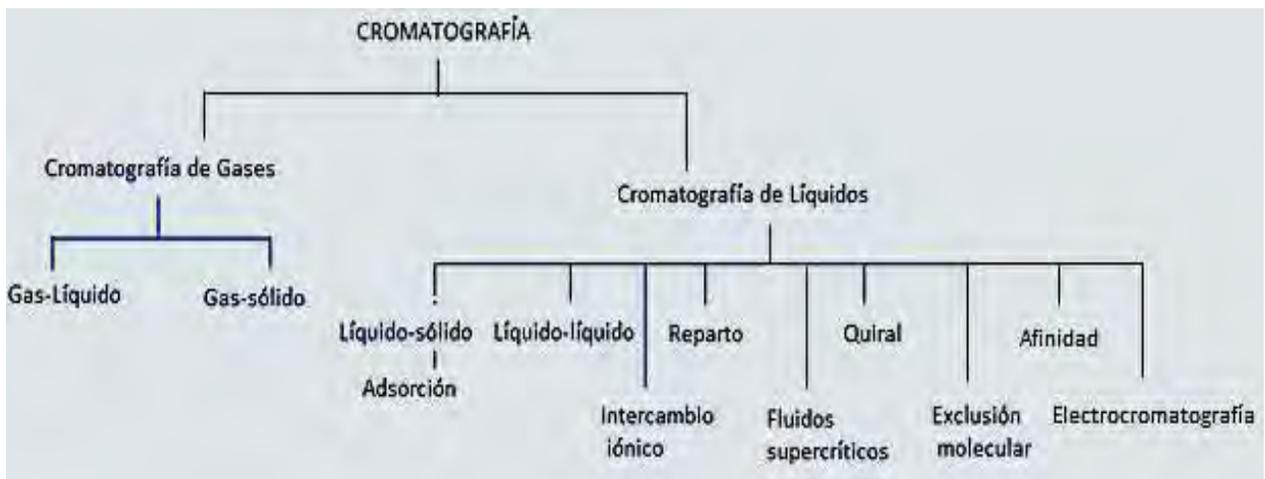


Figura 1. Clasificación de los distintos tipos de técnicas cromatográficas.

Según el tipo de interacción que se establece entre los componentes de la mezcla y la fase móvil y estacionaria podemos distinguir entre.

a) Cromatografía de adsorción. La fase estacionaria es un sólido polar capaz de adsorber a los componentes de la mezcla mediante interacciones de tipo polar.

b) Cromatografía de reparto. La separación se basa en las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla en las fases estacionaria y móvil, que son ambas líquidas.

c) Cromatografía de intercambio iónico. La fase estacionaria es un sólido que lleva anclados grupos funcionales ionizables cuya carga se puede intercambiar por aquellos iones presentes en la fase móvil.

Tabla 1. Tipos de Técnicas cromatográficas.

Tipo	Fase móvil	Fase estacionaria
Cromatografía en papel	líquido	Líquido (moléculas de agua contenidas en la celulosa del papel)
Cromatografía en capa fina	Líquido	Sólido
Cromatografía de gases	Gas	Sólido- Líquido
Cromatografía líquida de fase normal	Líquido (menos polar)	Sólido o líquido (polar)
Cromatografía líquida de inversa	Líquido (polar)	Sólido o líquido (menos polar)
Cromatografía de intercambio iónico	Líquido (polar)	Sólido
Cromatografía líquida de adsorción	Líquido	Sólido
Cromatografía líquida Quiral	Líquido-gas	Sólido
Cromatografía de Afinidad	Líquido	Sólido
Cromatografía de reparto	Líquido	Líquido
Cromatografía líquida de exclusión molecular	Líquido	Sólido
Electrocromatografía	Líquido	Sólido-gel
Cromatografía de fluidos supercríticos	Fluido supercrítico	Sólido

La evolución de la CL ha determinado el desarrollo de nuevas técnicas conocidas como CLAR las cuales tienen una aplicación muy amplia entre las que destacan:

Fármacos: Antibióticos, sedantes esteroides, analgésicos

Bioquímica: Aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos

Productos de alimentación: Edulcorantes artificiales, antioxidantes, aflatoxinas, aditivos

Productos de la industria química: Aromáticos condensados, tenso activos, propulsores, colorantes

Contaminantes: fenoles, Pesticidas, herbicidas, PCB

Química forense: Fármacos de abuso (Drogas), venenos, alcohol en sangre, narcóticos

Medicina clínica: Ácidos biliares, metabolitos de fármacos, extractos de orina, estrógenos.

Separación y purificación de metabolitos en muestras de sangre

Separación y purificación de los metabolitos de fármacos procedentes de muestras de orina

Purificación y separación de enantiómeros

Purificación de compuestos naturales

Purificación y caracterización de enzimas y proteínas

Caracterización por Cromatografía

Actualmente se recomienda el uso de la CLAR, para el análisis de péptidos, oligonucleótidos, proteínas, aminoácidos, así como muchos otros compuestos sintéticos utilizados como principio activo para diversos medicamentos, ya que al emplear una presión elevada para forzar el paso de la fase móvil conteniendo la muestra o compuesto de interés por una columna que contiene partículas muy finas, se consigue así separaciones de gran resolución.⁽⁸⁾ Al obtener una fracción purificada es posible establecer las condiciones cromatográficas para definir un perfil cromatográfico para dicha fracción.

Además de su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en muchos campos de la ciencia.⁽¹⁰⁾

Cromatografía de Líquidos en columna

Los avances en la biotecnología han requerido el uso de técnicas más eficientes para la separación y purificación de biomoléculas. Como su nombre implica, la cromatografía de líquidos (CL), emplea una fase móvil líquida que recorre una fase estacionaria. La gran

ventaja de la CL reside en la combinación de diversas propiedades de las fases móviles con distintas fases estacionarias y diversos detectores. ⁽⁹⁾ La CL ha resultado ser una herramienta muy poderosa y eficiente para separar mezclas complejas, tanto de compuestos de baja masa molecular como de proteínas, péptidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos entre muchos otros compuestos.

En los inicios de la CL se utilizaban columnas de vidrio con diámetros de 1 a 5 cm y longitudes de 50 a 500 cm. Más tarde se encontró que se podía aumentar la eficiencia disminuyendo el tamaño de las partículas de los rellenos. A finales de los años sesenta se logró desarrollar la tecnología adecuada para producir y utilizar partículas del orden de 3 a 30 μm . A esta nueva forma de cromatografía se le llamó cromatografía de líquidos de alta resolución CLAR o HPLC por sus siglas en inglés (High Performance Liquid Chromatography). ⁽¹⁰⁾

Esta evolución en las técnicas cromatográficas es particularmente importante en el campo de la bioquímica y la química analítica para realizar estudios sobre proteínas de interés biofarmacéutico. Avances en las áreas de genómica, proteómica y metabolómica, la biología molecular y del sistema siguen revolucionado el diagnóstico y tratamiento de enfermedades e incrementa nuestra comprensión fundamental de los procesos biológicos. Una posterior evolución de la CLAR ha llevado a utilizar tamaños de partícula aún más pequeños y ha permitido el desarrollo de la Cromatografía de líquidos de ultra resolución (CLUR) y sus siglas en inglés UPLC (Ultra performance liquid chromatography).

Cuando un analito en particular tiene una mayor afinidad con la fase estacionaria que con la fase móvil, se necesitará más tiempo para eluir de la columna y llegar al detector. Esto requiere cierto tiempo, llamado tiempo de retención (T_R), en general es dependiente del

eluyente(s) utilizado, la proporción de disolventes (con un gradiente) y la velocidad de flujo de la fase móvil.

La principal diferencia con CLAR es que en CLUR opera a una presión mucho más alta (alrededor de 1,000 bares), mientras que un CLAR está trabajando hasta 250 bares. Además, la técnica por CLUR también trabaja con un tamaño de partícula más pequeño en la columna, que resulta en una densidad superior, lo que produce mayor resistencia al atravesar la fase móvil. Esto se traduce en mejores separaciones, pero se asocia con tiempos de retención más largos, con el fin de eliminar este efecto se trabaja a una presión mayor que en CLAR. Por tanto al trabajar bajo una presión más alta con una matriz de tamaño de partícula más pequeño se consiguen mejores separaciones con mayor resolución, picos más estrechos y una reducción considerable de cantidad de muestra y sin cambios en los tiempos de retención obtenidos. Estas partículas más pequeñas de tamaño uniforme de diámetro 1.7, 1.8 y 2.5 μm proporcionan una mayor área de superficie de la fase estacionaria dentro de la columna, haciendo que la separación de las sustancias pueda ser eficiente, y con una mejor resolución. El tamaño de partícula más pequeño en el empaque, hace necesario elevar la presión para que las partículas del disolvente y la muestra puedan atravesar la matriz.

Por ejemplo, si se reduce a la mitad el tamaño de partícula, la presión necesaria es 4 veces más grande. La mayor diferencia entre la CLAR y CLUR es que este último utiliza potentes bombas y tubos metálicos para soportar alta presión. Como resultado, se puede alcanzar una presión de 1000 bar utilizando CLUR, esta presión es necesaria para mantener el mismo tiempo de retención.

La CLUR es el resultado de una innovación que llevó al diseño holístico simultáneo de una nueva tecnología de partícula para CL, un nuevo diseño de columna, inyectores, bombas y detectores. La combinación de la mejora de las columnas rellenas de material híbrido con

tamaño de partícula inferior a 2 μm y la capacidad única del sistema CLUR de suministrar la fase móvil a alta presión y con una mínima dispersión, que permite aprovechar al máximo los beneficios de ese nuevo material, produce como resultado picos más estrechos y más concentrados. Los sistemas CLUR aumentan el rendimiento y reducen el consumo de eluyente sin comprometer los resultados analíticos.

Actualmente, se dispone de sistemas CLUR con el objetivo de facilitar mejoras en la resolución y sensibilidad analíticas, que brinden confianza en la consecución de los objetivos sea cual sea la aplicación. Además, utiliza un 95% menos de eluyente que la CLAR es el menor consumo entre todos los sistemas CL actuales. Si el mismo trabajo se realiza con menos instrumentos, significa que la CLUR ahorra energía además de ahorrar eluyente y genera menos desechos. Mejora la responsabilidad e implicación medioambiental reduciendo el espacio necesario, el consumo de eluyente, la generación y necesidad de eliminación de desechos orgánicos y el consumo de energía.

Se ha extendido el uso de CLUR en la última década, gracias a las diversas aplicaciones en varios campos como la química analítica y biotecnología, así como el desarrollo de nuevos materiales para el relleno de la columna que contienen las propiedades de tener un tamaño de partícula uniforme como la sílice y de no expandirse y la opción de utilizarlos en un rango de pH mucho más amplio. Las desventajas de este tipo de métodos de análisis es que se requiere de instrumentos y equipo especializado, las columnas son caras y el personal tiene que estar capacitado para llevar a cabo el proceso. Por lo que, la implementación de esta tecnología no ha sido de fácil acceso, a pesar de los buenos resultados que ha mostrado.

Cromatografía de Líquidos de Fase enlazada

Fase Normal (CFN)

La fase estacionaria es más polar que la fase móvil. Los enlaces de la fase estacionaria tienen momentos dipolo más grande que los enlaces en las moléculas de disolvente. Las fases estacionarias suelen ser polímeros inorgánicos que tienen gran número de poros de tamaño molecular de modo que sus áreas superficiales son grandes. Los dos materiales más comúnmente utilizados son el óxido de silicio hidratado o polímeros de óxido de aluminio hidratado, aunque existen diversos compuestos dependiendo la muestra a separar.

La polaridad de la fase móvil es el principal factor que determina los volúmenes de elución. Cuando los disolventes son más polares, los solutos se desplazan con mayor rapidez y se eluyen más rápido. ⁽¹⁰⁾

Fase Reversa (CFR) ⁽¹¹⁻¹³⁾

Todas las formas de cromatografía de líquidos de fase reversa (CFR) son procesos de migración diferencial, donde los componentes de la muestra son selectivamente retenidos por una fase estacionaria y eluidos secuencialmente mediante el cambio de polaridad de la fase móvil. En la CFR se utiliza un empaque hidrofóbico, usualmente un grupo funcional octadecilo u octilo, aunque existe actualmente una amplia gama de compuestos utilizados como fase estacionaria, y una fase móvil polar.

La fase estacionaria para CFR consiste en una matriz porosa e insoluble a la que se le han unido químicamente compuestos hidrofóbicos. Los soportes para casi todos los rellenos se preparan con sílice rígida, formada por partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros que van de 3 hasta 30 μm .

La sílice presenta las ventajas de resistir la aplicación de altas presiones sin contraerse, y de no expandirse al contacto con los disolventes. Pero tiene la desventaja de ser químicamente inestable; a un pH menor de 2 los ligandos unidos a la sílice pueden ser removidos y a un pH mayor de 7.5, la sílice se solubiliza.

A diferencia de la sílice, las matrices de poliestireno-divinil benceno son muy estables incluso a intervalos de pH que van desde 1 hasta 12, lo cual permite lavar y regenerar la columna con hidróxido de sodio que es el agente más efectivo para la remoción de proteínas fuertemente unidas a la superficie de la fase estacionaria. Además, el poliestireno-divinilbenceno tiene un carácter hidrofóbico por lo que ya no requiere ser derivatizado, evitándose así el inconveniente de procesos ineficientes de unión de ligandos. Sin embargo, presenta la desventaja de expandirse al contacto con los disolventes orgánicos típicamente empleados en CFR.

El acoplamiento de los ligandos a la sílice generalmente se efectúa usando reactivos de tipo clorotrialkilsilanos. En esta reacción, no todos los grupos silanol reaccionan ya que las cadenas alquilo generan un impedimento estérico que impide la derivatización completa de todos los grupos disponibles. Los grupos silanol residuales imparten una polaridad indeseable a la superficie, y son responsables del efecto de retención de modo mixto. Para reducir este efecto, los grupos silanol residuales se hacen reaccionar con compuestos cloroalquilsilanos más pequeños como el clorotrimetil y clorotriethylsilano. A este proceso se le conoce como bloqueo. Por lo general, el grupo alquilo del siloxano en estos recubrimientos es una cadena C8 (n-octilo) o una cadena C18 (n-octadecilo), sin embargo, existen una diversidad de compuestos para cubrir las necesidades de selectividad para cada tipo mezcla en particular.

El mecanismo que se ha propuesto para explicar cómo estas superficies retienen a los solutos es el siguiente: Cuando un soluto se disuelve en agua, las fuerzas de atracción entre las

moléculas de agua se distorsionan o se rompen. Únicamente los solutos altamente polares o iónicos pueden interactuar con la estructura del agua. Los solutos no polares casi no interactúan con estas estructuras y como consecuencia “abandonan” la fase móvil para adsorberse a la parte alifática o aromática de la fase estacionaria. La fuerza motriz de la retención no es la interacción favorable del soluto con la fase estacionaria, sino el efecto de repulsión del disolvente por el soluto.

Cromatografía de Líquidos de intercambio Iónico ^(11,13, 15)

En disolución, una de las causas por las que dos iones se enlazan es la atracción de cargas contrarias. Los sitios con carga negativa alta tienden a retener los protones con más fuerza. Del mismo modo, si se anclan grupos con cargas positivas a una fase estacionaria, atraerán iones de carga opuesta. Estas interacciones se emplean para separar las especies que se eluyen según sus diferencias de carga promedio. Los materiales con fases estacionarias que tienen cargas enlazadas se llaman de intercambio iónico. Se llaman así porque las soluciones iónicas siempre contienen un número igual de cargas negativas y positivas. Los iones del soporte de resina siempre se asocian con algún ion de carga opuesta de la fase móvil. El ion asociado inicialmente con el sitio solo lo deja cuando se intercambia por otro nuevo. Las fases estacionarias formadas por polímeros entrecruzados con cargas negativas fijas se intercambian con iones positivos y se llaman resinas de intercambio catiónico y los polímeros con cargas positivas enlazadas covalentemente sobre ellos intercambian iones negativos y se llaman resinas de intercambio aniónico.

Debido a la dependencia crucial del pH, la fase móvil casi siempre se amortigua a un pH fijo elegido cuidadosamente.

Cromatografía de Exclusión por tamaño Molecular ^(14, 16-19)

La cromatografía de exclusión por tamaño molecular (CEM) es una técnica conveniente y altamente predecible para la separación de mezclas cuyos componentes son suficientemente diferentes en masa molecular. Para moléculas pequeñas, un tamaño diferente de aproximadamente 10% es necesario para obtener una resolución aceptable, para macromoléculas es necesario el doble de la diferencia de su masa molecular.

La CEM se puede utilizar para indicar la complejidad de una mezcla y para proporcionar valores aproximados de peso molecular para los componentes de dicha mezcla. Es una técnica fácil de entender, y puede ser aplicada a la separación de biomacromoléculas delicadas, así como a la separación de polímeros orgánicos sintéticos.

En la CEM especies en disolución se separan sobre la base de su tamaño molecular, que a su vez está relacionado con el logaritmo de la masa molecular.

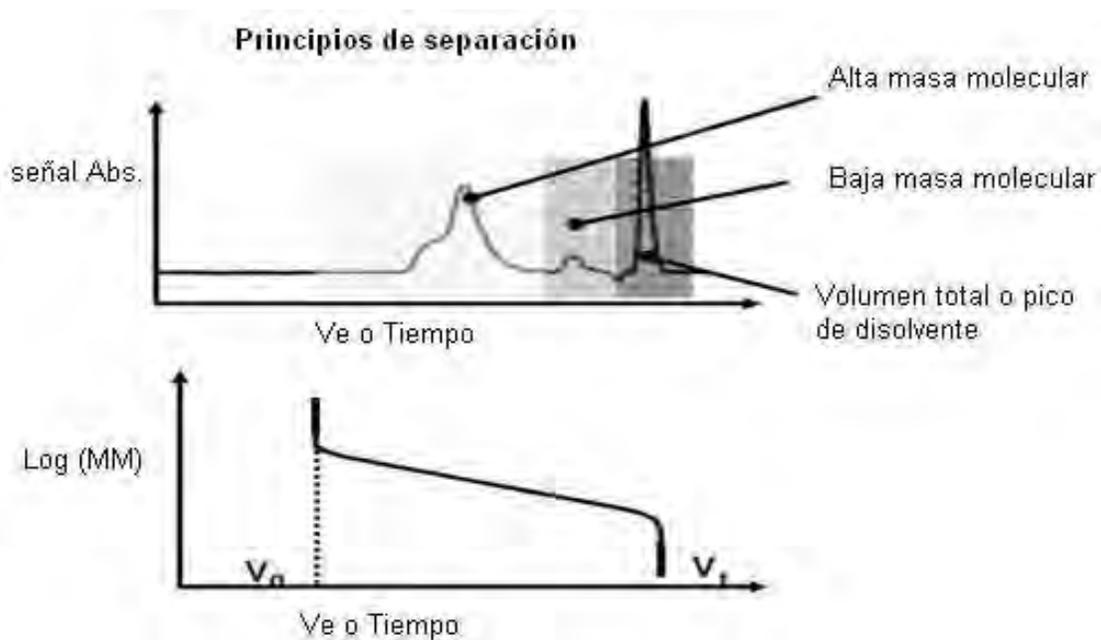


Figura 2. Cromatograma típico en exclusión molecular (arriba). Principio de calibración (abajo). Modificado de la web

Existe una simple relación entre masa molecular y volumen de elución V_e . Arriba del límite de exclusión todos los compuestos son eluidos en el volumen vacío V_0 . Abajo del límite de penetración todos los compuestos son eluidos en el volumen total V_t .

Hay dos tipos de cromatografía de exclusión por tamaño: cromatografía de filtración en gel (CFG) y cromatografía de permeación en gel (CPG). En la CFG, fases móviles acuosas y fases estacionarias hidrofílicas se utilizan para separar e identificar macromoléculas biológicas. Por otra parte, por lo general en CPG se utilizan fases estacionarias hidrófobas y fases móviles orgánicas para obtener información de la distribución de la masa molecular de los polímeros, porque los solutos se eluyen todos dentro de un pequeño volumen de retención, los picos en la CEM están generalmente estrechos, mejorando así la sensibilidad y permitiendo el uso de métodos de detección relativamente poco sensibles tales como índice

de refracción (IR). La detección del IR es particularmente adecuada para la CPG, ya que muchos polímeros no tienen cromóforos u otras propiedades detectables.

Mecanismo de Retención

La fase estacionaria en la CEM es un sustrato altamente poroso cuyos poros pueden ser mejor penetrados por pequeñas moléculas de soluto. Debido a que las moléculas de soluto más grandes no pueden entrar tan profundamente en los poros, son totalmente excluidas de los poros, y se eluyen primero de la columna. Debido a que las moléculas de la fase móvil son generalmente las más pequeñas, son normalmente las últimas en ser eluidas. El resto de las moléculas de soluto se eluyen entre estos dos extremos, a la vez dependen de su capacidad para penetrar en los poros. Como se muestra en la siguiente imagen (Fig. 2).

En la CEM, por lo tanto, a diferencia de otros métodos cromatográficos, la totalidad de la muestra a menudo se eluye antes del tiempo muerto, t_0 , del pico de la fase móvil.

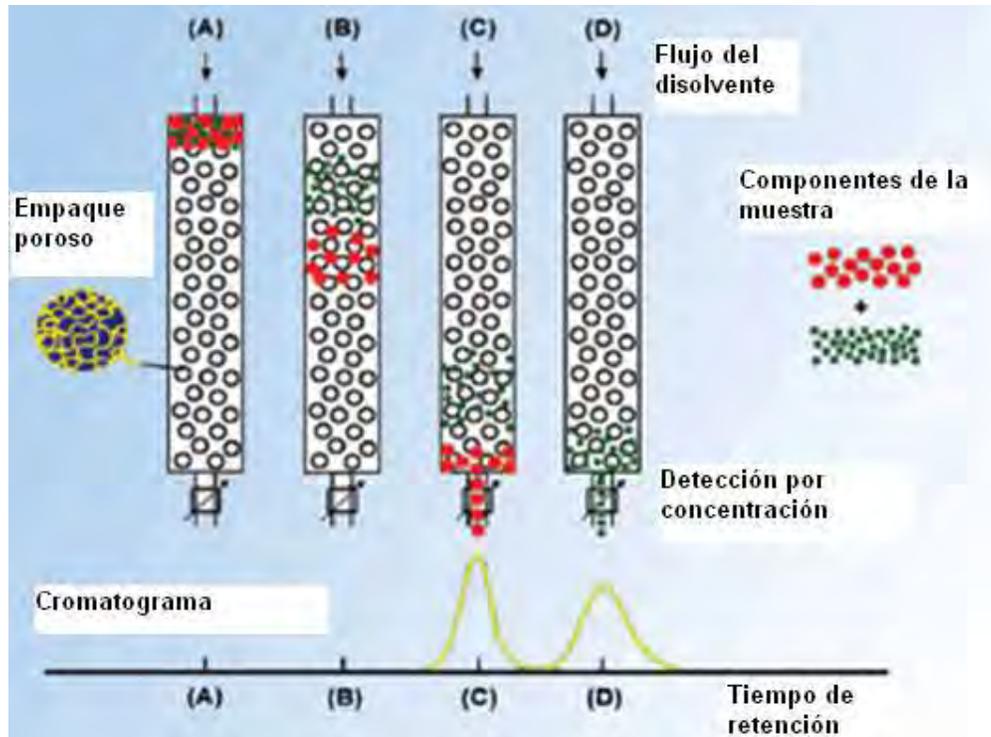


Figura 3. Mecanismo de retención para la separación de una mezcla con componentes de diferente tamaño molecular. Modificado de la web

Fases Estacionarias para Cromatografía de Exclusión por Tamaño Molecular

Hay dos tipos de fases estacionarias para la CEM, un tipo para CFG y la otra para CPG. Las fases estacionarias para CFG son hidrófilas e incluyen polidextrans, gel de alcohol polivinílico, y gel de sílice estos compuestos pueden ser modificados para cubrir con las necesidades particulares para cada análisis específico; las de CPG son hidrófobos y típicamente reticulado, geles rígidos de poliestireno-divinilbenceno o polihidroximetilacrilato, igualmente existen variantes para objetivos particulares de análisis. Generalmente, se utilizan columnas de 50 a 300 mm de longitud, con un diámetro interno entre 0.3 y 8.0 mm, y empaquetado con partículas de entre 3 a 18 μm . En la CEM, a diferencia de otros métodos cromatográficos, la fase estacionaria es el principal factor para controlar la retención.

Al establecer la separación por exclusión de tamaño, la decisión primaria relativa a la fase estacionaria es el tamaño de poro de la columna. La elección de la columna depende del compuesto de interés. Las columnas para CEM están etiquetadas de acuerdo con el límite de exclusión o tamaño de poro, y, para cualquier columna dada, la retención del soluto puede ser representada por un gráfico de tamaño molecular contra el volumen de retención, V_R .⁽¹⁸⁾

La accesibilidad de la muestra a la matriz depende en gran medida del tamaño de poro. Existe un rango amplio para el tamaño de poro en las columnas que son utilizadas para exclusión molecular que va desde 100 hasta 10,000 Å. Las moléculas pequeñas (masa molecular <5.000 Da) se separan mediante columnas con los tamaños de poro más pequeños (100 Å). Una columna que contiene un material con un solo tamaño de poro nominal es capaz de separar un intervalo de masa molecular de aproximadamente dos órdenes de magnitud. Los empaques con tamaños de poro alrededor de 250 Å se usan para la separación de péptidos pequeños y oligonucleótidos. Para macromoléculas se recomiendan tamaños de poro mayores de 300 Å, como para la separación de proteínas, como se mencionó anteriormente, los poros grandes generan mejor resolución para biomoléculas más grandes, en este caso el tamaño máximo de la partícula usada como fase estacionaria es de 10,000 Å.

Para la separación de proteínas grandes hay una preferencia a usar gel de sílice cubierto con grupos hidroxilo hidrofílicos, ya que las biomoléculas no son capaces de intercalarse en los poros de las esferas como lo hacen las moléculas pequeñas; además, no se genera una adsorción tan fuerte de las proteínas y por consiguiente, se requiere menor cantidad de disolvente para la elución, lo cual disminuye el riesgo de desnaturalización de la proteína.

Fases móviles para Cromatografía de Exclusión por Tamaño Molecular

Las fases móviles para CEM se dividen en dos grandes categorías: los tampones acuosos como disolventes en CFG y orgánicos para CPG. En la CEM, se selecciona la fase móvil no para el control de la selectividad, pero si por su capacidad para disolver la muestra. Además, la fase móvil debe tener una viscosidad baja y ser compatible con el detector y relleno de la columna. El gel de sílice puede utilizarse con una amplia gama de disolventes, incluyendo el agua, pero se limita a un rango de operación de pH entre 2 y 7.5 por encima de este valor el gel de sílice es hidrolizado. Todos los disolventes, soluciones amortiguadoras, sales, así como el agua usada para preparar la fase móvil, deben ser de alta pureza química, libre de iones metálicos, así como de partículas suspendidas. La pureza química es importante en la CEM, puesto que cualquier contaminante en la fase móvil puede producir alteración, y contaminar la biomolécula purificada.

Consideraciones Prácticas

Las separaciones isocráticas usan la misma composición de fase móvil a través de la separación. Las eluciones isocráticas se usan cuando la mezcla a separar no es muy compleja o cuando los componentes de la mezcla tienen tiempos de retención muy diferentes.

También es importante elegir la fase móvil para evitar la interacción de los componentes de la muestra con la superficie del relleno de la columna por adsorción u otros efectos no deseados estos efectos no de exclusión por tamaño, por lo general se pueden evitar mediante la selección de combinaciones adecuadas de las fases estacionaria y móvil.

Los factores primarios que afectan a la resolución en la CEM incluyen el volumen de la columna, tamaño de partícula y distribución de tamaño de poro, la velocidad de flujo, y la

conformación del soluto o analito, sin embargo, también deben ser considerados la viscosidad y temperatura de la fase móvil.

La velocidad de flujo tiene un efecto significativo sobre la eficiencia de la columna; un aumento de la velocidad de flujo tendrá resultados en la disminución de la eficiencia. El efecto es mucho mayor para materiales de masa molecular más alta que para los de masa molecular más baja. Debido a tal efecto, las columnas de CEM se operan normalmente a velocidades de flujo bajas, cabe mencionar que la velocidad del flujo depende de las dimensiones y características de la columna. Las proteínas tienen menor difusibilidad que las moléculas pequeñas, por lo que se obtiene una buena eficiencia aún con flujos bajos cercanos a 0.2 hasta 1 ml/min dependiendo de las dimensiones de la columna. La temperatura se aplica por lo general en la CEM para ayudar en la disolución de la muestra o para ayudar a disminuir la viscosidad del disolvente. La viscosidad de la muestra debe ser menor al doble de la fase móvil, o puede resultar el ensanchamiento de los picos y prolongarse el tiempo de elución. Ambos efectos se traducirán en asignaciones erróneas de las masas moleculares, por lo que, siempre que sea posible, la muestra se debe disolver en la fase móvil. La temperatura puede afectar profundamente a la CFG, porque las proteínas se desnaturalizan por un incremento de la temperatura, la estructura de éstas se desdobla y tiene más sitios de interacción con la fase estacionaria, por lo tanto, se incrementa el tiempo de retención.

Componentes básicos de un sistema para CLAR ⁽¹¹⁾

La técnica de Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), al utilizar presiones elevadas para hacer pasar un flujo de fase móvil a través de una columna empacada con partículas micrométricas. Sin la aplicación de presión sería prácticamente imposible que el eluyente pasara a través de la columna.

Dadas las características de una columna de CEM, se requerirá de un equipo de CLAR para realizar la separación. Así que es relevante comentar de forma general cómo está conformado este equipo.

Un equipo de CLAR básicamente debe contar con un sistema de bombeo que impulse el flujo de la fase móvil a través de la columna, una columna que separe los componentes de la muestra, un detector que mida alguna característica de dichos componentes conforme van saliendo de la columna y un procesador que convierta la señal electrónica del detector en un cromatograma.

La figura 3 muestra un esquema de un sistema para CLAR típico; enseguida se explicará brevemente cada uno de los componentes.

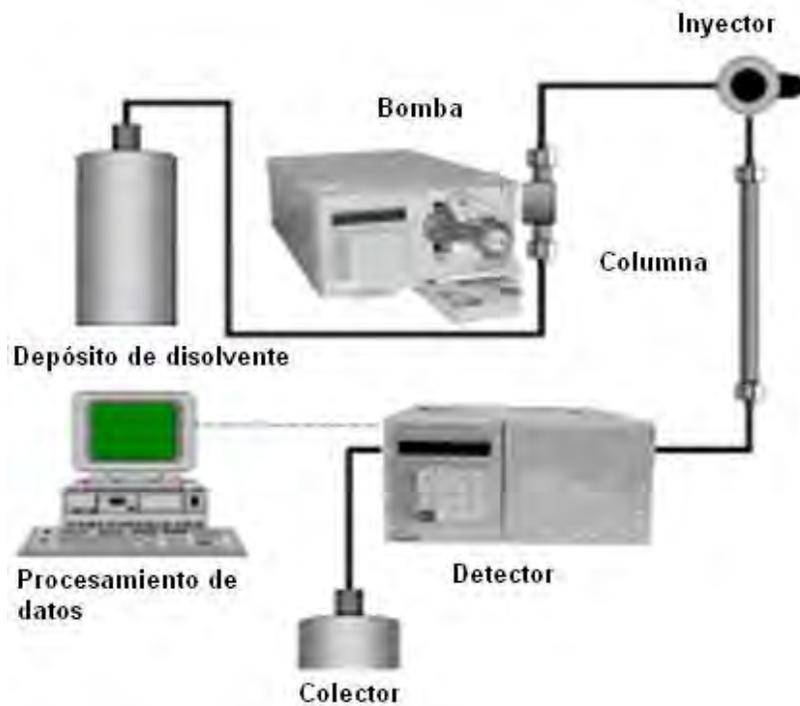


Figura 4. Diagrama básico de un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución. Modificado de la web

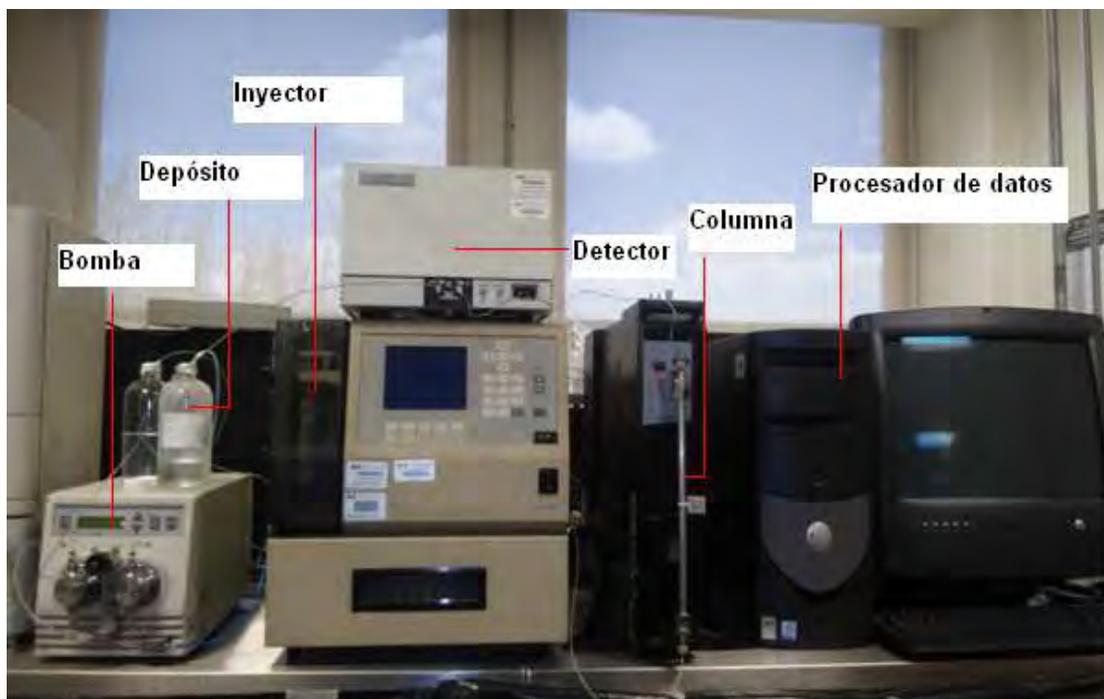


Figura 5. Componentes de un cromatográfico de líquidos de alta resolución. Foto equipo de CLAR-FG en el Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

Sistemas para el tratamiento de los disolventes

Los recipientes que contienen los disolventes a menudo se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos, como oxígeno y nitrógeno, que interfieren formando burbujas en los sistemas de detección.

Un degasificador puede consistir en un sistema de bombeo por vacío, dispositivos para calentar y agitar los disolventes o sistemas de difusión que permiten arrastrar los gases disueltos fuera de la solución mediante finas burbujas de un gas inerte de baja solubilidad.

Para poder hacer eluciones por gradiente, los equipos de CLAR modernos cuentan con recipientes conectados a una mezcladora, lo que permite variar la relación de los disolventes en forma programada y modificar los valores de manera lineal o exponencial.

Sistemas de bombeo

Las bombas utilizadas en el CLAR son muy potentes y precisas. El flujo debe ser libre de pulsaciones y con un flujo que pueda variar entre 0.001 y 30 ml/min, la presión puede ser hasta de 6000psi (lb/pulg²) y todos los componentes deben ser resistentes a la corrosión. Los distintos tipos de bombas dependen del disolvente y tipo de columna que se va a utilizar.

Existen tres tipos de bombas: bombas recíprocas, bombas de jeringa y bombas de presión constante o neumática.

Las bombas recíprocas son las más utilizadas, el 90 % de los equipos de CLAR modernos cuentan con este sistema de bombeo. El disolvente o fase móvil es expulsado de una cámara por el movimiento de vaivén de un pistón accionado por un motor. Las bombas recíprocas tienen la desventaja de que producen un flujo con pulsaciones que se manifiesta como ruido en la línea base del cromatograma. Entre las ventajas de estas bombas se pueden citar su pequeño volumen interno (35 a 400 µl), sus altas presiones de salida (por encima de las 10,000 psi), su fácil adaptación a la elución con gradiente y sus caudales constantes que son prácticamente independientes de la contrapresión de la columna y de la viscosidad del disolvente. Como una parte más del sistema de bombeo está el restrictor colocado a la salida de la bomba. Cualquier diferencia entre la señal y un valor preestablecido, se utiliza para aumentar o disminuir la velocidad del motor de la bomba.

Sistema de inyección de la muestra

A menudo, el factor limitante en la precisión de las medidas en CLAR, es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna. El problema se agrava por el ensanchamiento de banda que acompaña a la sobre carga de las columnas. Por ello, los volúmenes que se emplean han de ser muy pequeños, de entre 0.2-5 µl para CLUR y de 20 µl

hasta 500 μl para CLAR. Además, se ha de poder introducir la muestra sin despresurizar el sistema.

El método más ampliamente utilizado para la introducción de la muestra utiliza dispositivos en forma de bucle, que pueden introducir la muestra a presiones de hasta 7000 psi con una precisión aceptable. El sistema de inyección de la muestra debe estar ajustado al sistema de bombeo de otra forma no funcionará correctamente.

Termostatos

En muchas aplicaciones no se necesita un control estricto de la temperatura y las columnas trabajan a temperatura ambiente. Sin embargo, si se controla la temperatura de las columnas se obtienen mejores cromatogramas, algunas componentes pueden ser lábiles a altas temperaturas por lo que el uso de termostatos está restringido al tipo de muestra. La mayoría de los aparatos lleva hornos que controlan la temperatura de las columnas, estos pueden estar en K, $^{\circ}\text{C}$ o $^{\circ}\text{F}$. Otra forma de controlar con precisión la temperatura es colocando las columnas en camisas con agua que provenga de un baño de temperatura constante.

Detectores

Los detectores en CLAR son de dos tipos básicos. Los detectores basados en una propiedad de la fase móvil que responden a cambios en el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad, las cuales se modifican por la presencia de los analitos y, en contraste, los detectores basados en una propiedad del soluto responden a alguna de las propiedades de la muestra como es la absorción en UV, fluorescencia, actividad óptica, etc. Algunos de estos detectores se describen a continuación.

Detectores de absorbancia

Son los detectores más empleados ya que tanto las proteínas como los ácidos nucleicos absorben luz de esta región. Las longitudes de onda típicamente monitoreadas son: 210 a 280 nm que corresponde a la absorción de la unión peptídica. Se usa principalmente para monitorear péptidos que carecen de aminoácidos aromáticos:

- 228 nm para His
- 240 nm para Cys
- 254 nm para Phe
- 250–260 nm para medir oligonucleótidos
- 280 nm para Trp y Tyr

Los detectores de absorbancia ultravioleta más simples son los fotómetros de filtros con una lámpara de mercurio como fuente. La desventaja que presentan estos sistemas es que el efluente no se puede monitorear a varias longitudes de onda al mismo tiempo, razón por la cual existe un arreglo que utiliza luz blanca como fuente.

Detectores de dispositivo de diodos

Este tipo de instrumentos permiten hacer barridos a distintas longitudes de onda de cada uno de los componentes separados. De esta manera, se generan una colección de cromatogramas a diferentes longitudes de onda de cada pico. El rango de detección va de los 400 nm hasta los 200 nm de longitud de onda.

Mediante los dispositivos de diodos se puede determinar la mejor longitud de onda a la cual absorbe el compuesto de interés.

Detectores de fluorescencia

La fluorescencia puede ser detectada con un monocromador para encontrar emisiones típicas de compuestos presentes en CLAR. Además, permite visualizar las manchas producidas por una CCF si los compuestos o los reactivos de reveladores son fluorescentes. Los detectores de fluorescencia para CLAR son semejantes en diseño a los fluorímetros y espectrofluorímetros. La fluorescencia se detecta por medio de un detector fotoeléctrico colocado perpendicularmente respecto al haz de excitación. Una ventaja de los detectores de fluorescencia es su alta sensibilidad, unas tres órdenes de magnitud mayor a la obtenida por métodos de absorbancia. Esta tecnología es particularmente importante en el campo de la bioquímica y de los estudios sobre proteínas, por ejemplo, en inmunofluorescencia e inmunohistoquímica; o en el análisis de ADN, mediante la técnica de PCR en tiempo real, en perspectiva de la mayoría de compuestos aromáticos.

Detectores de infrarrojo

Particularmente los detectores infrarrojos son dispositivos electrónicos capaces de medir la radiación electromagnética infrarroja de los cuerpos en su cambio de visión. Todos los cuerpos reflejan una cierta cantidad de radiación, esta resulta invisible para nuestros ojos pero no para estos dispositivos electrónicos ya que se encuentran en el rango del espectro justo por debajo de la luz visible.

Una de las mayores limitaciones del uso de detectores de infrarrojo se debe a la interferencia generada por los disolventes que se utilizan. Por ejemplo, las bandas anchas de absorción infrarroja del agua y de los alcoholes impiden prácticamente el uso de este detector para muchas aplicaciones.

Detectores de índice de refracción

Son considerados detectores universales, pues el índice de refracción es una propiedad físico-química de todos los compuestos. Miden las variaciones en el índice de refracción de la fase móvil cuando hay diferentes solutos presentes.

Estos detectores tienen la desventaja de no ser tan sensibles como la mayoría de los otros detectores, por ejemplo, son dos a tres veces menos sensible que un detector de absorbancia. Además, son muy inestables a los cambios de temperatura por lo que se requiere un estricto control de ésta.

La velocidad de flujo proveniente del sistema de bombeo de la fase móvil tiene que ajustarse a la capacidad de la celda del detector, según la calibración del detector para una cantidad de muestra determinada.

Columnas

Como se explicó antes, la separación de los componentes de la muestra se produce en la columna. La mayoría de las columnas para CLAR se construyen con tubos de acero inoxidable o polímeros como el polieterecetona (PEGK) de diámetro interno uniforme. Esta clase de tubos miden entre 50 y 300 mm de longitud. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 0.3 a 8.0 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son de <2 a 18 μm .

Para aumentar la vida de la columna analítica se coloca previamente una pre-columna que elimina la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. La composición del relleno de la pre-columna debe ser semejante al de la columna analítica; sin embargo, el tamaño de la partícula es por lo común mayor para minimizar la caída de presión.

Tipos de relleno de la columna

Existe una gran variedad de compuestos utilizados para la matriz o relleno de las columnas, este se elige de acuerdo con la muestra que se vaya a analizar y se busca que sea lo más selectivo para el compuesto de interés. Los rellenos de partículas porosas para CLAR están formados por micro partículas porosas con diámetros entre 2-10 μm y con la menor dispersión posible para un tamaño determinado. El gel de sílice es el material más comúnmente empleado en columnas para exclusión molecular para este tipo de columnas, debido a que se pueden producir partículas con diámetros muy uniformes.

Actualmente los sistemas cromatográficos pueden ser adquiridos por módulos de manera que se puede disponer de arreglos en los componentes del cromatógrafo de acuerdo con las necesidades y características de la muestra y tipo de análisis particular. De tal forma que se puede configurar el sistema a conveniencia del analista.

Parámetros cromatográficos generales⁽¹³⁾

Se mencionan a continuación los parámetros más utilizados en cromatografía y con fines estadísticos.

El comportamiento de retención de un compuesto refleja la distribución del soluto entre la fase móvil y la estacionaria. La concentración en cada fase está dada por el coeficiente termodinámico de repartición. Cuando $K = 1$, el soluto se encuentra igualmente distribuido entre las dos fases.

$$K = []_E / []_M$$

Donde $[]_E$ y $[]_M$ son las concentraciones de soluto en la fase estacionaria y la fase móvil respectivamente.

Factor de capacidad (k')

La razón de reparto o razón de capacidad, k' , relaciona el equilibrio de distribución de la muestra dentro de la columna, es decir, es la relación del tiempo transcurrido en la fase estacionaria contra el tiempo transcurrido en la fase móvil. Matemáticamente se define como el cociente de los moles de un soluto en la fase estacionaria entre los moles en la fase móvil:

$$k' = \frac{[]_E \times V_E}{[]_M \times V_M}$$

El factor de capacidad puede ser calculado para cada pico utilizando la siguiente relación:

$$k' = \frac{T_R - t_0}{t_0}$$

Donde T_R es el tiempo de retención de la muestra y t_0 es el tiempo de retención de un soluto que no interactúa con la fase estacionaria, también conocido como tiempo muerto. El tiempo de retención transcurre desde la inyección de la muestra hasta que el compuesto alcanza el detector. El primer componente eluido deberá tener un tiempo de retención del doble del tiempo muerto.

Dicho de otra manera, la razón de reparto es el tiempo adicional que un soluto requiere para eluir, en comparación con un soluto no retenido, para el cual $k' = 0$.

La fase móvil seleccionada debe dar valores de k' que estén en el rango de 1 a 20. Valores mayores de k' generan tiempos de retención largos que resultan en tiempo analítico desperdiciado; y los valores menores que la unidad no proporcionan una resolución adecuada entre los solutos.

Los disolventes fuertes proveen pequeños valores de k' , mientras que los solventes débiles dan valores de k' más altos. Se ha visto que por cada 2 unidades de diferencia en el valor de polaridad de una mezcla de disolventes, el factor de capacidad k' cambia un orden de

magnitud aproximadamente, lo que significa que la retención del compuesto en una columna particular puede variarse simplemente mediante la modificación de los solventes de la fase móvil.

Eficiencia (N)

Una característica importante de un sistema cromatográfico es su eficiencia, expresada como una cantidad adimensional llamada número de platos teóricos. El término “plato teórico” proviene de un estudio teórico en el que se trató a una columna como si estuviera constituida de numerosas, discretas y contiguas capas denominadas platos teóricos. Refleja el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases durante su paso a través de la columna. Entre más grande sea el número de platos teóricos de una columna, mayor será su eficiencia y por tanto se podrá lograr una mayor resolución.

La eficiencia de una columna puede determinarse a partir de un pico del cromatograma mediante la siguiente ecuación:

$$N = 5.54 \left(\frac{T_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

Donde T_R es el tiempo de retención del pico y $W_{1/2}$ es ancho del pico medido a la mitad de la altura del mismo.

El número de platos teóricos puede ser reportado como platos por metro de columna. En la siguiente expresión, la altura equivalente a un plato teórico H está dada por la ecuación:

$$H = \frac{L}{N}$$

Dónde: L es longitud de columna y N es el número de platos teóricos.

La eficiencia depende principalmente de las propiedades físicas de la matriz y de la columna. La eficiencia mejora mucho al disminuir el diámetro de la columna, al aumentar su longitud y al reducir el tamaño de partícula del empaque o al bajar la viscosidad del disolvente o fase móvil.

Selectividad (α)

La selectividad se refiere a la capacidad del método para distinguir las propiedades de los componentes a nivel molecular y que permite diferenciarlos. Es importante determinar las características de la molécula que nos permitirán separarla, ya sea masa molecular, carácter ácido base, polaridad, tamaño, actividad bioquímica, óptica, etc.

La selectividad (α) es equivalente a la retención relativa de los picos de la muestra y está dada por la siguiente expresión:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{Vr_2}{Vr_1}$$

Donde Vr_1 y Vr_2 son los volúmenes de retención, k'_1 y k'_2 son los factores de capacidad para los picos 1 y 2 respectivamente.

Resolución (R)

La resolución de una columna constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos solutos. Los parámetros que contribuyen en la resolución (R) de los picos son la selectividad (α), la eficiencia o número de platos teóricos (N) y el factor de retención k' .

Estos parámetros se relacionan en una ecuación de la siguiente manera:

$$R = \frac{(\alpha-1)}{4\alpha} (\sqrt{N}) \frac{k'}{(1+k')}$$

Para mejorar la resolución de una columna se pueden variar cada uno de los siguientes parámetros:

(k'): es el elemento más manipulable debido a que depende de la polaridad de la fase móvil.

Para una resolución óptima, k' debe estar en el intervalo entre 2 y 5.

(N): los platos teóricos se incrementan aumentando la longitud de la columna. Sin embargo, una consecuencia adversa es un incremento del tiempo necesario para la separación. La relación entre N y R está definida por el cuadrado de N . Por ejemplo, un incremento en el número de platos teóricos N de 100 a 625 aumentará la resolución por un factor de 2.5 y no por uno de 6.25. Otra forma de mejorar la resolución consiste en reducir la altura de los platos lo cual puede conseguirse disminuyendo el tamaño de partícula del relleno o bajando la viscosidad del disolvente.

(α): implica modificar las características químicas del relleno de la columna.

Parámetros para cromatografía de exclusión molecular ^(16,18,19)

Es fácil determinar los volúmenes de elución (V_e) desde los picos simétricos en filtración en gel, sin embargo, el V_e no define completamente el comportamiento de la muestra, ya que V_e varía con el volumen total (V_t) y la manera en que es empaquetada la columna. La elución de una muestra es mejor caracterizada por el coeficiente de distribución (K_d)

El volumen vacío (V_0) es igual al volumen de elución de moléculas que permanecen en el buffer porque son mayores que los poros más grandes de la matriz y pasan directamente a través de ella. En una columna bien empaquetada el V_0 es aproximadamente el 30% del V_t de la columna.

El volumen de la fase estacionaria (V_E) es el volumen del buffer dentro de la matriz que está disponible para moléculas muy pequeñas. El V_e de moléculas que se distribuyen libremente entre la fase móvil y la estacionaria menos el V_0 . Donde en la práctica el V_E es difícil de determinar, es más conveniente sustituirlo por el término $(V_t - V_0)$. El volumen estimado de la fase estacionaria, por lo tanto, incluye el volumen del material sólido que forma la matriz.

K_d representa la fracción de la fase estacionaria que está disponible por difusión de una especie molecular dada. La fase estacionaria puede ser sustituida por el término $(V_t - V_0)$ para obtener el valor de $K_{promedio}$.

$$K_{promedio} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

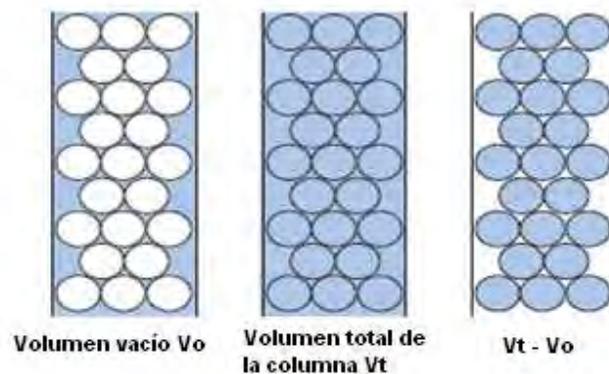


Figura 6. Volumen vacío. (V_0) Volumen total de la columna. (V_t) Volumen de las esferas. (V_e)

Donde $(V_t - V_0)$ incluye el volumen de la matriz que es inaccesible a todos los solutos, $K_{promedio}$ no es un verdadero coeficiente de partición. Sin embargo, para un medio dado hay una razón constante de $K_{promedio} : K_d$ que es independiente de la naturaleza de la molécula o su concentración. $K_{promedio}$ es fácilmente determinada y, como K_d , define el comportamiento de la muestra independiente de las dimensiones de la columna y del empaque.

Curva de Selectividad y medios de selección

El K_{promedio} está relacionado con el tamaño de la molécula. Moléculas de forma y densidad similares mostraron una relación sigmoidea entre sus valores de K_{promedio} y el logaritmo de la masa molecular. Por tanto, existe una relación lineal entre K_{promedio} y el log MM en un intervalo definido. La selectividad de un medio por filtración en gel depende únicamente de la distribución y tamaño de poro y, es descrita por una curva de selectividad. Graficando K_{promedio} contra el log (MM) para un conjunto de proteínas estándar, la curva de selectividad es creada para cada medio de filtración. Como se observa para en la siguiente figura.

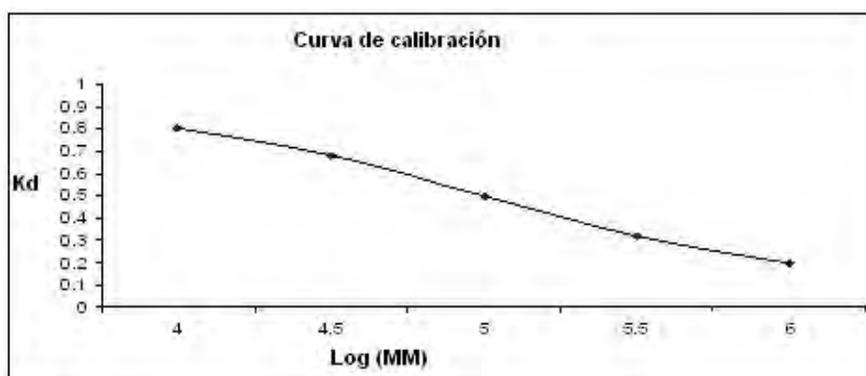


Figura 7. Ejemplo de una curva de calibración para una columna de exclusión por tamaño molecular

El medio de filtración en gel debería ser seleccionado de modo que las moléculas de alta masa molecular sean eluidas en el volumen vacío ($K_{\text{promedio}} = V_0$) con un pico de anchura mínima y mínimo tiempo en la columna. Y las sustancias de menor masa molecular deberían eluir cerca de V_t ($K_{\text{promedio}} = 1$).

Resolución (R)

La resolución final es el grado de separación entre picos, es influenciado por muchos factores: como el volumen de la muestra, el volumen de la columna, la velocidad de flujo, las dimensiones de la columna, tamaño de la partícula, la distribución del tamaño de la partícula, la densidad del empaque, la porosidad de la partícula y la viscosidad de la fase móvil. El éxito de la filtración en gel depende de las condiciones elegidas inicialmente que dan la selectividad y contrarrestan los efectos del ensanchamiento de picos durante la separación.

La resolución es definida por la siguiente ecuación:

$$R = (V_{r2} - V_{r1}) / \frac{1}{2}(W_1 + W_2)$$

Dónde: V_{r1} y V_{r2} son los volúmenes de elución de dos picos adyacentes medidos por el centro del pico. W_1 y W_2 los anchos de los picos respectivamente a 4 unidades σ .

$(V_{r1} - V_{r2})$ representa la distancia entre los picos y $\frac{1}{2}(W_1 + W_2)$ mide la anchura de dos picos.

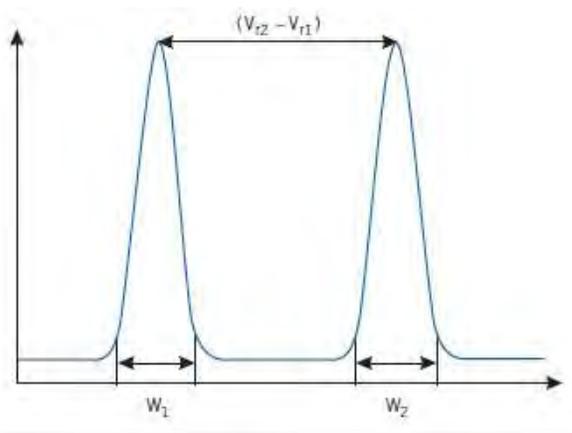


Figura 8. Ilustra cómo se realiza la medición de los parámetros que definen la resolución. (R_s)

La resolución es función de la selectividad del medio y este produce el pico estrecho (mínima anchura del pico).

La eficiencia del empaque de la columna define la capacidad de producir picos estrechos y simétricos durante la elución. La eficiencia es particularmente importante en filtración en gel en el cual la separación se lleva a cabo, con solo un volumen de buffer que pasa a través de la columna. La eficiencia es definida por el número de platos teóricos por metro (N).

$$N=5.54 (V_e/W_{1/2})^2 \times 1000/L$$

Dónde: V_e : es el volumen de elución del pico. $W_{1/2}$: el ancho del pico medido por la mitad (2.36σ). L: es la longitud de la columna (mm). V_e y $W_{1/2}$ están en unidades de volumen.

Análisis cuantitativo

La cromatografía también puede proporcionar información cuantitativa acerca de las especies separadas, lo cual le da un impacto de aplicación aún mayor a esta técnica. La cuantificación se basa en la comparación del área del pico del compuesto problema con las de uno o más estándares.

Los instrumentos cromatográficos están equipados con integradores electrónicos digitales, los cuales permiten una precisa estimación de las áreas de pico.

Existen cuatro técnicas principales para la cuantificación: normalización de área, calibración con estándar interno o externo, y la adición de estándar.

Normalización de área

El área de los picos se reporta como un porcentaje de área total. Ésta técnica es muy empleada para estimar las cantidades relativas de impurezas en una muestra; la desventaja es que asume que todos los componentes tienen el mismo nivel absorción a la longitud de onda que se monitorea.

Calibración con estándar externo

Implica preparar soluciones del estándar con una concentración conocida. Se inyecta el mismo volumen de cada solución y se construye una curva de calibración en función de la concentración y las áreas de pico. La concentración de los estándares debe ser parecida a la concentración que se espera para las muestras. Las muestras de concentración desconocida se preparan, inyectan y analizan de la misma manera. La concentración de las muestras se obtiene a partir de la curva de calibración.

A este método se le llama estándar externo porque los estándares se analizan en cromatogramas separados de las muestras.

Calibración con estándar interno

Consiste en la adición de un compuesto diferente al analito a cada una de las soluciones que se van a analizar. Se analizan soluciones de muestra de diferentes concentraciones a las que se ha añadido la misma cantidad de estándar interno.

Requerimientos para un estándar interno:

- Tener buena resolución ($R > 2$)
- k' similar al compuesto problema
- El compuesto que se utilice como estándar interno no debe estar presente en la muestra original
- Que tenga alto grado de pureza

Adición de estándar

Este método se usa para análisis de trazas. Diferentes cantidades del analito que se desea medir se adicionan a la solución problema, la cual contiene una concentración desconocida de

analito. A la cuantificación total se le resta el valor de la cantidad adicionada; de esta manera se puede calcular la concentración desconocida.

Determinación de la masa molecular

La determinación de la masa molecular por filtración en gel se puede hacer por la comparación de los parámetros de volumen de elución, tal como K_{promedio} de la sustancia de interés, con los valores obtenidos de varios estándares conocidos en la calibración.

Una curva de calibración se prepara por la medición de los volúmenes de elución de varios estándares, calculando sus valores de K_{promedio} correspondientes, y trazar los valores de K_{promedio} contra el logaritmo de sus masas moleculares. La masa molecular de una sustancia desconocida puede ser determinada, por la curva de calibración una vez que el valor de K_{promedio} es calculado por la medición del V_e .

Para la determinación exacta de la masa molecular, debe tener la misma relación entre masa molecular y tamaño molecular que la sustancia de interés.

Método de calibración para determinación de la masa molecular

Preparar una nueva disolución filtrada de azul dextran 2000 kDa (1.0 mg/ml) en la disolución amortiguadora. Aplique azul dextran a la columna usando un volumen $<2\%$ del V_t para determinar el V_0 , y comprobar el relleno de la columna.

Disolver las proteínas seleccionadas para la calibración en el buffer de corrida (a la concentración recomendada por el fabricante). Permita unos minutos para la disolución, y agite suavemente, no caliente o agite vigorosamente. Si es necesario filtre la solución de calibración.

Aplicar la solución de calibración a la columna, en un volumen de $<2\%$ del V_t .

Determinar los V_e para los estándares, por la medición del volumen eluyente por el centro de los picos.

Calcular los valores de K_{promedio} para los estándares y grafique la curva de calibración de K_{promedio} contra el log MM con la siguiente ecuación: $K_{\text{promedio}} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ donde: V_e es el volumen de elución de la proteína. V_0 es el volumen vacío = volumen de elución del azul dextran 2000 kDa. V_t volumen total de la columna.

Graficar sobre papel semilog, trazar los valores de K_{promedio} para cada estándar de proteína contra los valores de las masas moleculares correspondientes (sobre la escala logarítmica). Dibujar una línea recta que una mejor los puntos sobre el gráfico. La alternativa es usar un paquete estadístico y calcularlo por regresión lineal.

Aplicar la muestra en un volumen $<2\%$ del V_t y determine el V_e para la molécula de interés.

Calcule el valor de K_{promedio} para el componente de interés y determine su masa molecular por interpolación mediante la curva de calibración.

Farmacología de los compuestos opiáceos ⁽²³⁻²⁵⁾

Los opiáceos son los compuestos alcaloides derivados del opio. El opio es el jugo de la corteza de las cápsulas verdes de la adormidera o *Papaver somniferum*. Contiene gran cantidad de principios activos los más importantes son morfina, codeína, tebaina, narcotina y papaverina. En 1806, el químico alemán Friedrich Serturner consiguió aislar el principal elemento del opio en su forma pura y que llamó morfina (se muestra la estructura química de la morfina Figura 7 izquierda).

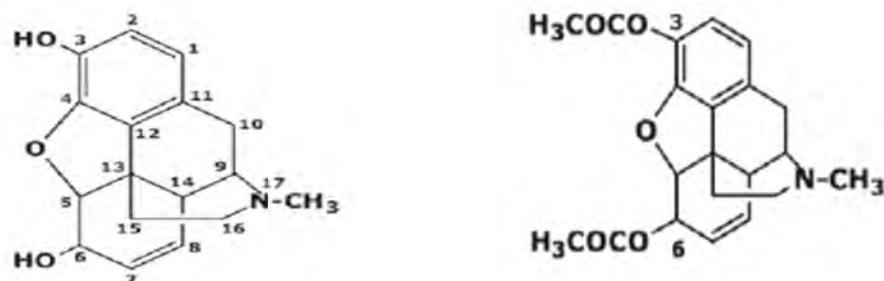


Figura. 9 Estructuras químicas de la morfina y heroína, respectivamente. Tomado de Antón y cols., 2009.

Tras mínimas alteraciones químicas se pudieron obtener opiáceos semi-sintéticos. Uno de estos compuestos análogos es la heroína cuya modificación a la estructura de la morfina (Fig. 7 derecha) dio como resultado una sustancia con un potente efecto analgésico y placentero, convirtiéndola en una sustancia de abuso por su alto potencial adictivo. Desde hace 50 años, es posible obtener sustancias completamente sintéticas, casi sin relación química con la morfina, pero con el mismo efecto. A menudo se utiliza el término opiáceo en vez de opioide. No obstante el término opiáceo se refiere al origen de la sustancia con respecto al opio, es decir, son sustancias que se extraen de la cápsula de la planta del opio. Por extensión, se denominan también así los productos químicos derivados de la morfina. El término opioide se utiliza para designar aquellas sustancias endógenas o exógenas que se caracterizan por poseer afinidad selectiva por los receptores opioides, causando analgesia de elevada

intensidad, por lo que presentan un efecto análogo al de la morfina y poseen actividad intrínseca.

Hughes describió en 1975 los péptidos del cuerpo humano que tenían efectos similares a la morfina. Los opioides actúan como estos péptidos endógenos, denominados también endorfinas. Los péptidos opioides endógenos y las moléculas opioides, reaccionan en la misma posición en los receptores específicos de la superficie de células nerviosas y de células del músculo liso del intestino.

Los analgésicos opiáceos tienen sitios de reconocimiento específicos, que se denominan receptores opioides. Estos receptores son utilizados por péptidos opioides endógenos. Los más importantes son la β -endorfina, la Met encefalina, la Leu encefalina y Dinorfina. Estos péptidos son capaces de ocupar selectivamente los receptores opioides y de inducir las acciones farmacológicas propias de la morfina. ⁽²⁵⁾

Tanto los opioides endógenos como los fármacos opiáceos pueden interactuar con diversos tipos de receptores.

La acción de los derivados del opio es la analgesia. A nivel del SNC hay modulación de la respuesta dolorosa. Desde la corteza parten fibras descendentes que hacen escala donde lo hacen las ascendentes para disminuir la respuesta dolorosa. La analgesia es consecuencia de la acción de los péptidos opioides sobre los receptores situados en diversos puntos del SNC.

Clasificación de los compuestos opiáceos

Agonistas puros: actúan como agonistas de los receptores. El más significativo es la morfina. Otros son la codeína, la heroína, la metadona, la meperidina y el fentalino.

Agonistas parciales: tienen afinidad por un receptor, pero su acción intrínseca es menor que la morfina. Son analgésicos cuando se administran solos, pero antagonizan los efectos de un agonista puro. Un agonista parcial es la buprenorfina.

Agonistas - antagonistas mixtos: bloquean (antagonistas) receptores μ y agonistas de κ . Por ejemplo nalorfina, pentazocina, butorfanol y nalbufina

Antagonistas puros: Se unen a su receptor, pero no muestran actividad intrínseca, e impiden o revierten la acción de los agonistas, además carecen de efectos analgésicos. Estos fármacos bloquean los receptores. Los constituyen la naloxona y la naltrexona.

Los ligandos de receptores opioides son sustancias que se unen específicamente a los receptores opioides. Una vez unidos al receptor desarrollan un efecto que se denomina actividad intrínseca, y por esta razón son sustancias denominadas agonistas. Los ligandos de receptores opioides que se unen al receptor, pero no desarrollan efecto alguno, carecen de actividad intrínseca y se denominan antagonistas opioides.

Los opioides naturales y sintéticos, así como los péptidos opioides endógenos, se unen específicamente y con gran afinidad a los receptores opioides. Los receptores opioides se localizan frecuentemente en la porción final del axón pre sináptico de la célula nerviosa y modulan la liberación de los neurotransmisores al inhibir la entrada en funcionamiento del potencial de acción, con lo que disminuye la cantidad de sustancia transmisora liberada. El efecto de este receptor opioide es muy marcado en las células nerviosas que transmiten el dolor, donde la liberación de la sustancia transmisora del dolor o sustancia P se inhibe, lo que explica el efecto analgésico sobre los transmisores receptores opioides. Los diferentes opioides se unen con más o menos fuerza a los diferentes tipos de receptores de opioides: μ (μ), delta (δ) y kappa (κ). Los opioides preferidos por los adictos y con un mayor efecto analgésico son los que actúan particularmente sobre el receptor μ .

La actividad intrínseca relativa (AIR) se define como la capacidad de los ligandos para producir un efecto determinado en un receptor. La morfina y la metadona tienen la misma especificidad por el receptor opioide y como agonistas puros tienen el valor máximo de AIR. En principio producen el mismo efecto. Las diferencias subjetivas en lo que se refiere a su eficacia, se explican a través del comportamiento farmacocinético que es distinto para cada sustancia, en la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, en la distribución por los diferentes compartimentos (sangre, tejido cerebral, órganos internos) y finalmente en el metabolismo y la excreción.

Cuando hablamos de farmacocinética, nos referimos a las variaciones de las concentraciones plasmáticas en función del tiempo, en el lugar del efecto. El curso temporal de la concentración depende de la absorción de la sustancia, la distribución en el organismo, el metabolismo y la eliminación. La absorción y la distribución determinan la presencia del fármaco en el lugar del efecto. El abandono del fármaco del lugar de acción está prácticamente determinado por el metabolismo y la eliminación.

La biodisponibilidad, es la entrada en el torrente sanguíneo, varía según la vía de administración. Esto es así principalmente para sustancias con un alto efecto de first pass, es decir, el conjunto de modificaciones que sufre la sustancia administrada antes de llegar al torrente circulatorio. Los opioides utilizados por los pacientes producen efectos similares, aunque presentan diferente farmacocinética. Las diferencias percibidas subjetivas y objetivas, se basan en diferencias en la concentración plasmática en función del tiempo. Este efecto, como dijimos, depende de las formas de consumo, donde el consumo intravenoso tiene un efecto a los pocos segundos y el oral aproximadamente media hora.

Los términos vida media y acumulación son importantes para comprender los diferentes transcurso de los efectos de los opioides. La vida media de eliminación es el tiempo

necesario para que una determinada concentración de un fármaco se reduzca a la mitad, tras un proceso de metabolismo y/o excreción. El tiempo de vida media efectivo es el tiempo en el que la dosis de un fármaco llega al 50% de la concentración plasmática y produce sólo la mitad del efecto. Cuando una sustancia se consume reiteradamente y el intervalo de administración es muy corto, la sustancia sufre acumulación en el organismo, se incrementan sus efectos y su toxicidad. Por ejemplo, la heroína tiene una vida media corta, y la metadona tiene una vida media larga y se acumula en administraciones diarias repetidas. Las sustancias de acción rápida acceden al lugar de acción rápidamente y cuando los opioides alcanzan rápidamente y a altas concentraciones dicha localización, los adictos sienten con respecto a otras drogas y presentes en su organismo, un gran placer llamado flash. El flash no es un efecto absoluto, sino que depende de la percepción del cambio relativo del efecto. Con las inyecciones intravenosas y ciertas técnicas de inhalación es posible conseguir un flash. Los patrones de consumo están condicionados no sólo por la cinética y dinámica del fármaco, sino también por las influencias culturales (modas), sociales, la disponibilidad u oferta, y variables individuales (motivaciones, enfermedades, etc.)

Es importante tener en cuenta la relevancia de los conceptos farmacológicos básicos que hemos expuesto. Como ya hemos dicho, el inicio del efecto de un fármaco depende en gran medida de cómo se consume la sustancia en cuestión. Por el contrario, la duración del efecto, es principalmente una propiedad de la sustancia.

Tratamientos para la Adicción

Desde el enfoque clínico, el tratamiento que se da a pacientes adictos a morfina y heroína como a otras sustancias adictivas consta de dos fases:

En la primera, el sujeto adicto tendrá que ser sometido a un tratamiento de desintoxicación, en donde se sustituye el uso de la droga adictiva por un fármaco que genere efectos similares

pero con menor potencia farmacológica (terapia de sustitución); posteriormente, después de un periodo de interrupción en el uso de la terapia de sustitución, al sujeto adicto se le somete a un tratamiento encaminado a mantener la abstinencia por largo periodo de tiempo y evitar las recaídas en el consumo de la droga. El principal tratamiento de la adicción a la heroína ha sido la metadona, un agonista parcial opiáceo sintético el cual bloquea el efecto de la heroína y elimina los síntomas del síndrome de abstinencia por un periodo de 24 a 36 horas. Los preparados de heroína (o morfina) que tienen una vida media corta en comparación con la metadona, causan un efecto perceptible que dura todo el día. No se atenúan permanentemente los sentidos de alerta, ni la libido o la potencia sexual. La diferencia subjetiva entre un estado de equilibrio y un efecto perceptible que dura todo el día es realmente grande.

Sin ninguna duda sería mejor no consumir opiáceos, pero muy pocas personas adictas a ellos han conseguido dejar de consumirlos. Una prescripción diversificada de opiáceos presenta ventajas clínicas para el tratamiento de los adictos. Podríamos decir que la atracción de cierta forma de consumo de un opiáceo para un adicto, reside en la rapidez de producir su efecto y en la vida media del fármaco. Con sustancias que no provocan rápidamente un efecto, como la metadona, se puede captar a un enorme número de adictos a los opiáceos para iniciar un tratamiento y se puede evitar, en parte, que acudan al mercado ilegal. El deseo de opioides se mitiga con la metadona oral porque no se aprecian los síntomas del síndrome de abstinencia. Sin embargo su atractivo es limitado, porque el recuerdo de otros efectos de reforzamiento secundarios, como el flash tras la inyección, y los deseos y necesidades que llevaron a la adicción siguen vivos. Aunque la terapia sustitutiva ha sido solo ligeramente eficaz, había sido la única opción disponible para muchos adictos a la heroína. Sin embargo, la terapia de sustitución solo es utilizada por un tiempo ya que genera severos efectos secundarios y en el caso de la metadona genera en principio dependencia y a largo plazo adicción. Se ha

reportado que la metadona, la buprenorfina y la pentazocina producen trastornos del sueño, ansiedad y deterioro emocional. Otros fármacos actualmente utilizados para prolongar la abstinencia y la prevención de recaídas contra la adicción a morfina / heroína en pacientes desintoxicados comprenden los antagonistas del receptor μ como la naloxona y naltrexona, en ellos los efectos secundarios tóxicos son observados durante la administración a largo plazo de estos compuestos, debido al bloqueo del sistema opioide endógeno (encefalinas y endorfinas) en el cerebro, causando importantes efectos emocionales negativos ⁽²⁵⁾. Por lo que a la fecha actual no hay evidencias de que estas terapias funcionen a largo plazo y de que los adictos no tengan recaídas.

En conclusión, debido al poco éxito que han tenido estos fármacos y al gran número de efectos tóxicos colaterales que presentan, desde los años 70's se han venido desarrollando nuevas alternativas para el tratamiento contra dicha adicción, un ejemplo de ello es la inmunoterapia, que consta de la inmunización activa del paciente, teniendo como ventaja efectividad a largo plazo y menos efectos secundarios. ⁽²⁵⁾

Proteínas: composición y estructura ⁽²⁶⁻²⁹⁾

Las proteínas son los principales polímeros estructurales y funcionales de los seres vivos. Las proteínas y los péptidos son biomoléculas formadas por cadenas lineales de L-alfa-aminoácidos en enlace peptídico que, al plegarse forman cuatro niveles estructurales. Estas complejas macromoléculas son imprescindibles para el funcionamiento y desarrollo de

cualquier organismo, y realizan una enorme cantidad de funciones distintas, entre las que destacan:

- Estructura celular y de los tejidos. Esta es la función más importante de una proteína
- Contracción muscular y motilidad celular
- Catalizadores biológicos (enzimas)
- Homeostática: colaboran en el mantenimiento del pH (ya que actúan como un tampón químico). Moléculas reguladoras (hormonas)
- Defensas Inmunológicas (anticuerpos, componentes del complemento)
- Coagulación sanguínea
- Transmisión nerviosa, y transporte de vitaminas, minerales y oxígeno entre otros.

LOS AMINOÁCIDOS SE PUEDEN UNIR POR ENLACES PEPTÍDICOS

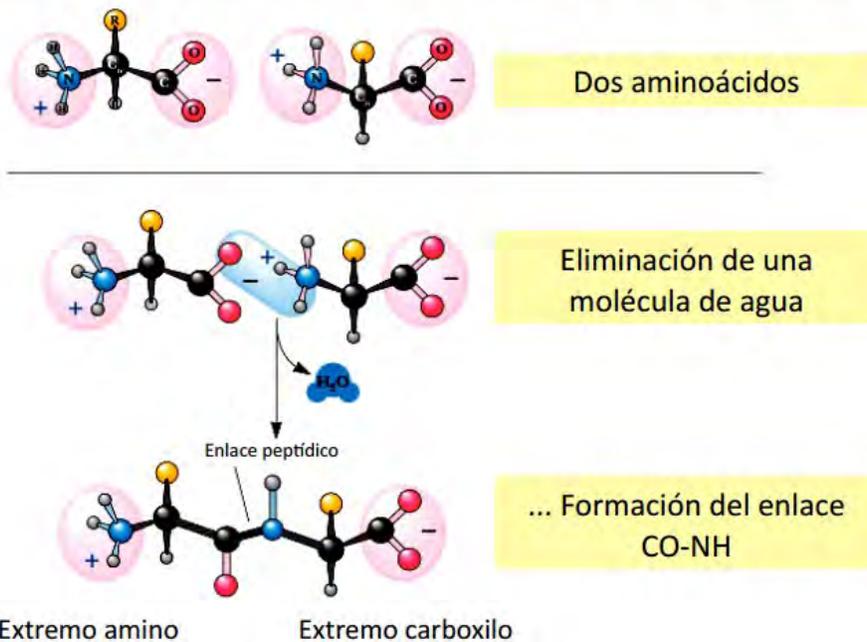


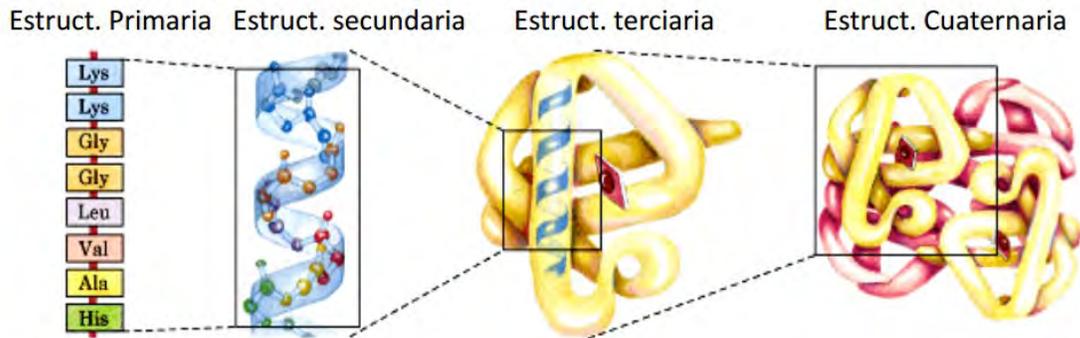
Figura 10 Formación del enlace peptídico. Tomado de Garre J. and Grisham. Biochemistry. 4ª ed. 2009.

La unión de un bajo número de aminoácidos da lugar a un péptido, y si el número es alto, a una proteína, aunque los límites entre ambos no están definidos. En general se considera como péptido a una cadena de hasta 50 aminoácidos, se pueden diferenciar como oligopéptido si se trata de un péptido pequeño, y polipéptido para un péptido grande. Por otra parte, las proteínas de masa molecular mayor pueden ser denominadas oligómeros, que a su vez están formados por subunidades idénticas llamadas protómeros.

Clasificación de las proteínas

Las proteínas se clasifican, atendiendo a su composición, en simples y conjugadas. Las proteínas simples u holoproteínas son las que están compuestas exclusivamente por aminoácidos y las proteínas conjugadas o heteroproteínas son las que están compuestas por aminoácidos y otra sustancia de naturaleza no proteica que recibe el nombre de grupo prostético. Las proteínas conjugadas pueden a su vez clasificarse en función de la naturaleza de su grupo prostético. Así, se habla de glucoproteínas, cuando el grupo prostético es un glúcido, lipoproteínas cuando es un lípido, metaloproteínas cuando es un ion metálico, fosfoproteínas cuando es un grupo fosfato, etc. Otro criterio de clasificación de las proteínas es la forma tridimensional de su molécula. Las proteínas fibrosas son de forma alargada, generalmente son insolubles en agua y suelen tener una función estructural, mientras que las proteínas globulares forman enrollamientos compactos de forma globular y suelen tener funciones de naturaleza dinámica (catalíticas, de transporte, etc).

NIVELES DE ORGANIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS



Aminoácidos Hélice alfa Cadena polipeptídica Subunidades ensambladas

Figura 11. Niveles de organización estructural de las proteínas. Tomado de Lehninger Principles of Biochemistry, 5ª ed. Freeman, 2009.

La caracterización de una proteína puede obtenerse conociendo la composición de aminoácidos y calculando la Carga eléctrica (pI) para poder conocer la estructura primaria, secundaria, terciaria, y en las proteínas multiméricas, su estructura cuaternaria.

Estructura primaria

La información que se puede obtener a partir de la secuencia de aminoácidos es: la predicción de su estructura tridimensional, sus propiedades funcionales, localización celular y su evolución, además de identificar la familia a la que pertenece y describir los polimorfismos, es decir, una proteína puede variar en diferentes especies y dentro de la misma especie entre individuos, tejidos del mismo individuo y fase del desarrollo (aproximadamente entre el 20 y 30% de las proteínas humanas son polimórficas), e identificar las proteínas mutantes que causan enfermedades moleculares, por ejemplo una mutación puntual puede producir un cambio en la secuencia de aminoácidos que resulta en una proteína defectuosa, causando una patología. En otros casos se producen deleciones, las cuales darán como resultado una

proteína incompleta y por tanto no funcional, ya que la función de una proteína depende de su secuencia de aminoácidos. La secuencia se determina a partir de la secuencia del gen o secuenciando a la misma proteína ya que cada proteína tiene un número de residuos y secuencia característicos. Las proteínas contienen regiones esenciales para su función, cuya secuencia se encuentra conservada, es decir, se encuentra codificada en los genes.

Estructura secundaria

Son patrones repetitivos que se forman al plegarse los polipéptidos, puede predecirse con bastante fiabilidad a partir de la secuencia de aminoácidos. Los tipos de estructura secundaria más frecuentes son: hélice alfa, lámina plegada β y giro β . El único enlace presente que estabiliza este nivel estructural es el puente de hidrógeno, un enlace débil que se establece entre los componentes del enlace peptídico, CO y NH. Este enlace es susceptible de ruptura por cambios en la temperatura, el pH, la agitación mecánica y la concentración de sales.

Estructura terciaria

Es la estructura de la proteína en el espacio, depende de la secuencia de aminoácidos y puede predecirse mediante difracción de rayos X. La estructura terciaria de las proteínas presenta dos características esenciales: dominio y motivo. El Dominio es la región de la cadena polipeptídica que puede plegarse de manera estable e independiente, y el Motivo es el patrón de plegamiento característico que aparece en varias proteínas. Cada proteína posee una única estructura tridimensional la cual, depende de la secuencia de aminoácidos.

La función de una proteína depende de su estructura tridimensional y esta se estabiliza mediante enlaces disulfuro y fuerzas no covalentes. La mayoría de los enlaces que

determinan la conformación (estructuras secundaria y terciaria) y la asociación (estructura cuaternaria) son de tipo no covalente.

Las fuerzas que estabilizan la estructura terciaria de una proteína son:

- Puentes disulfuro.
- Atracción electrostática.
- Puentes de hidrógeno.
- Interacción hidrofóbica.

Estructura cuaternaria

Las proteínas no se componen, en su mayoría, de una única cadena de aminoácidos, sino que suelen agruparse en cadenas polipeptídicas (o monómeros) para formar proteínas multiméricas mayores. A la agrupación de varias cadenas de aminoácidos (o polipéptidos) en complejos macromoleculares mayores, se llama estructura cuaternaria de las proteínas.

La estructura cuaternaria modula la actividad biológica de la proteína y la separación de las subunidades polipeptídicas, a menudo conduce a la pérdida de funcionalidad. Las fuerzas que mantienen unidas estas subunidades son, generalmente, las mismas que estabilizan la estructura terciaria. Las más abundantes son las interacciones débiles (hidrofóbicas, polares, electrostáticas y puentes de hidrógeno), aunque en algunos casos, como en las inmunoglobulinas, la estructura cuaternaria se mantiene mediante puentes disulfuro.

Para que una proteína desempeñe su función biológica debe permanecer intacta su conformación tridimensional nativa (la más estable). Como ya se mencionó anteriormente las interacciones que estabilizan la conformación nativa de una proteína son los puentes disulfuro y las interacciones no covalentes. La conformación más estable es la que permite la formación del máximo número de puentes de hidrógeno dentro de la proteína, así los residuos

hidrofóbicos quedan orientados hacia el interior de la proteína, lejos del contacto con el entorno acuoso, y los residuos hidrofílicos quedan orientados hacia el exterior.

Desnaturalización proteica

Ahora bien los factores que determinan la conformación proteica además de la estructura primaria, son las condiciones físico-químicas del entorno como el pH, la concentración salina, la temperatura y otros factores ambientales, que pueden llegar a afectar la conformación estructural, al grado de desnaturalizar la proteína.

La desnaturalización es la modificación de la conformación estructural de una proteína. Consiste en la pérdida de la estructura terciaria, al romperse los enlaces no covalentes que forman dicha estructura. Todas las proteínas desnaturalizadas presentan una conformación muy abierta y con una interacción máxima con el disolvente, por lo que una proteína soluble en agua cuando se desnaturaliza modifica su solubilidad transformándose en insoluble, y por lo tanto precipita. La desnaturalización se puede producir por cambios de temperatura y variaciones del pH. Por lo tanto, una proteína desnaturalizada pierde su actividad biológica.

Toxina tetánica

El progreso en el entendimiento de la enfermedad del tétanos comienza con la detección de la bacteria causante y sus toxinas a finales del siglo XIX, fue nombrada como *Clostridium tetani*, un organismo anaerobio que se encuentra extensamente disperso en la naturaleza.

Los *Clostridium* son bacilos anaerobios, generalmente son gran positivo y muchos producen exotoxinas. Varias especies son patógenas y muchas existen como saprofitas en el suelo y en el tracto intestinal de humanos y otros animales. La toxina tetánica es una proteína, que no contiene restos de lípidos o hidratos de carbono y tiene una masa molecular de 150,700 Da es producida por las variedades vegetativas toxigénicas de *C. tetani* como una única cadena polipeptídica inactiva, y después de la liberación por las bacterias, es procesada por proteasas endógenas en dos subunidades. La exotoxina tetanospasmina se activa por escisión proteolítica selectiva, la cual genera dos cadenas ligadas por puentes disulfuro: L (ligera, 52 kDa) y H (pesada, 98 kDa).⁽³⁰⁻³²⁾ De acuerdo con la nueva nomenclatura (8^o Conferencia Internacional sobre el Tétanos, Leningrado, 1987), la toxina está compuesta por tres dominios, A, B y C. La estructura de esta toxina tetánica ha sido esclarecida por Helting⁽²²⁾ como se muestra en las Figuras 8 y 9. La papaína escinde la toxina tetánica en dos fragmentos: la cadena pesada,

compuesta por 451 aminoácidos, también denominada fragmento C; y la otra parte contenía la porción complementaria denominada fragmento B, ligada a la cadena ligera (fragmento A) mediante un puente disulfuro.



Figura 12. Toxoide Tetánico Estructura Fragmento C Tomado de la web

La secuencia de aminoácidos de la toxina tetánica fue determinada simultáneamente por dos grupos por clonación del gene que codifica para la toxina.

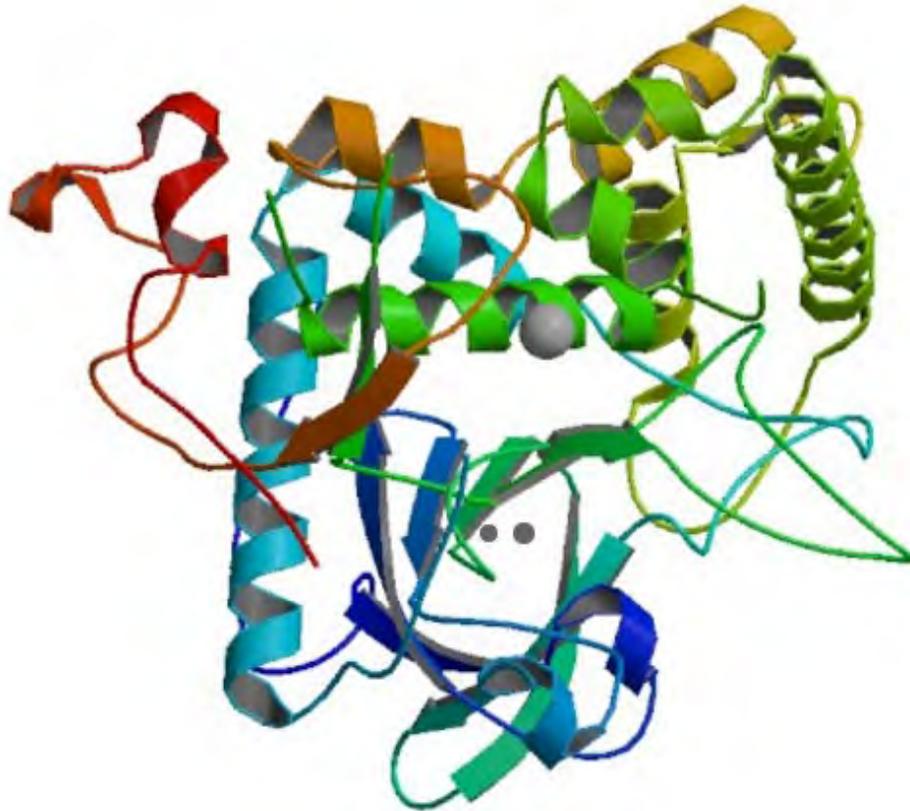


Figura 13. Estructura tridimensional de la toxina tetánica. Tomado de rcsb.org/pdb/explore/RCSB PROTEIN DATA BANK AN INFORMATION PORTAL TO BIOLOGICAL MACROMOLECULAR STRUCTURES.

El péptido mayor se une a gangliósidos, en tanto que el péptido menor parece conferir la actividad tóxica. En donde se une la membrana pre sináptica en la unión neuromuscular, una vez que esta toxina alcanza el SNC a través de la circulación sistémica por transporte retrogrado a lo largo de los axones penetra en la neurona motora para llegar al citoplasma de las neuronas inhibitoras de la médula espinal. Aquí bloquea la liberación de

neurotransmisores que actúan como mediadores inhibitorios en la sinapsis de las neuronas motoras, causando la parálisis espástica característica del tétanos.

Como resultado se producen espasmos musculares, al inicio localizados y después generalizados. Cantidades muy pequeñas (μg o menores) de toxina pueden ser mortales para los humanos. En muchas especies animales la DL_{50} (la dosis de toxina requerida para matar al 50% de animales en un grupo dentro de un tiempo específico) está dentro de un rango de 1 a 5 ng/Kg. Desde hace tiempo se sabe que la enfermedad es debida a la secreción de la toxina activa y el ascenso de la inmunología ha llevado al desarrollo de toxoides y anticuerpos que abrió el camino para el tratamiento y la profilaxis de la enfermedad.

En personas con un sistema inmunitario normal, el tétanos puede prevenirse mediante inmunización con toxoide tetánico.

Vacunas con toxinas inactivadas

Las toxinas bacterianas se inactivan siempre con formalina, ácido o calor para producir toxoides de tal manera que pierdan su toxicidad pero que retengan su antigenicidad. Son preparaciones obtenidas a partir de toxinas bacterianas inactivadas. Generalmente se utiliza el formol (c.a. 38% de formaldehído en H_2O). Los toxoides son muy efectivos en la prevención del tétanos y otras enfermedades.

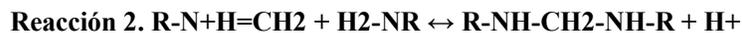
Producción de toxoides bacterianos e inactivación

El toxoide tetánico (TT) es el antígeno protector inmunizante contra los efectos adversos de la infección por el organismo que provoca el tétanos, para producir la vacuna contra el tétanos convencional, la cepa de Harvard altamente toxigénica se cultiva en un medio semi sintético fermentador durante aproximadamente una semana, hasta que las bacterias se lisan y liberan la toxina tetánica en el sobrenadante el rendimiento medio obtenido en estas

condiciones es de aproximadamente 60 a 80 Lf/mL (Lf, el límite de floculación, es igual a la cantidad de la toxina de floculación más rápidamente con una unidad de antitoxina) (1 Lf= 2 - 2.5 µg de toxina tetánica).

El cultivo se filtra a continuación, y el filtrado contiene la toxina que es detoxificada por adición de formaldehído a una concentración final de 0.5%. El pH es ajustado a 7.6 y el sobrenadante luego se almacena a 37°C por cuatro semanas para permitir la completa detoxificación de la toxina tetánica. Durante el proceso de detoxificación, el formaldehído reacciona con las moléculas de toxina, peptonas y otras proteínas que están presentes en el medio.

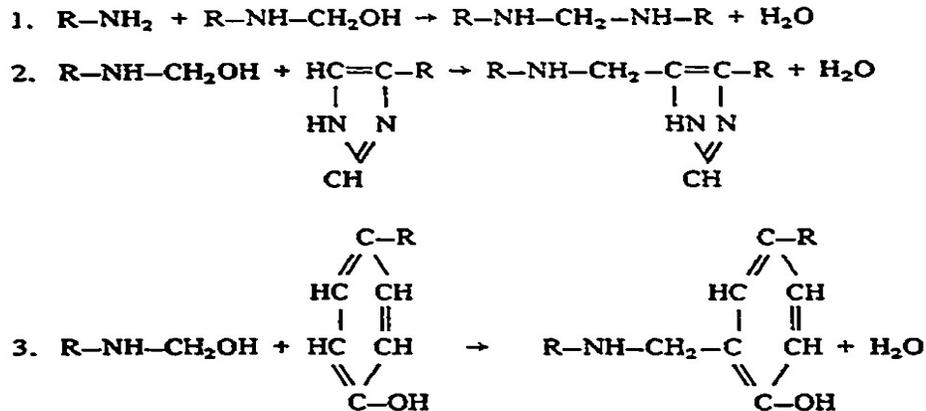
La primera reacción consiste principalmente en los grupos ε- amino de la lisina, es rápido, completamente reversible y resulta en la formación de imina (base de Schiff).



Considerando que la segunda reacción ocurre mucho más lentamente e implica la reacción de uno de los productos inestables sobre una segunda molécula que contiene un grupo amino, un anillo imidazol, o un fenol. El resultado final del tratamiento con formaldehído a la toxina tetánica implica una reticulación entre un grupo ε-amino de la lisina y un segundo grupo amino, una histidina, y una tirosina o triptófano, a través de un puente metileno estable (-CH₂-).

Estos productos están presentes en los ácidos hidrolizados de toxoides y pueden ser fácilmente identificados por análisis de aminoácidos.

Obviamente, estas reacciones pueden ocurrir entre aminoácidos de la misma molécula de toxina, resultando la floculación interna de la proteína; entre dos moléculas de toxina, resultando en la dimerización; o entre un péptido pequeño presente en el medio y una molécula de toxina.



Una representación de este proceso se muestra en la reacción anterior: cuando el formaldehído es añadido al sobrenadante del cultivo conteniendo moléculas de toxina rodeado por exceso molar de peptonas derivado del medio de cultivo, la reacción principal que ocurre es una floculación entre peptonas y moléculas de toxina, de tal manera que en el fin del proceso, el toxoide está recubierto con un número de péptidos derivados de la carne usada para preparar el medio. Estos péptidos no son necesariamente antígenos determinantes.

Aislamiento

La purificación del toxoide es llevada a cabo en dos etapas. El toxoide crudo primero es sometido a ultrafiltración utilizando membranas con un tamaño de poro de 0,001-0,05 μm y el toxoide concentrado es entonces sometido a precipitación fraccionada con sulfato de amonio.

Vacunas conjugadas

Las vacunas conjugadas son eficaces, pero caras de producir. ^(7,33) Un problema en la preparación de vacunas conjugadas es retirar la proteína no conjugada de la proteína unida de manera covalente. Típicamente, esto se hace por filtración en gel de exclusión de tamaño y requiere una columna grande y especializada. Houen y colaboradores demostraron que los péptidos podían acoplarse a proteínas absorbidas a adyuvantes de aluminio en fase sólida. ⁽³⁷⁾ Además, descubrieron que la respuesta de anticuerpo anti-péptido inducida por los conjugados en fase sólida era mayor que la inducida por conjugados preparados en fase de solución. La síntesis de estos conjugados en fase sólida era simple porque el péptido no conjugado y los reactivos podían retirarse por centrifugación de los componentes en fase sólida. En gran medida, ya que la fase sólida es adyuvante por sí misma, no había necesidad para el conjugado de retirarse de la estructura en fase sólida en la que se sintetizaba el inmunógeno.

De este modo, se simplificó la técnica de preparación de vacunas conjugadas con vehículos duales en fase sólida, en particular la de retirar de hapteno y proteína libre.

Al proporcionar un método mejorado para preparar vacunas conjugadas en fase sólida donde una hapteno se une a una proteína aumenta la posibilidad de llevar a cabo la formulación de una vacuna conjugada muy efectiva dirigida contra fármacos causantes de dependencia. ⁽³³⁾

Por ejemplo, la ausencia de un receptor específico para la cocaína ha animado a grupos de investigadores a buscar nuevas estrategias de bloqueo periférico con anticuerpos específicos a la cocaína. Cuando se une la cocaína a un transportador o antígeno proteínico se ha podido inducir una respuesta inmune en animales de experimentación. ⁽³⁴⁻³⁶⁾ Los resultados han sido prometedores, ya que la producción de anticuerpos específicos de tipo Ab₂β han sido obtenidos en ratas, lo que ha permitido bloquear la cocaína en la sangre periférica e impedir

su ingreso al SNC. Asimismo, esta vacuna disminuye la autoadministración de la droga, ^(35,38) lo que promete ser una gran posibilidad terapéutica en un futuro próximo. Se requiere de más estudios clínicos antes de disponer de este tipo de tratamiento.

Entre los medicamentos susceptibles a la degradación a causa de una variación en la temperatura, las vacunas merecen una especial mención debido a su naturaleza y a su finalidad ⁽³⁹⁾.

La pérdida de actividad de las vacunas puede deberse a diversos factores como la exposición a temperaturas elevadas, la congelación, la luz y el envejecimiento. Estas son causas asociadas a la pérdida de su capacidad inmunizante, la cual es irreversible, por lo que, aun cuando se restablezcan las condiciones idóneas, no se recuperará la actividad inicial ⁽⁴⁰⁻⁴³⁾.

En general las vacunas más estables a exposiciones de temperaturas más altas de las recomendadas son las anatoxinas difteria y tetánica ⁽⁴⁴⁾.

Estudio de estabilidad para vacunas utilizando toxoides ⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾

La estabilidad de un producto en su envase primario, así como la de sus componentes es una característica fundamental que debe evaluarse tras la conservación del producto en distintas condiciones ambientales.

Para proteínas conjugadas debe determinarse la estabilidad térmica e identidad de los productos de degradación pertinentes.

Los resultados del estudio de estabilidad nos permiten conocer el efecto que la temperatura, la humedad y la luz pueden tener en la calidad del producto, su seguridad y su eficacia. El principal objetivo de este tipo de estudios es determinar cuánto tiempo el producto conserva

sus características y/o porcentaje de principio activo en el envase en que se almacena hasta su administración.

Estos resultados se utilizan para establecer las condiciones de almacenamiento y la caducidad del producto.

La estabilidad de una vacuna es la resistencia a la degradación física que hace que tenga su propiedad inmunógena. La pérdida de la capacidad inmunizante es permanente e irreversible y si se produce la exposición a temperaturas elevadas, las pérdidas son acumulativas, es decir, no se recupera por almacenarla de nuevo a la temperatura correcta. Los factores que pueden modificar la estabilidad pueden ser inherentes a la propia vacuna o externos (luz, temperatura elevada, congelación, tiempo transcurrido desde su fabricación y manipulación).

El estudio de la estabilidad acelerada se usa para determinar el envejecimiento del producto a elevadas temperaturas. El método de elección para determinar la estabilidad acelerada es el que establece que el producto sea conservado a 53 °C durante una semana. Para productos que no sean estables en estas condiciones, hay otras condiciones alternativas: 45 °C durante 2 semanas, 35 a 37 °C durante 6 semanas o 22 a 25 °C durante 18 semanas. El estudio de la estabilidad acelerada no sustituye al estudio de estabilidad a tiempo real, pero permite aproximar la tasa de degradación. No obstante, puede darse que, habiendo superado la estabilidad acelerada, un producto no de resultado satisfactorio en la estabilidad a tiempo real.

El estudio de estabilidad a tiempo real (storage stability) normalmente se realiza durante un periodo de 12 meses (este periodo se puede prolongar si los resultados demuestran que el producto se mantiene estable).

El producto se conserva en refrigeración $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, en el envase en el que se almacena hasta su administración. Tanto la temperatura como la humedad deben ser monitorizadas. Además del análisis inicial y final, deben realizarse análisis intermedios: 3, 6 y 12 meses. Se debe observar también si ha habido interacción entre el envase y el producto. Para que el producto se considere estable, en función del contenido inicial de la proteína conjugada en el producto, se aceptan las siguientes variaciones:

% Proteína	Variación aceptable de la Proteína (%)
< 97	± 15
≥ 97	± 10

El estudio de estabilidad de largo plazo a baja temperatura tiene la finalidad de asegurar que las propiedades de los productos no se vean afectadas negativamente durante el almacenamiento por periodos prolongados de tiempo. Si el producto está destinado a ser almacenado en condiciones refrigeradas y/o se considera que el producto puede salir de disolución, o si puede ser que ocurra una separación de fases, debe llevarse a cabo un estudio de estabilidad a una temperatura no inferior a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La estabilidad de cada vacuna está condicionada por su capacidad para resistir la degradación física tras la exposición a altas temperaturas. Las tasas de degradación varían notablemente de una vacuna a otra, siendo el intervalo estándar de temperatura aconsejado para su conservación entre $2\text{ y }8^{\circ}\text{C}$. Un inadecuado procedimiento de conservación en frío de las vacunas puede contribuir a la pérdida de actividad con efecto acumulativo, la inactivación irreversible y/o producir mayores efectos adversos.

En general, las vacunas que llevan adyuvante se pueden inactivar por la congelación. También es importante resaltar que, aunque no estén congeladas si se han almacenado y se administran a temperaturas inferiores a 2°C pueden ser más reactógenas, especialmente aquellos preparados en cuya composición se encuentre el TT. Ante la sospecha de congelación, en las vacunas adsorbidas TT o combinada es útil hacer la prueba de agitación o floculación como se describe a continuación:

1. Seleccionar un vial/vacuna sospechosa y otro que no haya sido expuesto a bajas temperaturas (de la misma vacuna).
2. Agitar enérgicamente el vial/vacuna sospechosa de haber sido congelado y colocarlo en una superficie plana y ante una luz.
3. Se repite la operación con otro vial/vacuna que no haya sido expuesto a bajas temperaturas, y se comparan ambos.
4. Observar la vacuna: la vacuna no congelada aparece lisa y turbia mientras que las vacunas adsorbidas congeladas presentan partículas granulosas o flóculos y es menos turbia.
5. A partir de los 15 minutos, las evidencias se hacen más evidentes, de manera que en la vacuna congelada se visualizan sedimentos en el fondo del frasco y tras 30-60 minutos se observa en el fondo del vial un sedimento compacto totalmente separado del líquido, que no se mueve al inclinar el frasco.

Planteamiento del Problema.

A mediados del siglo XIX y principios del XX el incremento en el uso indiscriminado de compuestos opiáceos con fines analgésicos pero también de alteraciones en la conducta o estado psíquico desencadenó un problema de salud pública en buena parte de la población de distintos continentes, expuesta a dichas sustancias, ya que en la mayoría de los casos presentaban dependencia física y abuso al medicamento, aunado a esto el desarrollo de jeringas hipodérmicas facilitó la introducción directa de los principios activos a la circulación sanguínea, sin embargo, también resultó el contagio de otros padecimientos como tuberculosis, hepatitis, VIH, etc. Posteriormente, se modificaron estructuralmente para potenciar el efecto placentero, de tal manera que se tiende a repetir el consumo, y el uso continuo del psicofármaco crea un trastorno adictivo dada su acción reforzante positiva, dando con esto un número creciente de más de 16.5 millones de adictos a derivados de opiáceos. ^(5, 6) Como una respuesta a dicha problemática los investigadores han diseñado una vacuna anti adictiva dirigida contra compuestos opiáceos, conjugando un hapteno a una proteína acarreadora, ⁽²⁵⁾ se logra obtener una respuesta inmune en contra de epítopos de la proteína y también hacia el hapteno, al generar anticuerpos específicos hacia el opiáceo la droga será bloqueada en la circulación. Sin embargo, las proteínas en disolución son susceptibles a transformaciones químicas como hidrólisis, oxidación, desnaturalización o agregación provocando su degradación afectando la seguridad y eficacia ⁽²⁷⁾. Las proteínas se desnaturalizan y pierden su estructura nativa y actividad irreversiblemente, por la exposición a altas temperaturas por periodos prolongados de tiempo ⁽²⁸⁾. Ya que no es posible observar directamente la degradación del producto biológico, se requiere de métodos indirectos sensibles a los estadios de la estructura nativa y de la proteína desnaturalizada, para conocer las condiciones en las que la proteína conjugada tiende a fragmentarse, agregarse, descomponerse o sufrir una reacción proteolítica. Para ello se requiere implementar una

técnica por cromatografía que establezca características y condiciones iniciales de análisis para la proteína nativa, luego someter al conjugado sintetizado al análisis bajo estas mismas condiciones, y finalmente llevar controles contra tiempo con las muestras almacenadas a baja temperatura y analizarlas bajo las mismas condiciones del análisis inicial para determinar la integridad estructural y vida útil de la proteína como materia prima y del producto conjugado después de acoplar el hapteno opiáceo a dicha proteína.

Las alteraciones en la estructura terciaria de la proteína se manifiestan cromatográficamente en cambios en la intensidad de la señal, tiempo de retención y la modificación en el perfil cromatográfico para la misma muestra bajo las mismas condiciones de análisis. La técnica cromatográfica deberá estar dirigida a estudios de cambios en la estructura específica, en el caso del TT la CEM no desnaturalizante puede ser útil para detectar las alteraciones en la estructura proteica y demostrar experimentalmente, ya que no existen referencias de la estabilidad estructural para el TT del lote: TAM137 el cual fue utilizado en la formulación de un conjugado con fines preventivos como vacuna anti adictiva, por lo que también se tendrá que determinar su estabilidad estructural durante el almacenamiento. Con el fin de obtener una proteína acarreadora de estructura estable en condiciones de refrigeración, para su posterior uso como proteína estructural de inmunógeno contra opiáceos, y así determinar la vida útil del TT y sus derivados M-TT a través del tiempo mediante controles periódicos.

Como objetivo final del proyecto se espera obtener un anticuerpo monoclonal específico para fármacos derivados de opiáceos, para su posterior uso en detección de drogas de abuso u otros métodos de identificación, y dar más alternativas para el tratamiento de las adicciones como enfermedad mental.

Objetivo general

Implementar una técnica por cromatografía de exclusión por tamaño molecular por filtración en gel para caracterizar, determinar la pureza, e investigar sobre la integridad estructural de la proteína del Toxoide Tetánico, utilizada como proteína acarreadora en la formulación del conjugado hapteno-proteína y para llevar un control en el comportamiento de la formulación del inmunógeno (M-TT) durante el almacenaje a temperatura controlada y estudiar los efectos en la integridad estructural cuando se sometan a distintas temperaturas.

Hipótesis

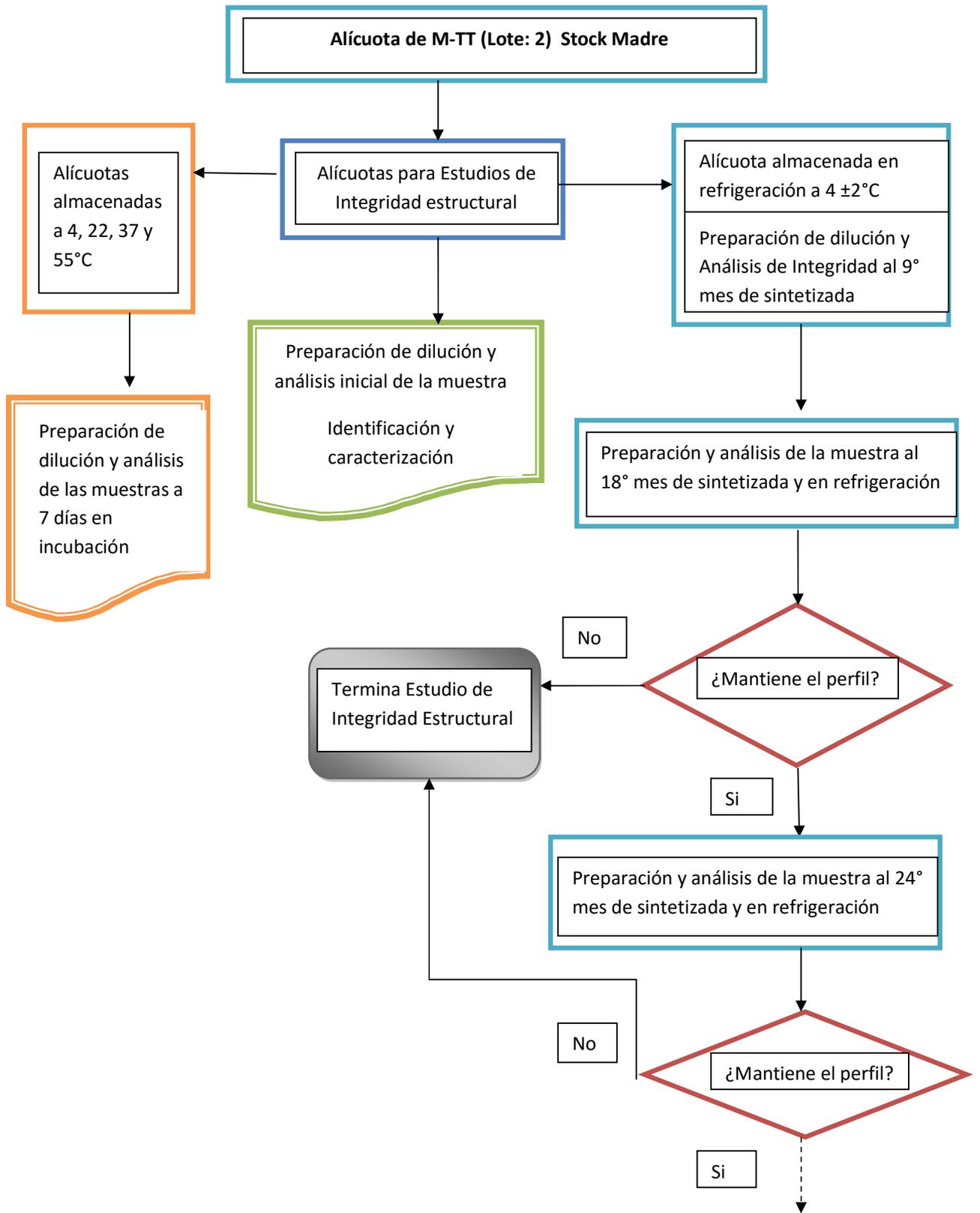
La proteína purificada del Toxoide Tetánico en su estado nativo y el conjugado de interés pueden ser estudiadas por la técnica de CLAR-FG. La proteína del TT y su conjugado presentarán un perfil (cromatograma) característico bajo las condiciones cromatográficas establecidas inicialmente. Si las proteínas en disolución son susceptibles a la degradación irreversible por factores químicos, o físicos como la temperatura, e intrínsecos de la misma formulación en periodos largos de tiempo durante el almacenamiento, entonces el perfil cromatográfico se verá afectado en forma significativa cuando se comparen los perfiles cromatográficos de la proteína y sus derivados sometidos a almacenamiento bajo condiciones óptimas, contra muestras sometidas a diferentes temperaturas de almacenamiento, después de que se analicen con el mismo método y bajo las mismas condiciones de operación, y en comparación con las mediciones iniciales se podrá así estimar la tasa de degradación para nuestra proteína inmunógena y su conjugado.

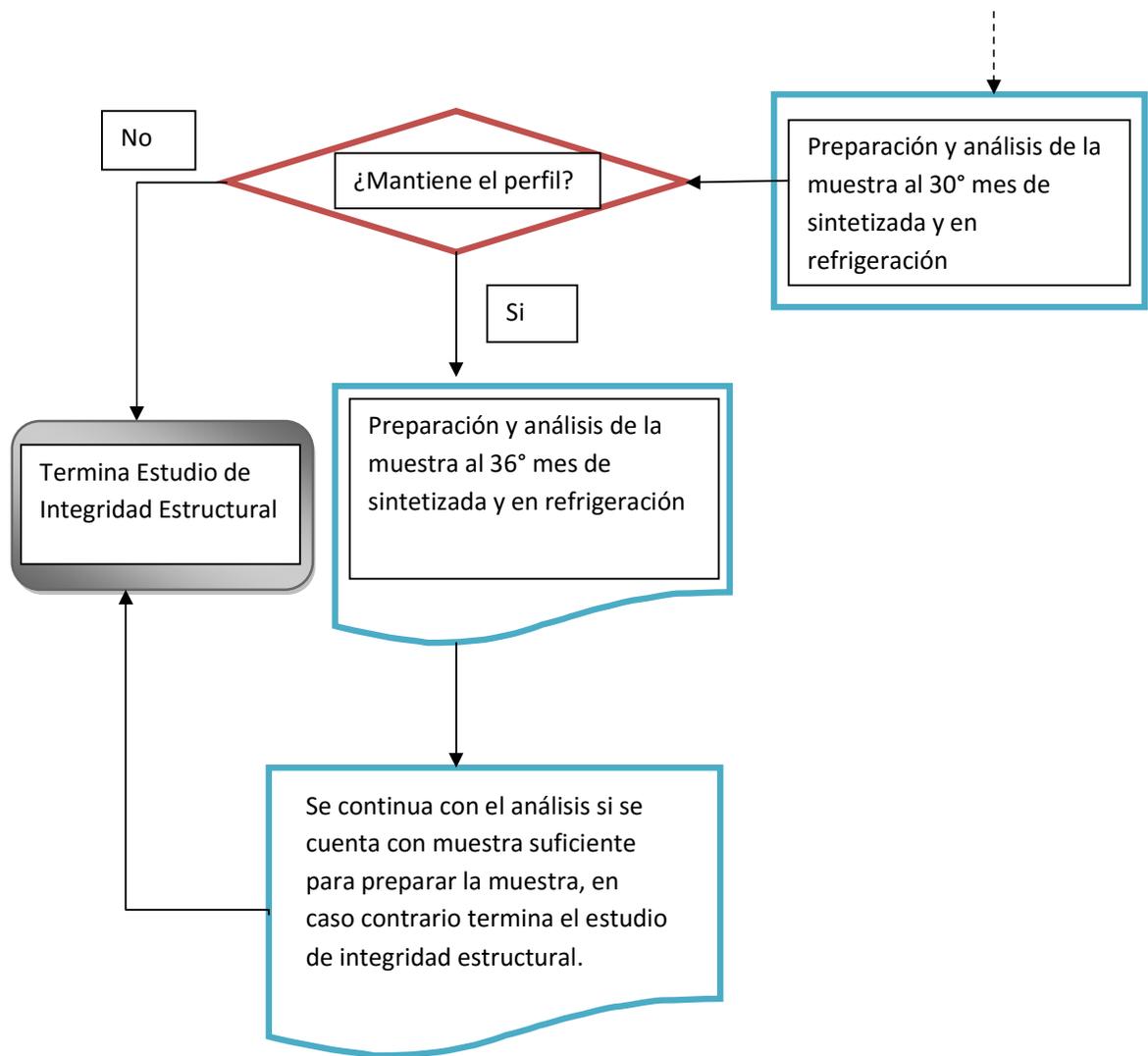
Diseño Experimental

Dada la necesidad de obtener información acerca de cambios significativos en la estructura proteica durante el almacenamiento es necesario caracterizar al TT y al conjugado (M-TT) ambas macromoléculas pueden ser analizadas mediante la técnica de CLAR-FG. Para el TT se analizará el lote: TAM137, el cual se utilizó para la síntesis del conjugado M-TT del lote: 2 diseñado y sintetizado en el Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

Se realizará un estudio experimental, por CLAR-FG, sobre el TT del lote: TAM137 manufacturado por P.T. Bio Farma el cual fue utilizado en la formulación de un modelo estructural de inmunógeno contra opiáceos (M-TT Lote: 2), para observar el efecto de la temperatura sobre la integridad estructural de esta proteína y su conjugado. Se someterán a 3 distintas temperaturas durante 7 días y se llevará un control en condiciones óptimas de almacenamiento, para ello se tendrán dos grupos para ambas biomoléculas, el primer grupo se someterá a incubación a tres distintas temperaturas durante 7 días, y el segundo grupo se almacenarán a 4 ± 2 °C la frecuencia de análisis será de 0, 8, 14, 20, 26 meses para el ensayo a largo plazo en condiciones de refrigeración. Los perfiles cromatográficos obtenidos serán utilizados para determinar si la proteína conserva su integridad estructural nativa o hubo agregación o fragmentación tanto del TT como para el conjugado M-TT sintetizado a partir del toxoide.

Diagrama de Flujo para los Estudios de Integridad Estructural realizados para el conjugado M-TT





Materiales y Recursos

Se utilizará un cromatógrafo de líquidos de alta resolución equipado con un automuestreador Waters 717, una bomba Waters 515, un detector de dispositivo de diodos (210-380 nm) Waters 2996 acoplado a un computador Dell con el programa Millennium 32 para la obtención y procesamiento de los cromatogramas. Las corridas cromatográficas se realizarán en una columna Shodex PROTEIN KW-803E de 4.6 mm de diámetro interno x 250 mm de longitud y con un límite de exclusión para proteínas de 700 000 Da.

Condiciones cromatográficas

Para la elección de la fase móvil se consideraron la compatibilidad con la muestra de proteína (no desnaturalizante), la mínima interacción con el relleno de la columna y el pH dentro de un rango de 6.8 a 7.2 por lo cual la fase móvil consistirá en buffer de fosfatos con salina a pH 7.0 conteniendo KH_2PO_4 50 mM, K_2HPO_4 50 mM y NaCl 300 mM. Los reactivos utilizados son marca J. T. Baker.

Para la preparación de la fase móvil se necesitará agua filtrada mediante un equipo de purificación de agua MilliQ Biocel Millipore Equipo. 2MQ560F01 con filtro de membrana con poro de 0.22 μm , matraz Erlenmeyer de 1 L. Un juego para filtración por membrana, y filtros de membrana GN-6 de 45 mm de diámetro y 0.45 μm de tamaño de poro para disolventes acuosos, y una bomba para vacío Millipore.

Condiciones del Estudio de Integridad Estructural

La proteína purificada del TT y el producto conjugado se someterá a ensayos de integridad estructural a largo plazo (4 periodos de estabilidad estructural) en condiciones de almacenamiento. Para ello, se requerirá realizar análisis por CLAR-FG para el TT a partir de los 8, 14, 20 y 26 meses de la fecha de análisis inicial y para el conjugado se realizarán análisis a los 9, 18, 24, 30 y 36 meses a partir de la fecha de síntesis de acuerdo con la siguiente tabla (Tabla 1). Para los ensayos en incubación para ambas muestras a diferentes temperaturas como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Ensayos de integridad estructural para TT lote. TAM137 y M-TT lote: 2 a largo plazo

Nombre de la muestra y lote	Temperatura (+/-2 °C)	pH	Frecuencia de análisis (meses)
TT (TAM137)	4	7.0	A partir del análisis inicial, 8, 14, 20, 26
M-TT (2)	4	7.0	A partir de la fecha de síntesis 9, 18, 24, 30, 36

Tabla 3. Ensayos de integridad a diferentes temperaturas para TT Lote: TAM137 y M-TT Lote: 2

Temperatura (+/-2 °C)	pH	Tiempo de incubación (días)
4	7.0	7
22	7.0	7
37	7.0	7
55	7.0	7

Metodología

Preparación de la fase móvil

La fase móvil que se utilizó para la corrida consistió en un amortiguador de fosfatos dibásico y monobásico de potasio con salina a una concentración de 50 mM y 300 Mm respectivamente. La fase móvil una vez ajustado el pH a 7.0 fue filtrada por una membrana GN-6 con poro de 45 µm para remover partículas en suspensión.

Se realizaron pruebas para determinar la velocidad de flujo a la cual el TT muestra el mejor perfil. Se determinó que los análisis se realizarán a un flujo de 1 mL/min. Y la detección se efectuó a 280 nm por ser la longitud de onda a la cual absorben mejor los aminoácidos con grupos aromáticos.

Preparación del estándar para CLAR-FG Bio-RAD. Cat#151-1901 Control 22004147

1. Rehidratar el vial con 0.5 ml de agua des ionizada.
2. Agite la mezcla y deje el vial del estándar en hielo por 2 a 3 minutos.
3. Agite el vial nuevamente
4. Para la aplicación a CLAR, el estándar debe ser centrifugado a 2500 rpm antes de aplicarlo para remover cualquier partícula fina.
5. Agregar a un vial para inyección el contenido del estándar más las muestras de KLH, Endomorfina y BSA.
6. Inyectar 76 µl a la columna de separación por exclusión molecular.

La mezcla hidratada debe mantenerse en un rango entre 2 y 8°C hasta por dos semanas o en congelación hasta por 8 meses. Se añadieron como estándares internos Endomorfina, Albumina de suero bovino (BSA) y hemocianina de molusco (KLH). Las especificaciones de cada estándar se muestran en la siguiente tabla (Tabla 4).

Resultados

Marcadores de masa molecular

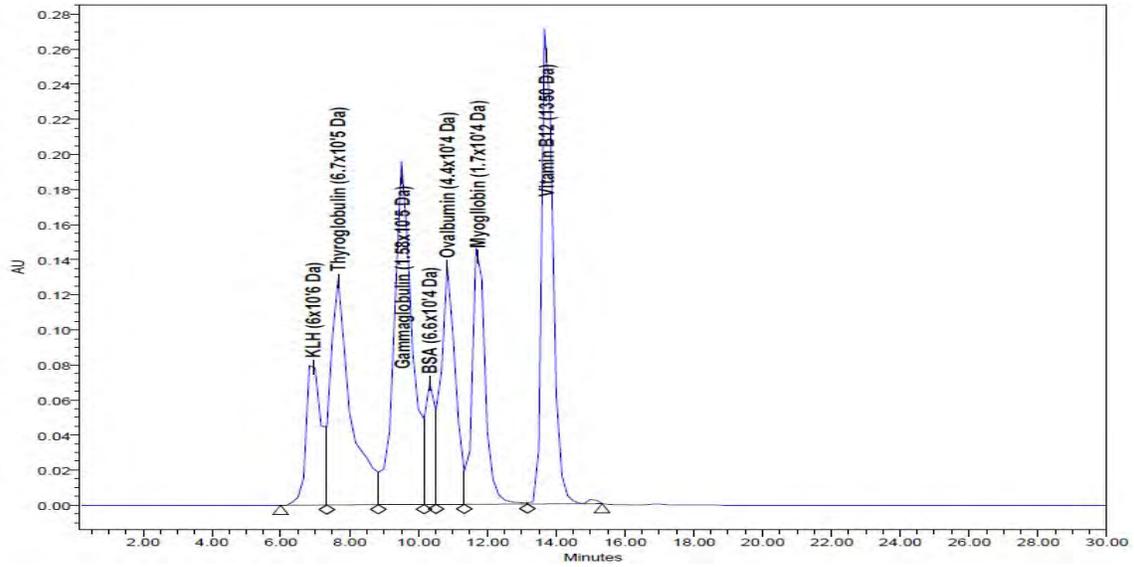


Figura 14. Cromatograma para los Marcadores de masa molecular.

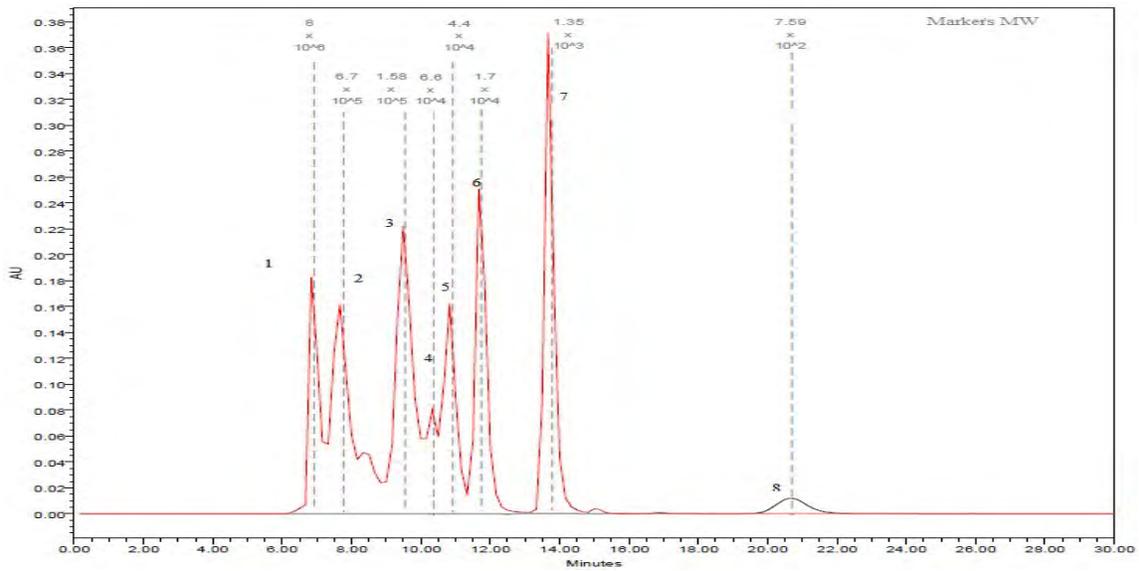


Figura 15. Cromatograma para los Marcadores de masa molecular. 1 KLH, 2 Tiroglobulina, 3 γ -Globulina, 4 BSA, 5 Ovoalbúmina, 6 Mioglobina, 7 Vitamina B12, 8 Endomorfina.

Tabla 4. Marcadores de masa molecular Bio-RAD y estándares internos para CLAR-FG.

Proteína	Masa molecular (MM)	Cantidad (mg)	V _e (ml)
KLH	6 x10 ⁶	2	6.9
Tiroglobulina	6.7 x10 ⁵	5	7.5
γ -Globulina	1.58 x10 ⁵	5	9.4
BSA	6.6 x10 ⁴	2.9	10.3
Ovoalbúmina	4.4 x10 ⁴	5	10.7
Mioglobina	1.7 x10 ⁴	2.5	11.5
Vitamina B12	1.35 x10 ³	0.5	13.5
Endomorfin	7.59 x10 ²	0.5	20.7

Recta de calibración

Con los datos obtenidos de los marcadores de masa molecular se realizó una recta de calibración como se muestra en el siguiente gráfico (Gráfico 1).

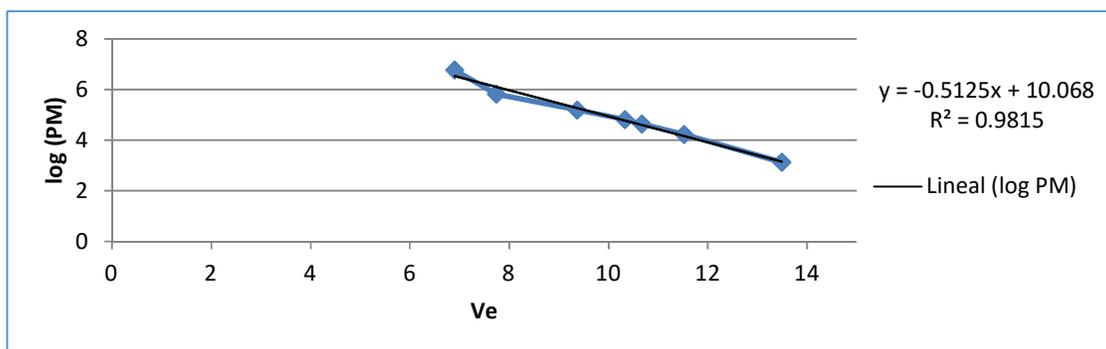


Gráfico 1. Curva de calibración para una mezcla de proteínas como marcadores de masa molecular Bio-RAD más estándares internos.

Al graficar el log (MM) contra el V_e se obtuvo una recta de calibración lineal en el rango de 6000 a 1.35 kDa con un coeficiente de correlación de 0.9815. La columna Shodex KW 803 (8 x 300 mm) mostró tener un rango de permeación apropiado para el análisis de TT y el conjugado, tomando en cuenta que actualmente no existe una columna con un rango mayor de exclusión molecular para proteínas.

La preparación de la muestra de TT se describe a continuación:

Se tomó directamente del recipiente que lo contiene, la proteína se encuentra disuelta en PBS 0.1M a pH de 7.2 y a una concentración de 1.976 mg/ 200 μ l. Se tomó una alícuota de 25 μ l para obtener una dilución con concentración final de proteína de 247 μ g/ 2.5ml de esta muestra se inyectaron 152 μ l para aplicar una cantidad en masa de 15 μ g de proteína a la columna Shodex W-803.

La detección se realizó mediante un detector de dispositivo de diodos a una longitud de onda de 280 nm, ya que es la longitud de onda idónea en la cual se puede identificar a la proteína del TT por los aminoácidos Trp y Tyr. A una velocidad de flujo de 1 mL/min. Los ensayos se llevaron a cabo a la temperatura del cuarto, y a una presión alrededor de 400 psi.

Linealidad del sistema tomando a la proteína del Toxoide Tetánico como analito

Se prepararon 7 diluciones de concentración (intervalo) de la solución de referencia. La concentración central de las diluciones debe ser igual a la concentración que represente al 100% en la muestra procesada para su medición ⁽⁴⁹⁾, en este caso 247 μ g/ 2.5 ml de TT disuelto en PBS 0.1M (carga en masa 15 μ g).

A partir de la disolución de referencia para el Toxoides Tetánico (TT) del lote: TAM137 manufacturado por P.T. Bio Farma con una concentración de 1.976 mg/ 200 µl de proteína. Se prepararon 7 diluciones a las siguientes concentraciones como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Datos para determinar la linealidad del sistema.

Carga en masa (µg)	Volumen de Inyección (µl)	Concentración (ng /µl)	Dilución µg/ 2.5 ml	Área bajo la curva
2	152	13.1	33.6	39388
5	152	32.9	82	169034
10	152	65.8	164	509915
15	152	98.6	247	839921
20	152	131.6	329	1171645
30	152	197.4	494	1787133
60	152	394.7	988	4379160

Con los datos obtenidos se realizó el siguiente gráfico (Gráfico 2.) para asegurar que los datos obtenidos, son proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo determinado.

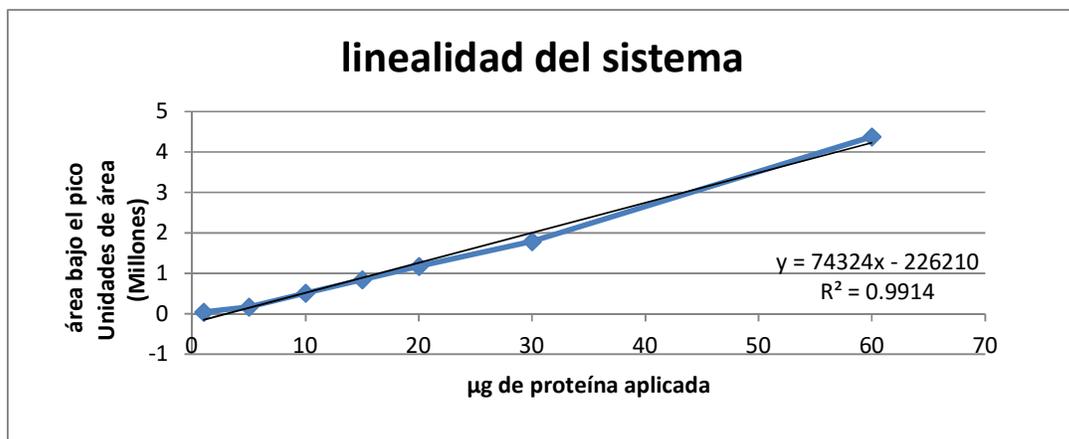


Gráfico 2. Linealidad del sistema cromatográfico para 7 diluciones de una muestra de proteína.

En el intervalo de 5 a 60 µg de proteína, el sistema mostró un comportamiento lineal al graficar el área bajo la curva contra cantidad de proteína aplicada, con una r^2 de 0.9914

Límite de Detección

Este procedimiento aplica a métodos que utilizan instrumentos para medir la respuesta analítica y presentan una señal de ruido basal. Para determinar la cantidad del analito que genere una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de por lo menos 3 a 1, lo que corresponde a la concentración asociada al límite de detección. Se realizó el cálculo para determinar el límite de detección con base en la señal de ruido ⁽⁴⁹⁾.

Tabla 6. Datos de área y promedio del área basal para los blancos.

Blancos	Área (respuesta analítica medida)
1	38624
2	39222
3	39519
4	40546
5	40364
6	40421
Promedio (área basal)	39782

Tabla 7. Datos de áreas para determinar el límite de detección.

Muestra	Concentración (ng/ µl)	Dilución (µg/2.5 ml)	Área bajo la curva	Área bajo la curva menos el área basal
1	13.1	2	39679	730
2	16.4	2.5	44367	5418
3	19.7	3	109066	70117
4	23	3.5	143724	104775
5	26.3	4	178466	139517
6	29.6	4.5	213149	174200

LD = 3 x Ruido 3 x 39616 = 118848 UA equivale a la respuesta obtenida por la dilución cuya concentración fue 24 ng/ µl.

Límite de Cuantificación

Para determinar la cantidad del analito que genere una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de por lo menos de 10 a 1, lo que corresponde a la concentración asociada al límite de cuantificación. Se realizó el cálculo para determinar el límite de cuantificación con base en la señal de ruido⁽⁴⁹⁾.

Tabla 8. Datos para determinar el límite de cuantificación.

Muestra	Concentración (ng / µl)	Dilución (µg /2.5 ml)	Área bajo la curva	Área bajo la curva menos el área basal
1	32.9	5	218939	179990
2	52.6	8	356306	317357
3	65.8	10	486474	447525
4	78.9	12	672213	633264
5	98.7	15	833382	794433

LC = 10 x Ruido LC = 10 x 39616 LC = 396160 UA equivalente a la dilución más cercana con una concentración de 62 ng / µl.

Caracterización de la muestra

Se utilizó la CLAR-FG para el análisis de la proteína purificada del TT del lote: TAM137 ya que la técnica está basada en la exclusión por el tamaño molecular y es utilizada para la caracterización de la materia prima, control de calidad, y control de degradación de proteínas bajo condiciones de trabajo no desnaturizantes. Además, se contó con una cantidad suficiente de proteína de dicho lote para realizar los ensayos para el TT sintetizado por P.T. Bio farma en noviembre del 2007, ya que este se utilizó como proteína acarreadora en la formulación de un lote experimental de 50 mg de conjugado (M-TT lote: 2).

Como se muestra en el siguiente cromatograma (Figura. 16) una vez purificado el TT presenta el siguiente perfil donde se observa un pico que comienza en el límite de exclusión

de la columna, presenta un solo pico con un T_R 9.047 min. Las condiciones para obtener los resultados fueron, velocidad de flujo para la fase móvil fue de 1 mL/min, presión alrededor de 400 psi, la detección se realizó a 280 nm y se aplicaron 180 μ l (corresponde a 15 μ g en masa) de inyección a la columna. El análisis cromatográfico sugiere que la proteína está conformada por compuestos de alta masa molecular (alrededor de 6000 kDa) unidos a compuestos de menor masa molecular (alrededor de los 150 kDa), formando una macromolécula de estructura compleja. Las líneas paralelas a la absorbancia corresponden a los marcadores de masa molecular que se muestran con fines comparativos.

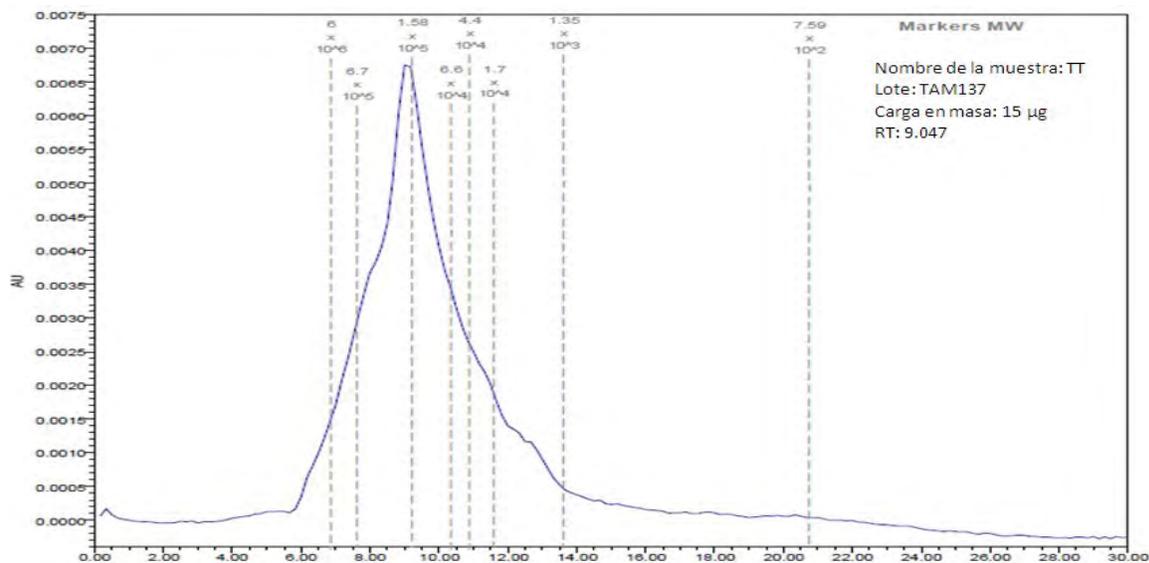


Figura 16. Perfil cromatográfico típico de una muestra de TT por CLAR-FG.

Estudio de integridad estructural a largo plazo para el TT lote: TAM137

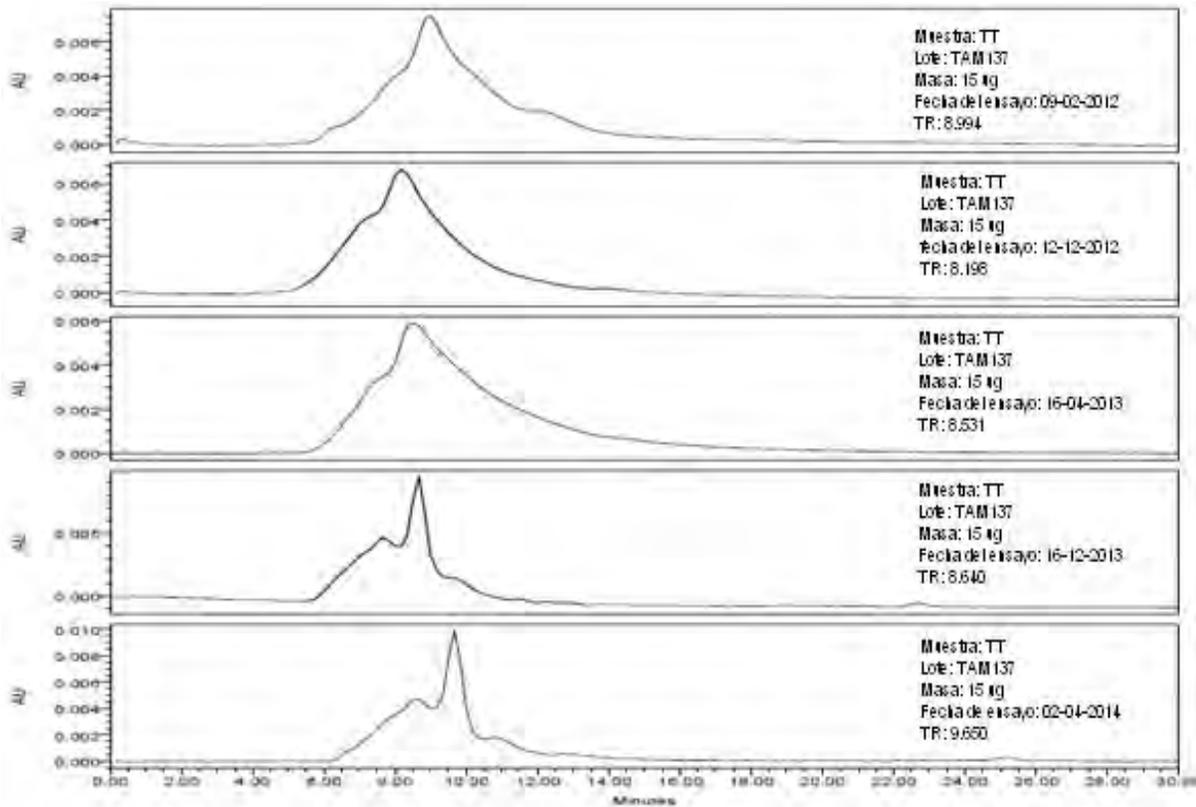


Figura 17. Resultados del estudio de integridad estructural para el TT a los 0, 8, 14, 20, 26 meses de almacenamiento.

Tabla 9. Datos obtenidos para el TT del lote: TAM137

Periodo	Nombre de la muestra y lote	Fecha de ensayo	Área bajo la curva menos área basal	Porcentaje (%)
Inicial	TT (TAM137)	09-02-2012	978426	100
1er periodo	TT (TAM137)	12-12-2012	969885	99.12
2do periodo	TT (TAM137)	16-04-2013	966505	98.78
3er periodo	TT (TAM137)	16-12-2013	884568	90.41
4to periodo	TT (TAM137)	02-04-2014	878972	89.83

Se realizó el estudio de estabilidad a largo plazo para el TT del lote: TAM137 con fecha de manufactura de noviembre del 2007, durante dos años y dos meses, para establecer el perfil cromatográfico de integridad estructural, bajo condiciones controladas de temperatura durante el almacenamiento. La muestra stock permaneció en refrigeración a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y solo salió del refrigerador en el momento de preparar la dilución de la misma.

Las muestras se corrieron por triplicado para cada periodo y no presentaron diferencias significativas entre inyecciones ($\text{CV} = 0.8\%$) mostrando buena repetibilidad. En el ensayo inicial (09-02-12) se observa el perfil característico para el TT con un T_R de 8.994 min, para el primer periodo (12-12-12) existe una pequeña diferencia, una disminución en el T_R (8.198 min.) para el TT, para el siguiente perfil correspondiente al 2do periodo (16-04-13) se observa que la conformación en la estructura se mantiene sin presentar cambios significativos en el perfil y con un mínimo aumento en el T_R 8.531 min, posteriormente se observa para el tercer periodo (16-12-13) una notoria agregación proteica al 20° mes del estudio con un T_R de 8.640 min, sin embargo, el perfil muestra una separación entre los compuestos más pesados y los de menor masa molecular. Para el último periodo (02-04-14) continua el efecto de la separación entre los compuestos más pesados y los de menor masa molecular, el T_R de 9.650 min indica que existe una fragmentación acentuándose esta separación al final del estudio de integridad. Los valores de la Tabla 9 muestran que el patrón de masas moleculares para el TT se mantiene homogéneo en área para los primeros tres periodos de análisis, seguido de un decremento en el área bajo la curva de casi 9% para los dos últimos periodos, lo que indica una variación de la estabilidad en la estructura proteica del TT conforme al tiempo de almacenamiento, dando una tasa de degradación promedio cercana al 5% anual.

Ensayo de integridad estructural a diferentes temperaturas para la muestra del TT lote: TAM137

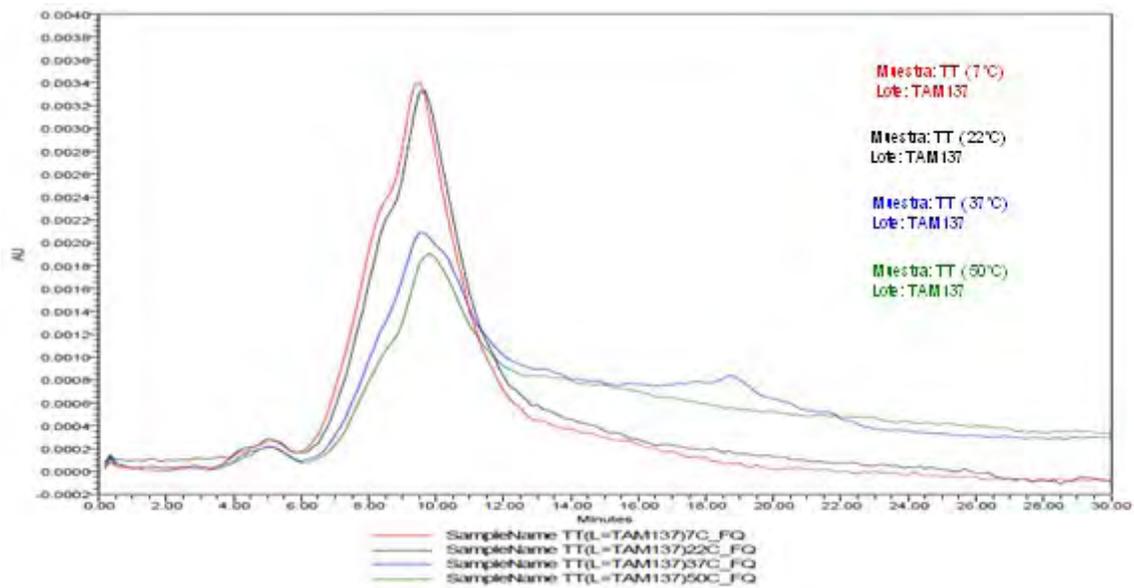


Figura 18. Resultados del estudio de integridad estructural para el TT sometido a 4 diferentes temperaturas.

Tabla 10. Datos de las muestras de TT sometidas a incubación a diferentes temperaturas.

Temperatura	Nombre de la muestra y lote	Tiempo de Retención (min)	Área bajo la curva menos área basal	Porcentaje (%)
7°C	TT (TAM137)	9.529	879702	100
22°C	TT (TAM137)	9.562	862361	98.03
37°C	TT (TAM137)	9.653	853461	97.02
50°C	TT (TAM137)	9.761	834779	94.89

Se realizaron ensayos con la proteína del TT con el objetivo de determinar la influencia de la temperatura en el almacenamiento de dicha proteína, evaluando cuatro temperaturas diferentes en el almacenamiento (7, 22, 37 y 50°C) durante 7 días en incubación. Los perfiles cromatográficos revelan que la proteína mantiene la estructura nativa a 7 y 22 °C, y las muestras sometidas a 37 y 50°C presentan un cambio significativo en los cromatogramas, como se observa, (figura 18) una disminución en la intensidad de la señal y un lomo del lado

derecho del pico por fragmentación de la proteína a compuestos de menor masa molecular. Los valores del área bajo la curva mostrados en la Tabla 10 indican que la cantidad de proteína aplicada para todos los ensayos permanece dentro de un rango aceptable de cuantificación $\pm 6\%$, a pesar de que una parte de la masa de la proteína se transforme a compuestos de menor masa molecular al perder la integridad en su estructura por efecto de la temperatura de exposición. Este ensayo muestra las condiciones a las que debe ser almacenada para que no se vea comprometida la integridad en su estructura para nuestra proteína acarreadora.

Estudio de Integridad Estructural a largo plazo para el conjugado M-TT lote: 2

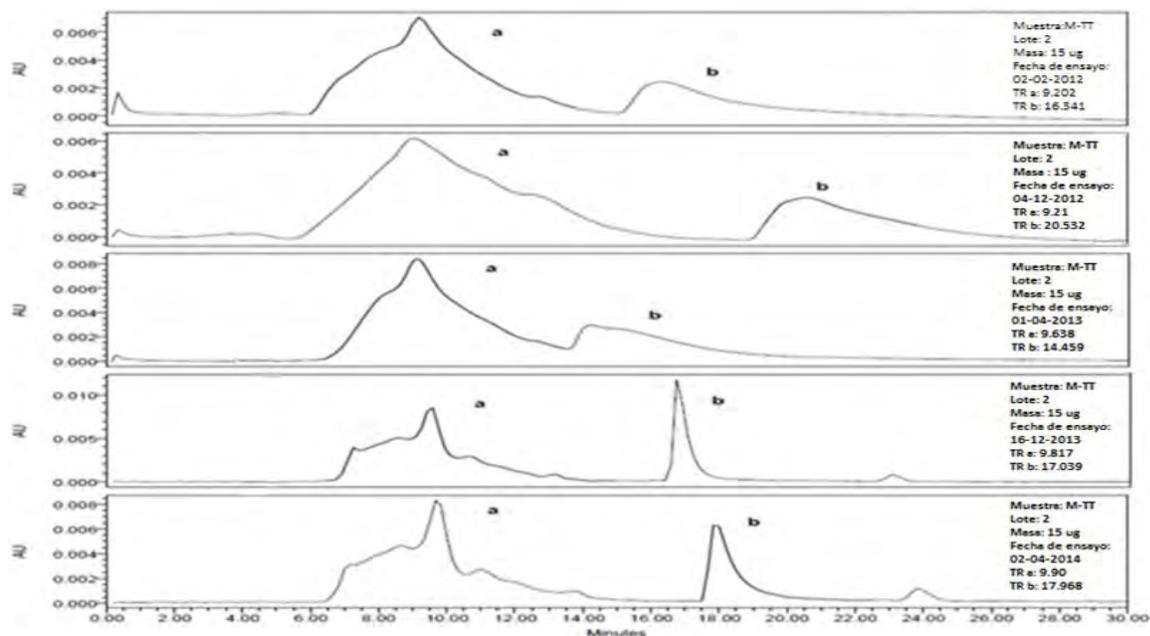


Figura 19. Resultados del estudio de integridad estructural para el conjugado M-TT lote: 2.

Tabla 11. Datos obtenidos para el conjugado M-TT lote: 2

Periodo	Nombre de la Muestra y lote	Fecha de ensayo	Área bajo la curva menos área basal	Porcentaje (%)
1er periodo	M-TT (2)	02-02-2012	1535435	100
2do periodo	M-TT (2)	04-12-2012	1512119	98.48
3er periodo	M-TT (2)	01-04-2013	1487965	96.91
4to periodo	M-TT (2)	16-12-2013	1481183	96.47
5to periodo	M-TT(2)	02-04-2014	1475382	96.09

Una vez que se logró acoplar el hapteno (derivado de opiáceo) a la proteína acarreadora (TT-TFCS-NH₂) con un método eficiente de acoplamiento y rendimientos altos en la conversión para dicha conjugación hapteno-proteína (M-TT), se realizó un lote (lote: 2) con el tamaño

adecuado para ser evaluado en varios aspectos relacionados con su actividad inmunoprotectora y su estructura.

Se realizó el estudio de integridad estructural a largo plazo para el conjugado M-TT lote: 2 (sintetizado el 09-Mayo-2011) durante dos años y dos meses, con la finalidad de establecer el perfil cromatográfico y posteriormente realizar controles periódicos para determinar la integridad estructural del conjugado, bajo condiciones controladas de temperatura durante el almacenamiento. La muestra stock se mantuvo en refrigeración a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y solo salió del refrigerador en el momento de la preparación de la dilución para su análisis cromatográfico.

El análisis a largo plazo llevado a cabo, para todos los ensayos, muestra un patrón de masas moleculares similares, donde se observa un pico mayoritario (**a**) correspondiente a la proteína del conjugado M-TT y otro pico (**b**) en menor proporción, este compuesto aún no se ha identificado. La CLAR-FG bajo las condiciones de trabajo establecidas, presenta al inicio del estudio (02-02-12) una separación entre compuestos macromoleculares correspondiente a la proteína del TT y compuestos de baja masa molecular que presenta elementos detectables a la longitud de onda establecida. Para el segundo periodo (04-12-12) se observa una fragmentación general en el perfil, en menor grado para el pico “**a**” que para el pico “**b**” que eluye en el volumen de inclusión de la columna. Para el tercer periodo (01-04-13) se aprecia una agregación considerable para ambos compuestos, ésto se ve reflejado en los T_R para ambos picos en comparación con el periodo anterior, sin embargo, es más notoria la diferencia de 6 minutos para el compuesto de baja masa molecular pico **b**. Para el cuarto periodo (16-12-13) se observa que el perfil muestra buena separación de los diferentes compuestos y presenta una eficiencia mayor. El pico “**a**” de mayor masa molecular mantiene la conformación estructural al periodo anterior y es muy similar en T_R , sin embargo, para el pico “**b**” se aprecia una ligera fragmentación debido al tiempo de almacenamiento y aparece un tercer pico en el volumen de inclusión. Para el quinto periodo (02-04-14), se observa un patrón en el perfil de masas moleculares muy similar al periodo anterior pero se observa una diferencia en los T_R para los compuestos **a** y **b**, debido a la fragmentación de ambos compuestos detectados en el ensayo del conjugado en el cual, también se detecta un tercer pico. De acuerdo con los datos de las áreas bajo la curva como se muestra en la Tabla 11. Se mantiene dentro de un rango el mismo patrón de masas moleculares para todas las muestras, con una variación mínima del 4% al final de los ensayos en comparación a la inicial, lo que indica que las modificaciones que se observan en los perfiles son debido al tiempo de almacenamiento e inherentes a la formulación.

Ensayo de integridad estructural a diferentes temperaturas para la M-TT lote: 2

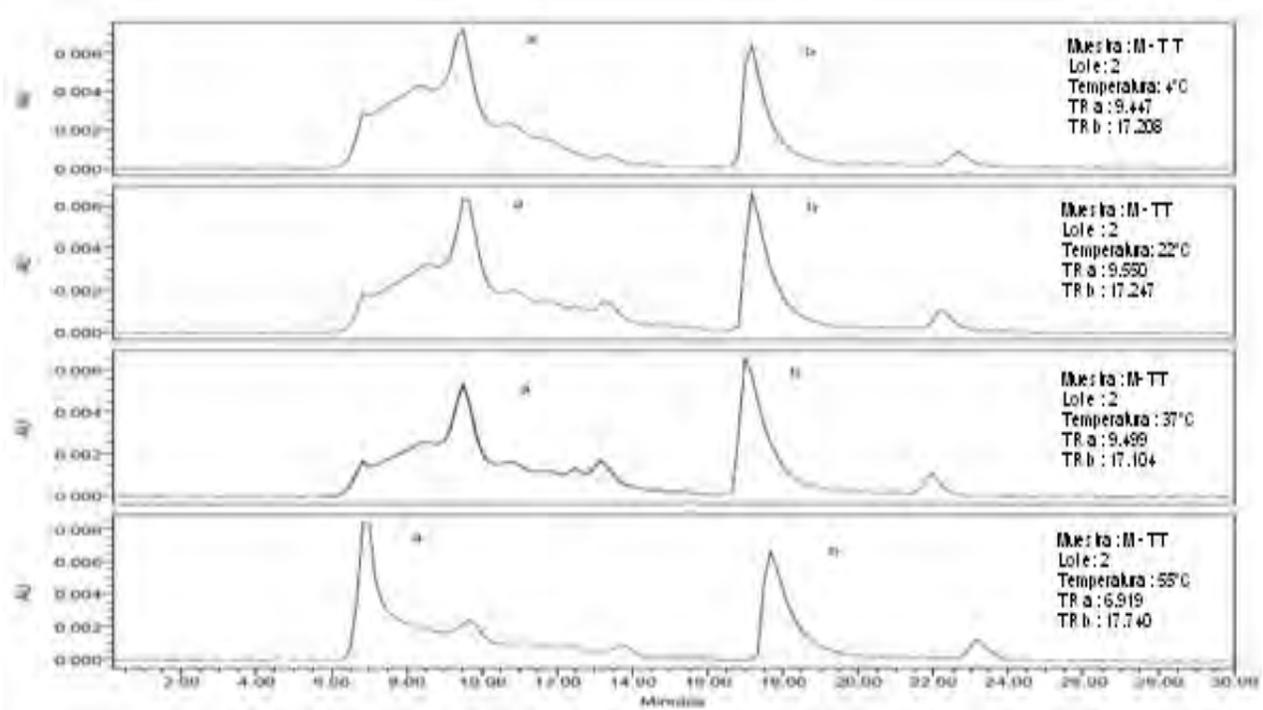


Figura 20. Resultados en stack del estudio de integridad estructural para el conjugado M-TT lote: 2.

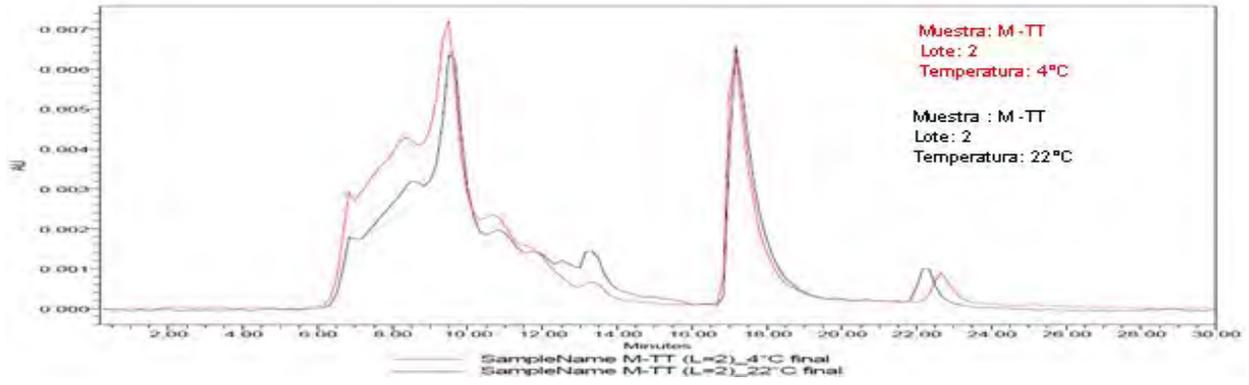


Figura 21. Muestra M-TT_4°C en comparación con M-TT_22°C

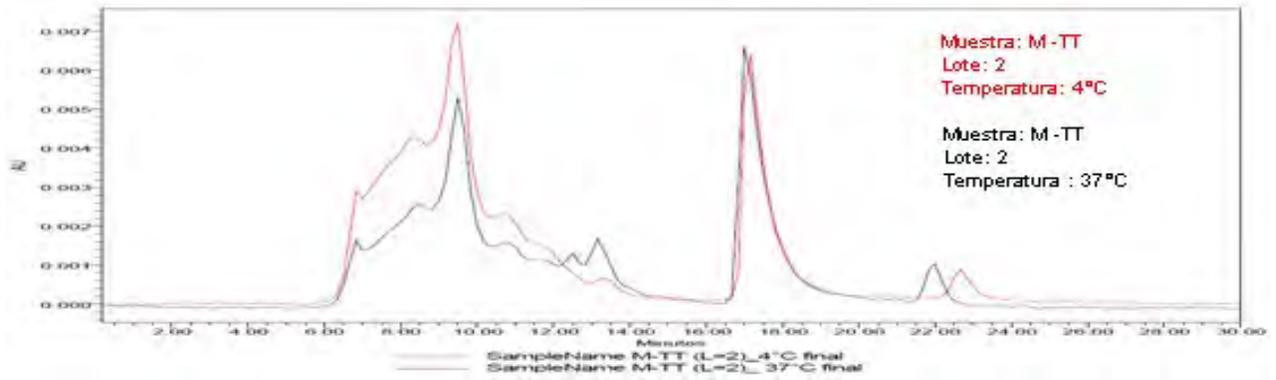


Figura 22. Muestra M-TT_4°C en comparación con M-TT_37°C

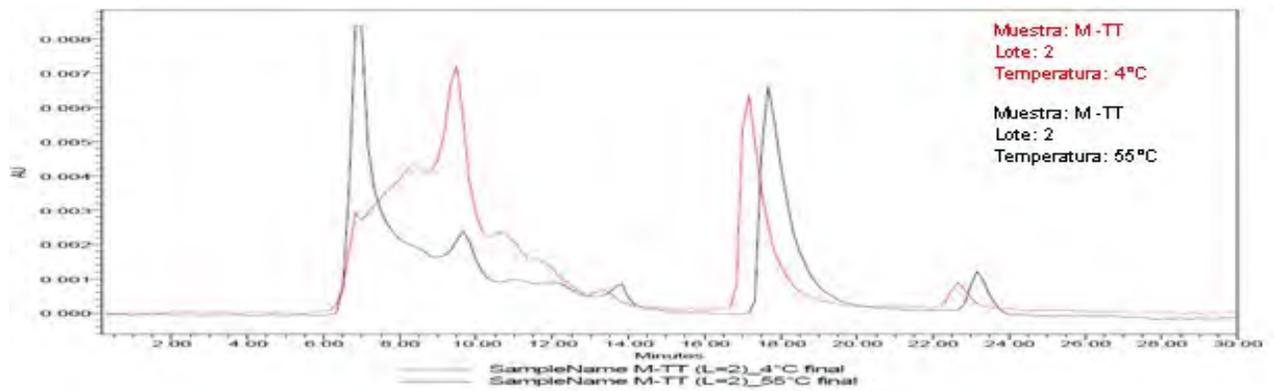


Figura 23. Muestra M-TT_4°C en comparación con M-TT_55°C

Tabla 12. Datos de las muestras de M-TT sometidas a diferentes temperaturas.

Temperatura	Nombre de Muestra y lote	Tiempo de Retención (min)		Área bajo la curva menos área basal	Porcentaje (%)
		T _R a	T _R b		
4°C	M-TT (2)	9.447	17.208	1497425	100
22°C	M-TT (2)	9.550	17.247	1416842	94.62
37°C	M-TT (2)	9.493	17.104	1326155	88.56
55°C	M-TT (2)	6.919	17.740	1323382	88.37

En los cromatogramas mostrados anteriormente (Figura 20) se observan cuatro muestras analizadas con el método desarrollado por CLAR-FG para la proteína del TT y el conjugado M-TT lote: 2, el cual fue sometido a 4 diferentes temperaturas.

Como control se tomó la muestra del conjugado almacenada a 4°C del último periodo del estudio de integridad a largo plazo ya que se agotó la muestra del lote para realizar el ensayo de integridad estructural a diferentes temperaturas, considerándose como la temperatura óptima de almacenamiento como se determinó en los ensayos de integridad estructural para la proteína del TT mostrado anteriormente.

Se observa el perfil característico para el conjugado M-TT en la Figura 21 en comparación con el ensayo realizado a 22°C el cual mantiene el perfil, al parecer no tiene efecto en la estructura del conjugado, sin embargo, se observa un pequeño cambio por fragmentación en el lado derecho del pico **a** de dicho cromatograma, este efecto se ve más acentuado y es más notorio en la muestra incubada a 37°C (Figura 22), lo que sugiere que, el conjugado expuesto a esta temperatura por un periodo de siete días, produce la fragmentación que modifica el perfil produciendo un lomo del lado derecho del pico correspondiente a la proteína. Finalmente se observa en la muestra sometida a los 55°C después de siete días de incubación (Figura 23) se presenta un fenómeno de agregación y desnaturalización proteica para el compuesto de mayor masa molecular por la interacción entre biomoléculas y el medio acuoso, de continuar la exposición de la muestra a esta temperatura daría como resultado una precipitación de la misma. Para el pico de menor masa molecular se pudo apreciar una fragmentación que puede atribuirse a la desestabilización por la temperatura de exposición.

Discusión

El objetivo principal de la presente tesis es proporcionar datos para demostrar de manera experimental las condiciones de temperatura en el almacenamiento para que la proteína purificada del TT y su conjugado dirigido contra sustancias adictivas sea mínimamente afectada. Así como determinar la temperatura a la cual la proteína acarreadora se ve comprometida en su conformación estructural. Ya que no se encuentra bibliográficamente resultado alguno de integridad estructural estudiado por cromatografía de líquidos de alta resolución en filtración en gel para el toxoide tetánico.

La técnica descrita fue evaluada de acuerdo con las necesidades del proyecto de investigación para llevar un control analítico para el TT utilizado en una formulación de un inmunógeno dirigido contra sustancias adictivas. Se evaluó el rango de separación para la columna Shodex KW-803, inyectando una mezcla de proteínas patrón, como marcadores de masas moleculares mostrando tener un rango de permeación entre 6×10^6 a 759 Da como se muestra en la Figura 15, de acuerdo con la curva de calibración calculada a partir de los datos obtenidos con un $R^2 = 0.9815$ que resulta apropiado para el análisis de la proteína del TT y compuestos derivados de acuerdo al análisis para la caracterización del TT, tomando en cuenta que actualmente no existe una columna analítica para CLAR-FG con un rango mayor de exclusión molecular para proteínas. Sin embargo, el resultado no permite dilucidar si la estructura del toxoide está compuesta por dos cadenas una pesada y una ligera, ya que durante el método de detoxificación se llevaron a cabo reacciones entre la toxina y derivados de péptidos del medio, lo que resulta en la modificación y aumento, por adición de péptidos en la masa molecular.

En base a los perfiles cromatográficos obtenidos, mostrados anteriormente en la Figura 17, se demuestra que, a la temperatura controlada durante el almacenamiento, en un rango de 2 a 6 °C, la proteína del TT, mantuvo su integridad estructural sin presentar cambios significativos en el perfil para el primer y segundo periodo con mínima reducción en los T_R , esto debido a las interacciones de compuestos proteínicos en disolución, estas interacciones intermoleculares dan como resultado la agregación proteica. Para el tercer y cuarto periodo del estudio de integridad estructural, el perfil presenta una separación entre los compuestos más pesados y los de menor masa molecular de la proteína, debido a la agregación proteica de los compuestos más pesados por efecto del tiempo en almacenamiento. Una de las causas a estas diferencias se pueden atribuir a que no fue controlada la temperatura de la columna,

ya que los ensayos se realizaron a temperatura ambiente, porque no se cuenta con un horno para controlar la temperatura de la columna, y dado que los valores están relacionados a la concentración de la muestra y la señal de absorbancia esto puede atribuirse a la preparación de la dilución, al volumen de inyección o a la pérdida por degradación de la muestra al concluir el estudio de integridad estructural después de dos años y dos meses. Con una variación de alrededor del 9%, sin embargo, tomando en cuenta que de la fecha de manufactura reportada por el fabricante hasta concluido este estudio de integridad estructural a largo plazo, han transcurrido seis años con cinco meses, lo que se puede considerar aceptable para la estabilidad estructural de la proteína purificada del TT tomando en cuenta su alta masa molecular y la conservación de la proteína en disolución.

Para evaluar el efecto de una exposición prolongada a temperaturas mayores de la temperatura óptima de almacenamiento ($4 \pm 2^\circ\text{C}$), se sometió al TT a cuatro temperaturas diferentes en el almacenamiento (7, 22, 37 y 50°C) durante 7 días en incubación. Los perfiles cromatográficos revelan que la proteína mantiene la estructura nativa a 7 y 22°C , y las muestras sometidas a 37 y 50°C presentan un cambio significativo en los cromatogramas, ésto debido a la temperatura a la que fueron expuestas. Al elevarse la temperatura la energía cinética de las moléculas aumenta con lo que se desorganiza la envoltura acuosa de las proteínas, y se produce una desorganización en la estructura de la proteína, de forma que al desdoblarse el interior hidrofóbico interacciona con la matriz de la columna y se produce el cambio en el perfil de la proteína. El decremento del área bajo la curva, a la mayor temperatura de exposición, se cuantifica alrededor de 5% menos que a condiciones óptimas de almacenamiento, ésto puede deberse a la degradación de la proteína y preparación e inyección de la misma.

En el estudio a largo plazo para el conjugado (M-TT L=2) mostrado anteriormente (Figura 19) se observa dos compuestos el pico “a” correspondiente al conjugado y el pico “b” un compuesto de baja masa molecular, lo que sugiere un producto derivado de la reacción al realizarse el acoplamiento del hapteno con la proteína (M-6-H/ EDC + TT-TFCS-NH₂). En el segundo periodo se observa una fragmentación en general, esta diferencia puede ser a una menor temperatura a la que se corrió la muestra en comparación con el análisis anterior. Para el tercer periodo se observa una agregación para ambos compuestos más marcada para el pico “b”, ésto puede deberse a que las proteínas en disolución forman agregados cuando son almacenadas largos periodos de tiempo por el efecto de la interacción entre biomoléculas en un medio acuoso. Para los periodos cuarto y quinto se aprecia una fragmentación y un tercer

pico en el volumen de inclusión, lo que sugiere que podrían ser trazas de fragmentos del conjugado, esto debido al tiempo en almacenamiento del conjugado en disolución, y a la descomposición inherente a la propia formulación. En los datos mostrados en la tabla 11 se indica que la cantidad de masa aplicada es la misma para todos los ensayos y que el perfil varía conforme al tiempo. Con lo que se demuestra que la formulación tiende a fragmentarse y agregarse por los efectos entre las interacciones intermoleculares y el medio de disolución manteniéndola en refrigeración a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, lo que afecta directamente a la integridad estructural del conjugado M-TT que varía por acción del tiempo de almacenamiento.

Al someter el conjugado M-TT a 22, 37, y 55°C , el estudio reveló que a la temperatura de 22°C existe indicio de modificación en la estructura de la proteína sin resultar en fragmentación, para la muestra sometida a 37°C se observó una fragmentación acelerada, y por último la agregación y desnaturalización proteica a temperatura de 55°C que de prolongarse daría como resultado la precipitación de la proteína. Esto se puede atribuir a que cuando la temperatura es elevada aumenta la energía cinética de las moléculas con lo que se desorganiza la envoltura acuosa de las proteínas responsable de neutralizar las cargas dando estabilidad a la estructura de la proteína, resultando en un desdoblamiento, este aumento en la temperatura destruye las interacciones débiles y desorganiza la estructura de la proteína, de forma que se produce la una fragmentación seguido de la desnaturalización proteica. Ya que las formulaciones que contienen toxoides presentan el fenómeno de perder la capacidad inmunizante de manera acumulativa, se demuestra que una vacuna o conjugado que haya sido expuesto a temperaturas mayores de 37°C por un periodo de siete días perderá su conformación estructural relacionada con la capacidad inmunizante.

Se utilizaron dos columnas para realizar los estudios de integridad estructural por razones de uso de cada columna en función de la cantidad de inyecciones soportadas por dicha columna para la proteína del TT así como para el conjugado M-TT, ambas con el mismo límite de exclusión (700000 Da). Se realizaron ajustes en la metodología para las variables de la columna como presión, velocidad de flujo para que no afecte el cambio de una columna a otra los resultados y obtener perfiles con las mismas características, en base a el traslado de características de columna a columna por medio de algoritmos en sistemas computacionales en columnas cromatográficas y poder realizar una comparación de manera eficiente, ya que no varía el área bajo la curva ni el tiempo de retención de los cromatogramas de las muestras por el cambio de columna. Ambas presentan buena resolución para la muestra, sin embargo, la primera presenta una eficiencia más baja que la segunda seguramente por la carga de

trabajo por el uso previo, a diferencia de la segunda la cual no había sido utilizada para análisis previos.

La cromatografía de líquidos de alta resolución por filtración en gel, demostró ser útil como una herramienta para obtener la caracterización de biomoléculas mediante perfiles cromatográficos y así tener antecedentes experimentales para tener controles de pureza y poder realizar el control en la integridad de la estructura proteica y la conservación del TT y su conjugado durante el almacenaje, utilizado para la formulación de un inmunógeno dirigido contra opiáceos.

Conclusiones

Los resultados mostraron que empleando el método diseñado por CLAR-FG logra la caracterización del TT y la M-TT. Para el TT lote: TAM137 un T_R de 9.04 min y para el conjugado M-TT lote: 2 presenta dos compuestos importantes, el primero con T_R **a** 9.202 min y el segundo con T_R **b** 16.341 min. Los ensayos realizados demuestran los cambios en la conformación de la proteína del TT durante el almacenamiento en disolución y a temperatura controlada se muestra paulatinamente el cambio por el fenómeno de agregación a lo largo del estudio (2 años y 2 meses) donde se observa que la mayor área bajo la curva corresponde a compuestos de alta masa molecular y durante el envejecimiento no se producen compuestos de baja masa molecular por fragmentación o proteólisis, por lo que se considera la temperatura óptima de almacenamiento es a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Por otro lado, los estudios realizados a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ no mostraron tener efecto en la integridad de la estructura proteica, sin embargo los ensayos mostraron que después de someter la proteína a temperaturas mayores ($37\text{-}50^\circ\text{C}$) durante una semana presenta una fragmentación acelerada, ya que se observa un decremento en la intensidad de la señal y un corrimiento del T_R a la derecha.

La evaluación del conjugado muestra que la integridad en la estructura varía a lo largo de tres años después de ser formulado, los perfiles cromatográficos muestran una agregación para la estructura proteica (**a**) y fragmentación para los compuestos de menor masa molecular (**b**). El patrón de masas moleculares es muy similar entre ellos, como se reporta en la Tabla 11. Las áreas bajo la curva reportadas demuestran que los cambios en los perfiles son debido a las variaciones inherentes a la formulación ya que existe una constante en la cuantificación con una variación mínima de 6% para la muestra del conjugado analizado. Los perfiles obtenidos para las muestras del conjugado que fueron sometidas a 22°C demuestran que mantiene el mismo perfil y por tanto la estructura no presenta cambios en su conformación. El ensayo para la proteína después de ser sometida a temperatura de 37°C la muestra presenta una modificación en la integridad de su estructura por fragmentación a compuestos de menor masa molecular. En tanto, la muestra sometida a 55°C tiene un efecto de agregación para la estructura que corresponde a la proteína (**a**) y fragmentación para compuestos derivados de menor masa molecular (**b**) debido a las interacciones intermoleculares y del medio por las altas temperaturas.

Perspectivas

Con la implementación del método de CLAR-FG se estableció el precedente para identificar la estructura nativa de la proteína del TT utilizada como inmunógeno en un modelo de vacuna contra opiáceos; ya que la estructura está directamente relacionada con la actividad y formación de anticuerpos, se espera con ésto establecer normas internas de calidad para la evaluación de dicha proteína, así como el producto final. Por lo que se sugiere que se realicen estudios paralelos que evalúen la actividad biológica como es la respuesta inmune humoral, para determinar si la integridad estructural al tiempo ensayado cromatográficamente en el presente trabajo, corresponde de igual forma para la actividad biológica, ya que es el objetivo final de la formulación del conjugado. Asimismo es necesario realizar más estudios como, análisis por espectrometría de masas, microscopía electrónica, y cristalografía de rayos X para determinar la masa molecular y la estructura del conjugado y así poder dilucidar sus posibles mecanismos de acción y sus interacciones con las células del sistema inmune y sistemas endógenos.

REFERENCIAS

1. M. Tswett. "Adsorptions analyse und chromatographische method. Anwendung auf die chemie des chlorophylls" 1906. Ber. Dtsch. Botan.Ges. 24:384-393
2. James A. T. and Martin A. J "A new form of chromatogram employing two liquid phases; A theory of chromatography ; Aplicacion to the micro-detremination of the higher monoamino acids in proteins. Biochem. J. Analyst, 1941; 34: 1358-1368
3. Porath J. and Flodin P. *Gel filtration: a method for desalting and group separation.* Nature, 1959; 183:1657.
4. Lozano M., Ramos J. A. *Utilización de los psicofármacos en psiquiatría de'' enlace.* MASSON, España, 2002.
5. www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/informe_opiaceos.pdf. Consultado el 02 julio 2014.
6. Organización Mundial de la Salud. Neurociencia del consumo y dependencia de sustancias psicoactivas. Washington, D.C: OPS, 2005.
7. Lees, A. *Método para preparar vacunas conjugadas en fase sólida.* 2005 Núm. De publicación: 2237210.
8. Regnier FE. *HPLC of Biological Macromolecules: The First Decade.* Chromatography 1987; 24:241-251
9. Costa, L. et al. *Determinación de la pureza y homogeneidad molecular del antígeno de superficie recombinante del virus de la hepatitis B (AGSHBR) por HPLC por filtración en gel.* Biotecnología Aplicada 1994; Vol. 11 Num.1
10. Rubinson, F.J and Rubinson, K. A. *Química analítica contemporánea.:* Pearson Educación, México. 2000. Págs. 584-670
11. Karger B.L., Snyder L.R. and Horvath C., *An introduction to separation science.* John Wiley and Sons, Canada. 1973

12. Harris, D. *Análisis químico cuantitativo*. 3^a ed. Reverte, S. A, España, 2001. Págs. 607-663
13. Skoog D. A, F. J. Holler y S. R. Crouch., *Principios de Análisis instrumental*, 6a ed., Cengage Learning, México, 2007. Págs. 761-816.
14. Lindsay S. *High Performance Liquid Chromatography*, 2nd ed., John Wiley and Sons, UK, 1992.
15. Howard G.A. and Martin A.J.P. *The separation of the C12C18 fatty acids by reversed phase partition chromatography*, *Biochem J.* 1950; 46:532-538.
16. Snyder L. R., Kirkland J. J. and Glajch J. L., *Practical HPLC method development*, 2nd ed., John Wiley and Sons, USA, 1997.
17. Weston A., Brown P. *HPLC and CE: Principles and Practice* Academic Press, USA, 1997.
18. Wu Ch. *Handbook of size exclusion chromatography and related techniques*, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc. USA, 2004.
19. *Gel filtration: Principles and Methods* Edition A118-1022-18 Amersham Biosciences, USA, 2002.
20. Gooding K. and Regnier F., *HPLC of Biological Macromolecules*, Vol. 51, Chromatographic Science Series, Marcel Dekker Inc., USA, 1990.
21. Hearn M. *HPLC of proteins, peptides and polynucleotides*, VCH Publishers Inc., USA, 1991.
22. Helting, T.B. y Zwisler, O. J. *Biol. Chem.* Structure of tetanus toxin. 1977; 252:187-93
23. Álvarez, Y. y Farré, M. Adicciones. *Farmacología de los opioides*. 2005; Vol. 17, Supl. 2 pàg. 21-40.
24. Flórez, J. *Fármacos analgésicos opiáceos*. *Farmacología Humana* Ed. Mansson-Salvat. Barcelona. 1992.

25. Antón, B. et al. "Special Focus Review. Vaccines against morphine/heroin and its use as effective medication for preventing relapse to opiate addictive behaviors". *Human Vaccines* 2009; 5:4, 214-229
26. Lehninger Principles of Biochemistry. 5^a ed. Freeman, 2009. Caps 3, 4.
27. Garre J. and Grisham. Biochemistry. 4^a ed. 2009. Caps 5, 6.
28. Feduchi. Bioquímica: conceptos esenciales. Panamericana, 2011. Cap 5.
29. Baynes and Dominiczak. Bioquímica Médica. 3^a ed. Elsevier, 2011. Cap 2.
30. Brooks G.F, Carroll K.C, Butel J.S, Morse S.A, *Microbiología médica* de Jawetz, Melnick y Adelberg. 19^o ed. México: El Manual Moderno; 2008.
31. Murray P, Rosenthal K.S, Pfaller M.A, *Microbiología médica*. 5^a ed. Madrid: Elsevier; 2006.
32. Montecucco C. and Schiavo G. *Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins*. Q. Rev. Biophys., 1995; 28:423-472
33. Cruse J.M, and Lewis R.E Jr. *Conjugate Vaccines in Contributions to Microbiology and Immunology*, 1989; Vol. 10.
34. Carrera, M. Ashley, J. "Cocaine vaccines: antibody protection against relapse in a rat model". *Proc. Natl Acad Sci*, 2000; 23: 97 811: 6202-6,
35. Schabacker, D. S, and Kirschbaum K. S, "Exploring the feasibility of an anti-idiotypic cocaine vaccine: analisis of specificity of anticocaine antibodies (Ab1) capable of inducing Ab2 beta antibodies" *Immunology*, 2000; 100(1):48-56.
36. Monografía de Opiáceos. Revista Adicciones. 2005; Volumen 17, suplemento 2.
37. Houen, G. et al., Method for preparing solid phase conjugated vaccine J. *Immun. Meth.* 1997; 206:125.
38. Shine, B., "Nicotine vaccine moves toward clinical trial", *NIDA notes*, 2000; 15(5):1.
39. Manual de Procedimientos Técnicos de vacunación, Secretaría de Salud,002

40. Campaigns (EC) Primary Health Care (PHC) Geneva 2000. World Health Organization. Department of Vaccines and other Biologicals. Temperature monitors for vaccines and the cold chain Cold-chain monitor Vaccine vial monitor Freeze watch TM stop watch TM DT and TT shipping indicator Geneva 1999 WHO/VEtB/99.15.
41. Batalla J, y Martínez M. Estabilidad de vacunas, conservación y manipulación de las vacunas. *Vacunas Invest. Pract* 2002; 2: 58-63.
42. Comité Asesor de Vacunas. AEP. Programa de Actualización de Vacunas. Módulo 1: Aspectos Generales de las Vacunas. Ed. Doyma. Madrid, 2002.
43. Department of Vaccines and others Biologicals. World Health Organization. Testing the correlation between vaccine vial monitor and vaccine potency. Geneva, Suiza. 1999 WHO/VEtB/99.11.
44. Galazka A, Milstien J, Zaffran M. Thermostability of vaccines. Geneva, Suiza. 1998 WHO/GPV/98.07.
45. Guía para el desarrollo y presentación de los estudios de estabilidad de medicamentos; Ministerio de Protección Social. Colombia. 1994
46. Moore, D.E. *J. of Pharmaceutical Sciences*, 65, 1447 (1976); 66, 1282 (1977); 72, 180 (1983).
47. Carstensen J.T., Franchini M. y Ertel K, "Statistical Approaches to Stability Protocol Design", *J.Pharm.Sci.* 1992; 81, (3), 303-308.
48. Manual de procedimientos técnicos de vacunación, Secretaría de Salud. Vol. 14 Núm. 80. 2006.
49. Guía de validación de métodos analíticos. Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C. 1ra Ed. Mayo de 2002.

Glosario de términos

Adicción: En la actualidad se acepta como adicción cualquier actividad que el individuo sea incapaz de controlar, que lo lleve a conductas compulsivas y perjudique su calidad de vida. En este mismo plano, se encuentra el alcoholismo, la drogodependencia, la adicción a la comida (comedores compulsivos) y el tabaquismo, que conducen a un estado psicofisiológico, caracterizado por la modificación del comportamiento, a causa de un impulso irreprimible por consumir una droga o sustancia. No obstante, esta es la definición puramente bioquímica.

Es una conducta impulsiva e irresistible a ejecutar algo irracional o contrario a la voluntad de quien lo ejecuta. Es un padecimiento o síndrome, que presenta un cuadro muy exuberante de signos y síntomas característicos dependiendo de la sustancia adictiva. Existen adicciones tanto a sustancias químicas, vegetales, así como a actividades y hasta a ciertas relaciones interpersonales.

Analito: Es una especie química cuya presencia o contenido se desea conocer, identificable y cuantificable, mediante un proceso de medición química.

Antigenicidad: Propiedad que tiene una sustancia de reaccionar con anticuerpos o con receptores de células previamente formados, pero no es capaz de inducir una respuesta inmune.

Cambio significativo: Al cambio en las propiedades cualitativas y/o cuantitativas del parámetro a evaluar final con respecto al primer análisis (medición inicial) bajo las mismas condiciones.

Cromatografía: Método usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en el cual los componentes son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido soportado en un sólido o en un gel (matriz). La fase estacionaria puede ser empaquetada en una columna, extendida en una capa, distribuida como una película. Es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. Al colocar los componentes de la muestra que se va a separar se distribuye entre dos fases, una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria) mientras la otra (la fase móvil) se mueve en una dirección definida. Las diferencias sutiles en el coeficiente de partición de los compuestos da como resultado una retención diferencial sobre la fase estacionaria y por tanto una separación efectiva en función de los tiempos de retención de cada componente de la mezcla.

La cromatografía puede cumplir varias funciones que no se excluyen mutuamente como: Separar los componentes de la mezcla, para obtenerlos puros y que puedan ser usados posteriormente. Identificar compuestos de interés, puede consistir en un simple componente o una mezcla de varios y medir la proporción de los componentes de la mezcla. En este caso, las cantidades de material empleadas son pequeñas.

Cromatograma: Es el resultado gráfico de la cromatografía. En el caso de separación óptima, los diferentes picos del cromatograma se corresponden a los componentes de la

mezcla separada. En el eje X se representa el tiempo de retención, y en el eje Y una señal obtenida del detector correspondiente a la respuesta creada por los diferentes analitos existentes en la muestra. En el caso de un sistema óptimo, la señal es proporcional a la concentración del analito específico separado.

Eluyente: Sustancia que se utiliza como fase móvil en la separación de componentes en una mezcla. Es la fase móvil que atraviesa la fase estacionaria para llevar a cabo la elución de la muestra.

Epítopo: Determinante antigénico. Es el lugar donde se une el anticuerpo.

Estabilidad: La capacidad de un fármaco o un medicamento de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene durante su periodo de vida.

Especificidad: Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

Fase estacionaria: Consiste en partículas, generalmente sólidas, pequeñas y con una superficie microporosa, de forma que presenta un amplio desarrollo superficial. Puede estar empaquetada en forma de columna o extendida en forma de capa. En ocasiones es necesario un tratamiento químico de la fase estacionaria para conseguir unas partículas de tamaño y poro adecuados. Existen una gran variedad de compuestos utilizados como fase estacionaria, de acuerdo con las necesidades y características del componente o sustancia de interés.

Fase móvil: Puede ser un líquido, gas o un fluido supercrítico. Es la fase que es impulsada por un sistema de bombeo y se mueve en una dirección definida. La fase móvil consiste en la muestra que está siendo separada y/o analizada y el disolvente. En CLAR la fase móvil se mueve a través de la columna de cromatografía (fase estacionaria) de forma que la muestra interacciona con la fase estacionaria y se separa. Puede estar compuesta de diferentes sustancias o de una sola, la elección de las propiedades de la fase móvil depende de la muestra a analizar y del sistema cromatográfico utilizado para llevar a cabo dicho análisis.

Hapteno: Es una sustancia química de pequeño peso molecular (menos de 10.000 daltones) que no induce por sí misma la formación de anticuerpos, pero al unirse a una proteína transportadora como la albúmina estimula una respuesta inmunitaria. En resumen, un hapteno es la parte de un antígeno que por sí sola no dispara la respuesta inmune, pero sí posee especificidad.

Los haptenos son antigénicos pero incapaces de inducir por sí mismas una reacción inmunitaria específica, es decir, tienen antigenicidad pero no son inmunogénicos. El acoplamiento químico de un hapteno a una proteína inmunógena grande, llamada acarreador, genera un conjugado hapteno-portador inmunógeno. La inmunización con tal conjugado produce anticuerpos específicos para tres tipos de determinantes antigénicos, anticuerpos contra el hapteno (principalmente), anticuerpos contra el portador y anticuerpos contra el hapteno y el portador.

Inmunogenicidad: Propiedad que tiene una sustancia para inducir una respuesta inmune, es decir, a la capacidad que tiene el sistema inmunitario de reaccionar frente a un estímulo bioquímico de naturaleza generalmente proteica.

Linealidad del sistema: Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

Límite de cuantificación: Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas

Límite de detección: Concentración mínima del analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas

Muestra: Constituye una parte representativa del objeto, tomada en el espacio y el tiempo. Debe contener la(s) alícuota(s) de interés. Es lo que realmente se somete al proceso analítico.

Opiáceo: Se refiere a los alcaloides presentes en el opio y a los derivados naturales y semi-sintéticos de la morfina.

Opioide: es cualquier agente que se une a receptores opioides situados principalmente en el sistema nervioso central y en el tracto gastrointestinal.

Precisión: Expresa la reproducibilidad de una medida, es decir la concordancia entre varias medidas sobre alguna propiedad, hechas a una población o muestra.

Repetibilidad: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.

Tiempo de retención: Es el tiempo característico que tarda un analito particular en pasar a través del sistema (desde la columna de entrada hasta el detector) bajo las condiciones fijadas.

Toxoide: A la toxina que ha sido tratada con productos químicos o calor, a fin de perder su efecto tóxico, pero que conserva su inmunogenicidad.

Vacuna: Son un preparado de antígenos que una vez dentro del organismo provoca la producción de anticuerpos y con ello una respuesta de defensa ante agentes potencialmente dañinos como microorganismos patógenos. Esta respuesta genera, en algunos casos, cierta memoria inmunitaria produciendo inmunidad transitoria frente al ataque patógeno correspondiente. Son aplicados a individuos con el objeto de inducir inmunidad activa protectora contra la enfermedad correspondiente. Existen varios tipos de vacunas como son: las vacunas inactivadas, vivas atenuadas, acelulares, recombinantes de subunidad, vacunas utilizando toxoides, las vacunas polisacarídicas,

de vector recombinante, vacuna de ADN y las vacunas sintéticas están compuestas en parte o completamente de péptidos, carbohidratos o antígenos.

Vida útil de los biológicos: Es el periodo de vigencia de los productos biológicos determinado por esta norma en los diferentes niveles de la cadena de frío, o en su fecha de caducidad si ésta ocurre antes.