



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

**SEPARACIÓN DE ISÓMEROS DE ESPERMIDIN-COLESTEROL
MEDIANTE HPLC DE FASE REVERSA PARA SU USO EN LA
FABRICACIÓN DE NANOVESÍCULAS CATIONICAS
TRANSPORTADORAS DE FÁRMACOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

**PRESENTA:
CAYETANO HERNÁNDEZ DAISY MAURA**

JURADO DE EXAMEN:

**DIRECTOR: DR. BENNY WEISS STEIDER
ASESORA: DRA. MARIA TERESA CORONA ORTEGA
ASESOR: DR. ADELFO NATALIO REYES RAMÍREZ
SINODAL: DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
SINODAL: MTRA. LETICIA HUERTA FLORES**



CIUDAD DE MÉXICO

ABRIL 2023



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.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular y Cáncer bajo la dirección y asesoramiento de Dra. Ma. Teresa Corona Ortega, Dr. Benny Weiss Steider y Dr. Leonardo Trujillo Cirilo; y en el Laboratorio de Síntesis Farmacéutica bajo la dirección y asesoría del Dr. Adelfo Natalio Reyes Ramírez y el Mtro. Fernando Rivera Sánchez.

A la Dra. Ma. Teresa Corona Ortega, por permitirme formar parte de su proyecto, por todas las observaciones y enseñanzas a lo largo de la realización de este trabajo, al Dr. Adelfo N. Reyes Ramírez y el M. en C. Fernando Rivera Sánchez, por su tiempo y apoyo.

A los miembros del jurado por las observaciones realizadas y sus sugerencias para el mejoramiento de este escrito.

A la UNAM, por abrirme sus puertas y por todo lo brindado en mi formación como universitaria.

El desarrollo de esta tesis fue financiado en su totalidad con recursos del proyecto PAPIIT IN216521 “Desarrollo de un sistema liposomal para la liberación sitio específico de D-Penicilamina contra artritis reumatoide”, por lo que se agradece el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México.

DEDICATORIAS

A mi familia, todos mis logros son suyos también, su cariño y apoyo incondicional me han formado.

“Era el material del Cosmos contemplándose a sí mismo. Cuestionó la enigmática y problemática cuestión de su futuro. Se llamó a sí mismo humano.”

Carl Sagan, Cosmos

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. MARCO TEÓRICO.....	13
2. 1 Lípidos anfipáticos	13
2.2 Liposomas.....	13
2.2.1 Liposomas catiónicos.....	15
2.4 Espermidin-colesterol.....	17
2.3 Isómeros	18
2.5 HPLC	20
2.5.1 Tipos de HPLC.....	20
2.5.2 Equipo.....	22
2.5.3 Parámetros cromatográficos.....	24
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
4. OBJETIVOS	30
5. HIPÓTESIS	31
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	32
6.1 Tipo de estudio.....	32
6.2 Población objetivo.....	32

6.3 Población de estudio.....	32
6.4 Criterios de inclusión.....	32
6.5 Criterios de exclusión.....	32
7. DESARROLLO EXPERIMENTAL	33
7.1 Materiales	33
7.2 Reactivos	33
7.3 Equipos e instrumentos.....	34
7.4 Metodología	35
7.4.1 Preparación de disoluciones de la fase móvil	35
7.4.2 Determinación de condiciones del análisis cromatográfico.....	35
7.4.3 Determinación de fase móvil y gradiente a utilizar.....	36
7.4.4 Preparación de la muestra y solubilización de espermidin-colesterol	37
7.4.5 Perfil cromatográfico de los lípidos de espermidin-colesterol a las condiciones optimizadas.....	40
7.4.6 Purificación de espermidin-colesterol por cromatografía en columna de sílica gel.....	41
8. RESULTADOS.....	43
8.1 Determinación de fase móvil y gradiente	43
8.1.1 Elución sin gradiente.....	43
8.1.2 Elución con gradiente	46

8.2 Preparación de la muestra y solubilización de espermidin-colesterol	49
8.3 Perfil cromatográfico por HPLC de fase reversa de los lípidos de espermidin-colesterol a las condiciones optimizadas	53
8.4 Purificación de espermidin-colesterol por cromatografía en columna de sílica gel	59
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	81
9.1 Determinación de fase móvil y gradiente a utilizar	81
9.1.1 Elución sin gradiente.....	81
9.1.2 Elución con gradiente	82
9.2 Preparación de la muestra y solubilización de espermidin-colesterol.	86
9.3 Perfil cromatográfico por HPLC de fase reversa de los lípidos de espermidin-colesterol a las condiciones optimizadas	86
9.4 Purificación de espermidin-colesterol por cromatografía en columna de sílica gel	94
10. CONCLUSIONES.....	98
11. PERSPECTIVAS.....	100
12. REFERENCIAS.....	101

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de liposomas según su número de capas.	14
Tabla 2. Principales tipos de HPLC.	20
Tabla 3. Condiciones del análisis por HPLC del espermidin-colesterol lípido A y B	36
Tabla 4. Composición de la fase móvil para la elución isocrática y con gradiente.....	36
Tabla 5. Preparación de viales para la elución isocrática y con gradiente.....	37
Tabla 6. Disolventes y mezclas usadas para probar la solubilidad del espermidin-colesterol.	38
Tabla 7. Proporciones de butanol con fase móvil, utilizadas para probar la miscibilidad del butanol en el sistema cromatográfico.....	38
Tabla 8. Disoluciones de butanol/isopropanol a diferentes proporciones utilizadas para probar su miscibilidad y la solubilidad del espermidin-colesterol en c/u de ellas.	39
Tabla 9. Disoluciones de butanol/diclorometano a diferentes proporciones utilizadas para probar su miscibilidad y la solubilidad del espermidin-colesterol en c/u de ellas.	39
Tabla 10. Proporciones de butanol/DCM/fase móvil preparadas para probar su miscibilidad y la solubilidad del espermidin-colesterol en cada una de ellas.....	40
Tabla 11. Preparación de viales para el análisis cromatográfico del espermidin-colesterol con las muestras disueltas, en una elución con gradiente.....	40
Tabla 12. Resultados de las pruebas de solubilidad del espermidin-colesterol, lípido A y B.	49
Tabla 13. Miscibilidad de las dos proporciones de butanol/fase móvil y solubilidad del espermidin-colesterol, Lípido A y B, en dichas proporciones.	50
Tabla 14. Miscibilidad de cinco proporciones de butanol/isopropanol y solubilidad del espermidin-colesterol, lípido A y B, en dichas proporciones.	51
Tabla 15. Miscibilidad de cinco proporciones de butanol/DCM y solubilidad del espermidin-colesterol, lípido A y B, en dichas proporciones.	51
Tabla 16. Miscibilidad de dos proporciones de butanol/DCM/fase móvil y solubilidad del espermidin-colesterol, lípido A y B, en dichas proporciones.	52

Tabla 17. Comparación de espectros UV, cálculo de porcentaje y resolución de los picos de espermidin-colesterol presentes en los cromatogramas del lípido A (2017) disuelto en fase móvil, elución con gradiente.....	85
Tabla 18. Comparación de los espectros UV, cálculo de porcentaje y resolución de los picos de espermidin-colesterol presentes en los cromatogramas de los lípidos disueltos en butOH/DCM/FM.....	93
Tabla 19. Compuestos presentes en cada una de las fracciones de la 1ª purificación identificados mediante la comparación de los tiempos de retención y espectros UV de sus picos cromatográficos.	94
Tabla 20. Compuestos presentes en cada una de las fracciones de la 2ª purificación identificados mediante la comparación de los tiempos de retención y espectros UV de sus picos cromatográficos.	95
Tabla 21. Compuestos presentes en cada una de las fracciones de la 3ª purificación identificados mediante la comparación de los tiempos de retención y espectros UV de sus picos cromatográficos.	96
Tabla 22. Comparación de los tiempos de retención y espectros UV de los picos de espermidin-colesterol en las fracciones obtenidas de las tres purificaciones.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
μL	Microlitro
λ	Longitud de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud de onda máxima o máximo de absorción
ACN	Acetonitrilo
butOH	Butanol
DCM	Diclorometano
DI	Diámetro interno
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
FM	Fase móvil
HPLC o CLAR	High-Performance Liquid Chromatography, o Cromatografía de líquidos de alta resolución
IEC	Cromatografía de líquidos de alta resolución de intercambio iónico
Mg	Miligramo
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
NP HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución de fase normal
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RP HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa
SEC	Cromatografía de líquidos de alta resolución de exclusión molecular
TFA	Ácido trifluoroacético
t_{R}	Tiempo de retención

1. INTRODUCCIÓN

Las ciencias farmacéuticas se encuentran en innovación continua en los procesos de fabricación de medicamentos, el descubrimiento de nuevos principios activos, diseño de nuevas formas farmacéuticas y mejora de las ya existentes. La innovación en las formas farmacéuticas busca que las nuevas modalidades brinden una mayor absorción, comodidad y eficacia.¹

El desarrollo de nanopartículas es todavía un área nueva en el desarrollo de medicamentos, sin embargo, las innovaciones están ocurriendo rápidamente, como lo demuestra el aumento exponencial de las patentes farmacéuticas relacionadas con la nanotecnología en los últimos 20 años.² Las nanopartículas son partículas microscópicas de menos de 100 nm de diámetro e incluyen liposomas, polímeros, nanocristales, proteínas y otras moléculas con aplicaciones variadas. Los pioneros en describir a los liposomas como un sistema de fosfolípidos de bicapa cerrada fueron el científico británico Alec Bangham y colegas en Babraham Cambridge (1965), posterior a ello se han investigado ampliamente como vehículos de administración de fármacos.^{1,3,4}

Los liposomas son vesículas nanométricas conformados por lípidos anfipáticos, capaces de acarrear compuestos hidrófilos o hidrófobos. En comparación con los sistemas tradicionales de administración de fármacos, mejoran las propiedades farmacocinéticas, incluidas la liberación sitio-específico, la liberación sostenida o controlada, la protección de los fármacos contra la degradación y la eliminación; efectos terapéuticos superiores y reducción de efectos adversos.⁵

Nuestro grupo de trabajo comenzó a fabricarlos desde fines de la década de los 90, probando diferentes combinaciones de lípidos anfipáticos naturales para conformar vesículas con carga neutra y negativa; adicionalmente, se comenzó a sintetizar y usar el lípido espermedin-colesterol, un lípido anfipático catiónico, para probar su eficacia utilizando carga positiva que no existe de forma natural. Su uso era muy popular en la transfección de ácidos nucleicos porque aun siendo sintético está conformado por dos elementos naturales, la espermidina y el colesterol y se comprobó que no era tóxico. Su síntesis de acuerdo con modificaciones realizadas por el Dr. Miguel Ibañez es sencilla; no obstante, el uso de cantidades grandes de cloroformo y espermidina base produce muy bajo rendimiento. Para el año 2008 se solicitó la patente de un liposoma hecho con este lípido, al que en este trabajo llamamos síntesis A o lípido A, y fosfatidilcolina de yema de huevo para esta vez acarrear una proteína (Interleucina-2) para uso como agente antitumoral y fue otorgada en 2015; más adelante, se mejoró el proceso de síntesis para obtener mayor rendimiento y usar menos cloroformo. El espermidin-colesterol resultante fue llamado síntesis B o lípido B. Sorprendentemente, los liposomas elaborados con este lípido poseen diferencias en su comportamiento biológico.

Por lo anterior, el presente trabajo versa sobre la separación e identificación de los componentes de los lípidos de espermidin-colesterol provenientes de cada tipo de síntesis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa, para caracterizar su composición y posteriormente dilucidar su relación con las funciones realizadas a nivel biológico.

2. MARCO TEÓRICO

2. 1 Lípidos anfipáticos

Los lípidos son un conjunto amplio y variado de compuestos orgánicos, formados principalmente por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, solubles en disolventes orgánicos e insolubles en agua (hidrófobos)⁷. Los llamados lípidos anfipáticos además de poseer la cadena hidrocarbonada no polar poseen un grupo polar. Este carácter anfifílico les confiere propiedades como la autoestructuración, la capacidad de tomar distintas conformaciones en el espacio al contacto con el agua (Figura 1), debido a que la cabeza polar interactúa con el agua, manteniendo a la parte no polar aislada dentro del arreglo.^{8,9}

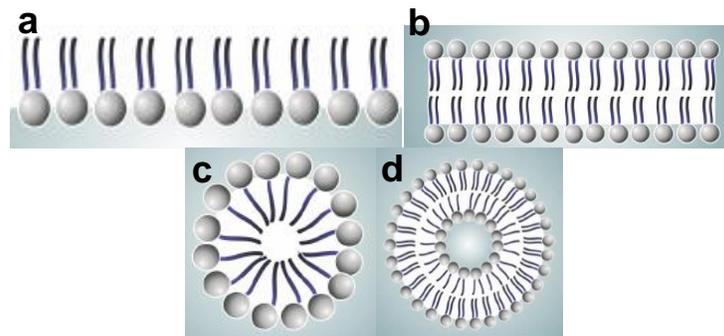


Figura 1. Diferentes formas de asociación estructural de los lípidos anfifílicos, a) monocapa, b) bicapa, c) micela y d) vesícula.⁸

2.2 Liposomas

Los liposomas son estructuras en forma de vesículas esféricas de una o varias capas lamelares de lípidos anfipáticos, nano o microscópicas, que encierran espacios acuosos. Son capaces de actuar como reservorio de fármacos para su

transporte, de tipo hidrofílico, lipofílico e incluso anfifílico; dispuestos en su interior de acuerdo con sus características fisicoquímicas.^{10,11}

Los liposomas pueden variar entre sí en sus dimensiones, composición, carga y estructura. En función de su número de capas, los liposomas se clasifican de manera general en unilamelares, compuestos de una sola capa de lípidos, y multilamelares, con dos o más capas (Figura 2) (Tabla 1).^{5,9}

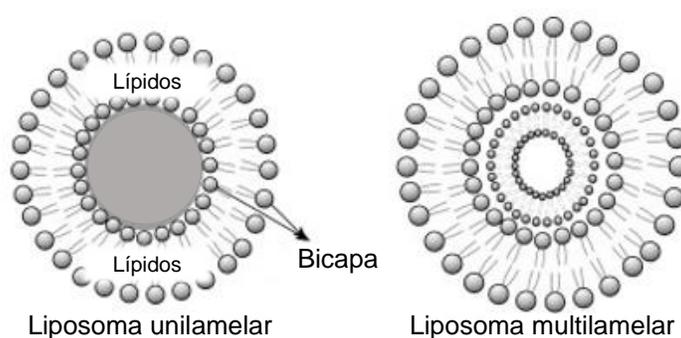
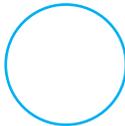
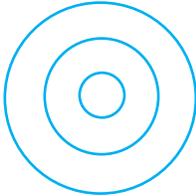


Figura 2. Tipos de liposomas según sus capas.¹²

Tabla 1. Características de liposomas según su número de capas.¹³

Número de bicapas	Tipos	Diámetro	Propiedades
Unilamelares (liposomas formados por una única bicapa)	SUV (vesículas unilamelares de pequeñas dimensiones) 	20-80 nm	<ul style="list-style-type: none"> ○ Elevado radio de curvatura y proporción de fosfolípidos en su monocapa externa ○ Importante relación superficie-lípido ○ Bajo % de encapsulación, no se recomienda para moléculas hidrosolubles. ○ Elevada capacidad de encapsulación

	<p>LUV (vesículas unilamelares de grandes dimensiones)</p> 	<p>80 nm-1 μm</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Elevada capacidad de encapsulación ○ Elevado volumen de compartimiento interno, que permite encapsulación eficaz de moléculas hidrosolubles.
<p>Plurilamelares (liposomas formados por varias bicapas)</p>	<p>MLV (vesículas multilamelares)</p> 	<p>400 nm- varios μm</p>	<p>Existen variantes de MLV, tales como:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ REV (Reverse-phase Evaporation Vesicles)  ○ SPLV (Stable Plurilamellar Vesicles)  ○ MVL (Multivesicular liposomes) 

2.2.1 Liposomas catiónicos

Los lípidos catiónicos usados para liposomas catiónicos están compuestos por hidrocarburos de cadena larga, esteroides y diglicéridos como dominio hidrófobo; y como dominio hidrófilo pueden contener uno (lípidos monocatiónicos) o más (lípidos policatiónicos) grupos cargados positivamente.¹⁴

Como dominios hidrófilos los lípidos monocatiónicos poseen comúnmente derivados terciarios o cuaternarios de bases nitrogenadas alifáticas o heterocíclicas.

En los lípidos policatiónicos, se utilizan poliaminas o aminoácidos naturales o sintéticos.¹⁴

Las poliaminas (como la putrescina, espermina y espermidina) (Figura 3) son moléculas alifáticas nitrogenadas de bajo peso molecular con grupos amino distribuidos a lo largo de su estructura. Entre sus principales funciones destacan el empaquetamiento (condensación y agregación) de ácidos nucleicos, la modulación de receptores de membrana y canales iónicos, la regulación de la expresión génica y la señalización celular. Son capaces de inducir apoptosis, participan en el ciclo celular, modulan el sistema inmune y participan en el balance redox del organismo. Se consideran moléculas antiinflamatorias y se asocian a la longevidad.¹⁵

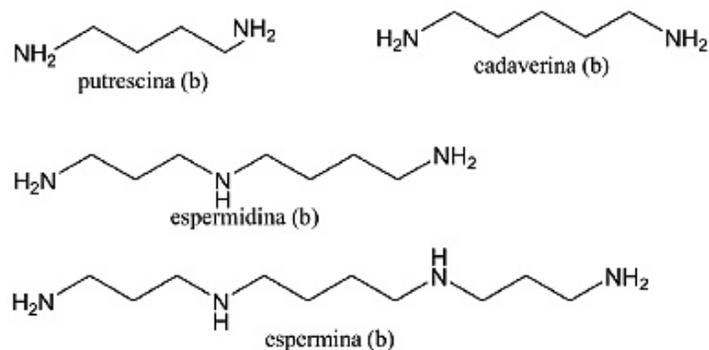


Figura 3. Estructura de las principales poliaminas naturales.¹⁵

Los lípidos catiónicos y liposomas basados en ellos son sistemas atractivos para el suministro debido a su biodegradabilidad, baja probabilidad de provocar reacciones inmunes e inflamatorias, además de su capacidad de proporcionar una entrega eficiente, incluso de ADN y ARN.^{14,16}

2.4 Espermidin-colesterol

La espermidina (Figura 4a) es una poliamina que dentro de la célula puede interactuar con DNA, RNA, proteínas y fosfolípidos. Al interactuar con el ADN neutraliza las cargas negativas de los grupos fosfatos y se coloca en los surcos mayores y menores del ácido nucleico, originando un plegamiento en el ADN que permite una mejor interacción con las enzimas responsables de la replicación y con el complejo de transcripción, aumentando la eficiencia de estos procesos, así como induce la formación de estructuras secundarias en el ARNm, ARNt, y ARNr, que favorecen la interacción con el ribosoma. En el diseño de liposomas catiónicos, es común el uso de este tipo de poliaminas como dominio hidrófilo, pues confieren la carga positiva a la superficie del liposoma.¹⁴

El colesterol es un lípido esteroide, derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno, constituido por cuatro anillos de carbono, una cola hidrocarbonada (región no polar) y un grupo alcohol unido a uno de los anillos (región polar) (Figura 4b).⁷ Es uno de los principales componentes de la bicapa de liposomas, ya que promueve el empaquetamiento de las cadenas grasas y la formación de bicapas, modula la fluidez/rigidez de la membrana e influye en la liberación del fármaco y estabilidad de los liposomas.^{1,5}

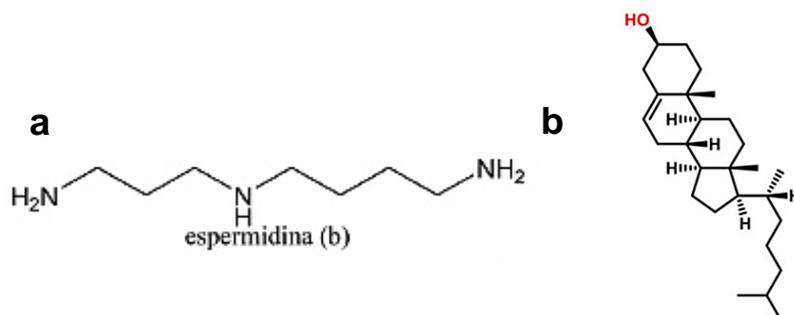


Figura 4. Estructura de a) la poliamina espermidina y b) del colesterol.^{5,15}

Los lípidos policationicos compuestos de espermidina-colesterol, pueden estar unidos mediante espaciadores de diferente longitud y tipo de enlace (éster, carbamato). Debido a que la espermidina es una molécula asimétrica, durante la síntesis se pueden obtener hasta tres compuestos isómeros (Figura 5).^{14,17}

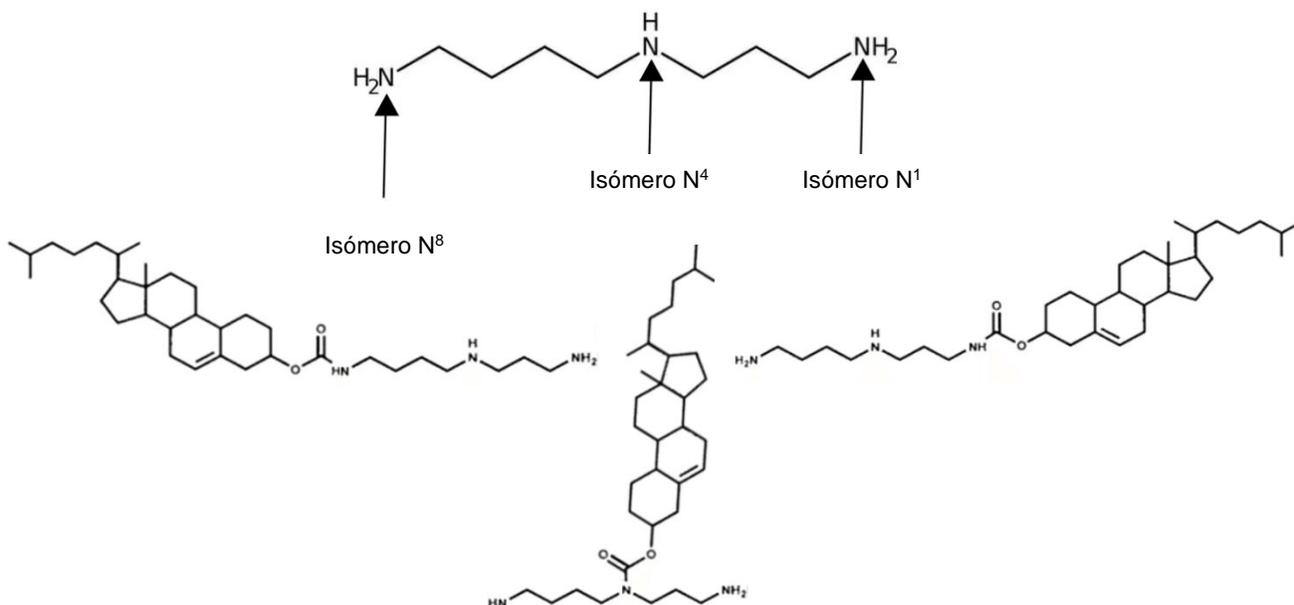


Figura 5. Posición del residuo de colesterol en la estructura de espermidina en el 3-β-(N¹-, N⁴-, y N⁸-espermidin)carbamoilcolesterol (espermidin-colesterol) y estructura de cada uno de sus tres isómeros.¹⁸

2.3 Isómeros

Los isómeros son entidades moleculares con idéntica composición cualitativa y cuantitativa de elementos, así como mismas fórmulas moleculares; pero de estructura o disposición en el espacio distintas. Su separación es de gran interés en el ámbito farmacéutico debido a la gran variedad de compuestos que presentan este comportamiento, y a que difieren considerablemente entre sí en sus propiedades fisicoquímicas, farmacodinámicas y farmacocinéticas.¹⁹

Es posible clasificarlos en isómeros constitucionales, que presentan diferente conectividad de sus átomos; y estereoisómeros, cuyos enlaces son los mismos, pero están dispuestos de forma distinta en el espacio tridimensional. Los estereoisómeros, a su vez, se pueden dividir en isómeros geométricos, que se presentan en alquenos cuando los grupos unidos a los carbonos del doble enlace son idénticos para un par de compuestos, pero sería necesario romper uno de los enlaces para que pudieran ser una imagen especular del otro; y enantiómeros, un par de compuestos que son imágenes especulares entre sí, no superponibles y que poseen uno o varios centros quirales (átomos cuyos constituyentes son todos diferentes) (Figura 6).¹⁹

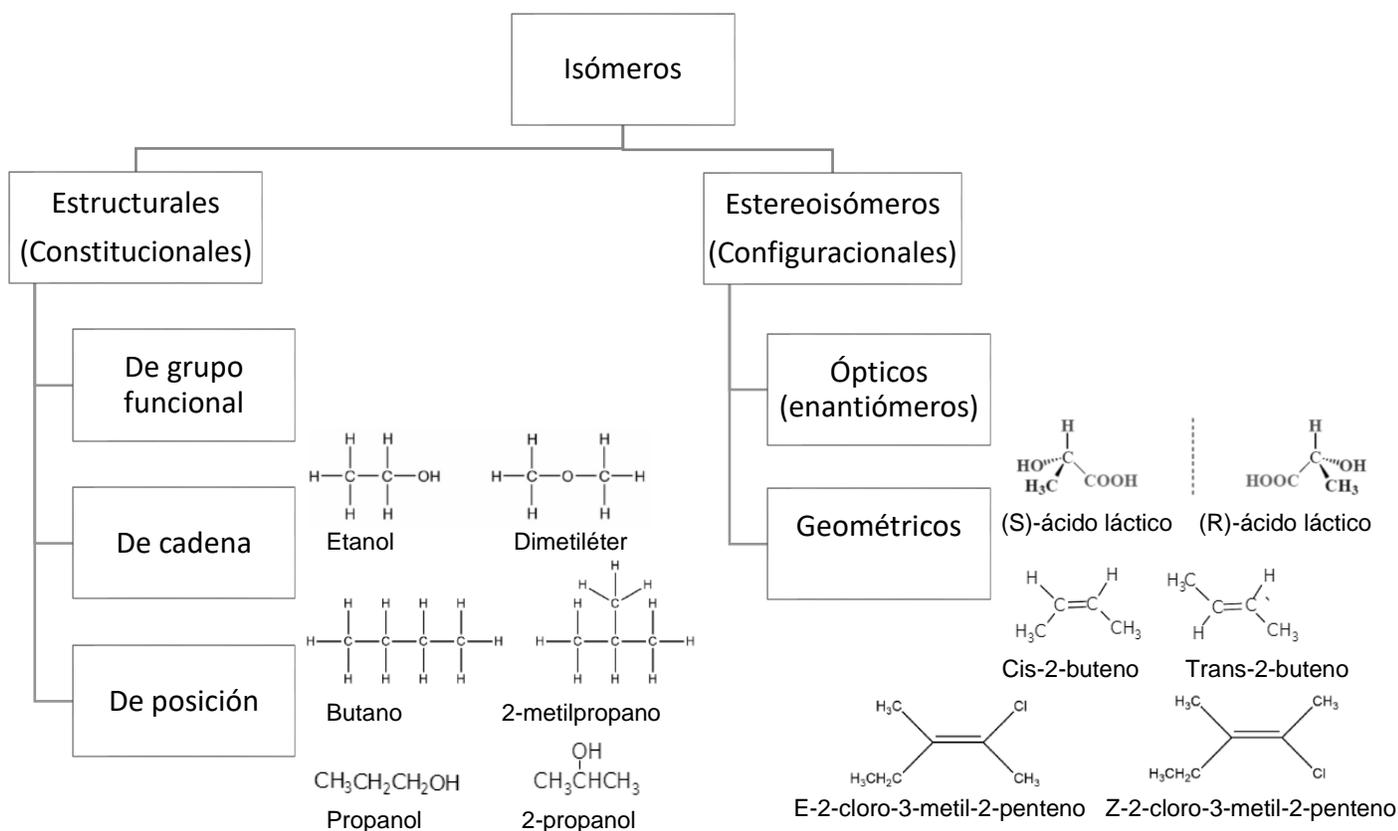


Figura 6. Clasificación de los distintos tipos de isomería.¹⁹

2.5 HPLC

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC por sus siglas en inglés, High Performance Liquid Chromatography) es una técnica cromatográfica que permite la separación, identificación y/o cuantificación de compuestos transportados en una fase móvil, que migran diferencialmente en una fase estacionaria dispuesta en una columna, con base en su afinidad a esta.

La separación exitosa de determinados compuestos depende de la correcta combinación de las condiciones de operación, tales como: la preparación de la muestra, el tipo de columna cromatográfica, su diámetro y longitud, la fase móvil, su velocidad de flujo, el gradiente de elución, el tipo de detección.²⁰

2.5.1 Tipos de HPLC

La cromatografía de líquidos de alta resolución tiene una amplia gama de aplicaciones, para las cuales se puede clasificar dependiendo de las características del sistema cromatográfico (Tabla 2).

Tabla 2. Principales tipos de HPLC. ^{20,21,22,23}

Tipo	Características
NP HPLC	Conocida como HPLC en fase normal, se basa en una fase móvil no polar y una fase estacionaria polar (sílica o alúmina con grupos silanol enlazados). Permite la separación de los analitos en base a su polaridad, de acuerdo con su interacción con los grupos funcionales polares de la superficie de la fase estacionaria.

RP HPLC	<p>La HPLC de fase reversa posee una fase estacionaria no polar y una fase móvil moderadamente polar; permite la separación de analitos dependiendo de su hidrofobicidad. La fase móvil está compuesta de una parte acuosa y un disolvente polar, mientras que la fase estacionaria contiene enlazados grupos no polares, como hidrocarburos de cadena larga.</p>
SEC	<p>La cromatografía de exclusión molecular permite la separación con base en el tamaño molecular. También se denomina cromatografía de filtración en gel, debido a la apariencia de la resina empaquetada (generalmente poliestireno) en esponjas esféricas de tamaño controlado, que crean poros en la fase estacionaria. Una molécula grande se excluye de los poros y migra rápidamente, mientras que una molécula pequeña puede penetrar todos los poros internos y migra más lentamente por la columna.</p>
IEC	<p>La separación mediante cromatografía de intercambio iónico se basa en las diferencias en la carga neta de los analitos. Las cargas de las moléculas pueden variar considerablemente y exhibir diferentes grados de interacción con un contraión unido a la fase estacionaria dependiendo de su carga, densidad de carga y distribución de carga en la superficie. Dependiendo de la carga neta negativa o positiva de los iones acoplados a la fase estacionaria, se suele clasificar como cromatografía de intercambio catiónico o aniónico, respectivamente.</p>

Cromatografía de afinidad	Basado en la interacción receptor-ligando, emplea un ligando específico acoplado a la fase estacionaria. La elución del analito purificado se logra al añadir ligando libre a la fase móvil que compita con el ligando de la fase estacionaria, o por medio de un cambio de pH, sales, etc.; que debiliten la unión ligando- proteína.
----------------------------------	--

2.5.2 Equipo

El sistema de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución consiste en un contenedor de disolventes, bomba, inyector de la muestra, columna, detector, computadora y un recipiente de residuos (Figura 7):

- Bomba: impulsa la fase móvil para hacerla pasar a través del sistema cromatográfico, proporciona una velocidad de flujo laminar, constante (0.1 a 10 mL/min) y reproducible a altas presiones (hasta 400 bares). Un conjunto de válvulas genera el gradiente deseado, esto es, la variación de la proporción de cada uno de los disolventes en la fase móvil durante la corrida cromatográfica.²¹
- Inyector: una jeringa automática que carga el volumen de muestra exacto y preciso y lo inyecta a la columna de manera reproducible.
- Columna: contiene empaquetada la fase estacionaria, sus dimensiones y material dependen de la separación a llevar a cabo. Las columnas preparativas son de mayor longitud (10 cm a 1 m), diámetro y tamaño de partícula del material interno; ya que suelen usarse con el fin de aislar o purificar componentes de una mezcla y requieren mayores capacidades.

Las columnas analíticas tienen de 30 a 300 mm de longitud, y 0.5 a 4.6 mm de diámetro y están encaminadas a determinar la identidad y concentración de componentes. El tamaño de partícula es un parámetro de gran importancia, suelen usarse tamaños mayores a 10 μm para técnicas preparativas, de 10 μm para cromatografía semipreparativa, 5 μm en técnicas analíticas y 3 μm para separaciones muy rápidas.²²

- Detector: dispositivo que permite captar y cuantificar al analito que pasa a través de la columna mediante la detección de alguna propiedad fisicoquímica. El más común es el detector UV/VIS, que detecta la luz que es transmitida por la muestra al incidir en ella un haz de luz.^{21, 23}
- Computadora: integra las respuestas del sistema de detección, creando un cromatograma, un registro visual de las señales de la elución de cada uno de los componentes de la muestra analizada.^{22,23}

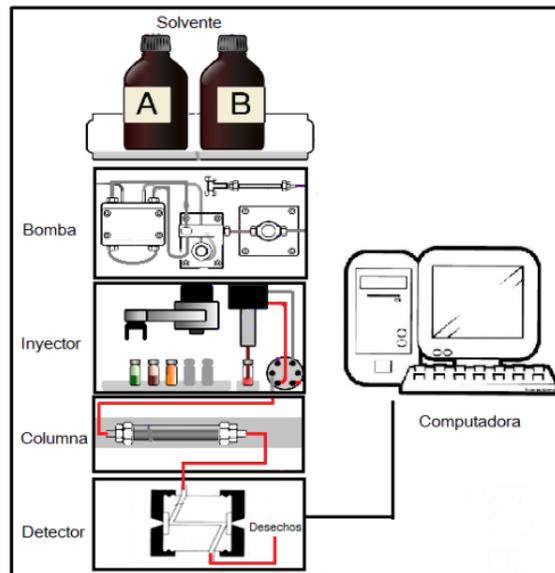


Figura 7. Diagrama general de los componentes de un equipo de HPLC.²⁴

2.5.3 Parámetros cromatográficos

Se describen los parámetros cromatográficos que permiten caracterizar la técnica analítica.

- *Pico*: corresponde a la porción de un cromatograma, que registra la respuesta del detector cuando un analito individual es eluido de la columna, registrando una señal en forma de pico. El área bajo el pico es proporcional a la cantidad de sustancia que pasa por el detector. El pico de un analito en un perfil cromatográfico tiene una altura (h) y un ancho, este último se mide en la base (W_b) (Figura 8).^{20,21,25}
- *Tiempo de retención (t_R)*: se define como el tiempo entre la inyección de la muestra y el pico máximo del analito, indica cuánto tiempo tarda este en eluir, esto es, salir de a través de la columna. Es característico de un compuesto en una separación dada, pues depende de las interacciones fisicoquímicas entre los disolventes de la fase móvil, el analito y la fase estacionaria; así como del gradiente de elución (Figura 8).^{24,26,27}
- *Tiempo muerto (t_0)*: también llamado tiempo vacío o nulo, es el tiempo que tarda toda especie molecular no retenida para eluir de la columna; a menudo se muestra como la primera alteración de la línea base causada por el diluyente de la muestra (Figura 8).²⁶

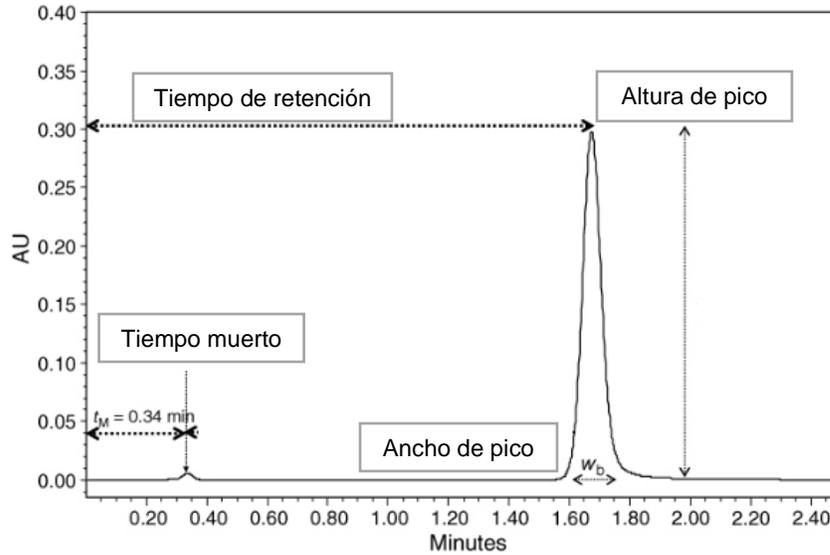


Figura 8. Cromatograma de un solo componente mostrando su tiempo de resolución, tiempo muerto, altura y ancho de pico.²⁶

- *Volumen de retención (V_R):* se define como el volumen de la fase móvil que fluye desde el tiempo de inyección hasta el tiempo de retención correspondiente al analito, a una velocidad de flujo determinada.

$$V_R = t_R F$$

Donde t_R es el tiempo de retención del analito y F la velocidad de flujo de la fase móvil.

- *Volumen muerto:* corresponde al volumen de fase móvil contenido en la columna, excepto el ocupado por la fase estacionaria.

$$V_M \text{ ó } V_0 = 0.65\pi r^2 L$$

Donde π es pi (3.1416), r es el radio interno de la columna cromatográfica y L su longitud, ambas en centímetros.^{26,27}

- *Factor de colado (T_i):* Idealmente los picos cromatográficos deben ser simétricos, sin embargo, usualmente pueden mostrar ligera asimetría al

principio o al final. El factor de coleo mide el grado de simetría del pico y se define como el ancho de pico al 5% de su altura (Figura 9 a). Un factor de coleo igual a 1 indica un pico simétrico, mientras que uno mayor a 2 indica un coleo severo (Figura 9 b), que suele ser causado por adsorción, una fuerte interacción con la fase estacionaria o un ensanchamiento de la banda extracolumna del analito; asimismo, el frente de pico es causado por la sobrecarga de la columna o por una reacción química del analito.

$$T_f = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

Donde $W_{0.05}$ es el ancho del pico al 5% de la altura del pico desde la línea base, y f la distancia entre el máximo del pico y el borde inicial del pico.²⁶

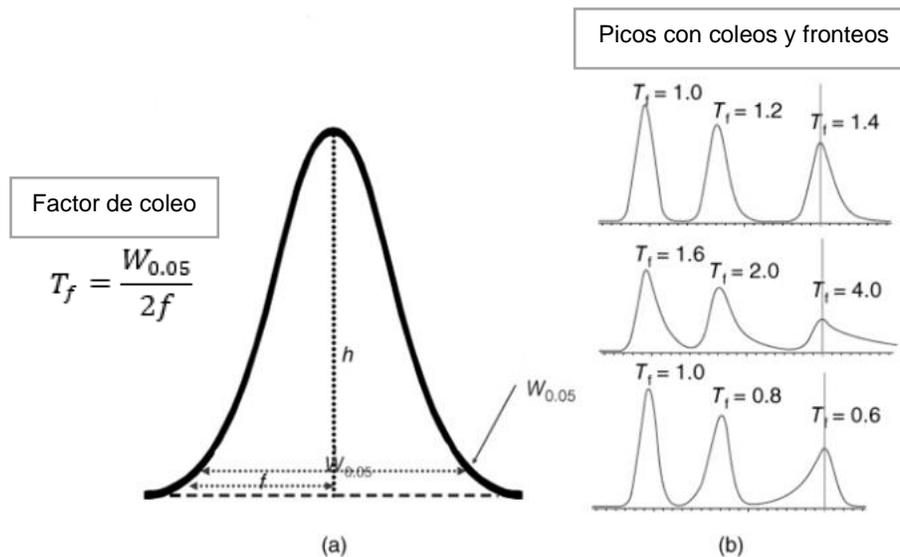


Figura 9 a) Diagrama del cálculo del factor de coleo y b) ejemplos de picos con coleo y su respectivo valor de factor de coleo.²⁶

- *Número de platos teóricos (N)*: es una medida de la eficiencia de la columna, se define como el cuadrado de la relación del tiempo de retención entre la desviación estándar del pico. El valor de platos teóricos para determinar que

una columna tiene buena eficiencia es de más de 2000 platos teóricos. Dado un pico gaussiano, $W_b = 4 \sigma$.^{26,27}

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = \left(\frac{4t_R}{W_b}\right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2$$

- *Factor de retención o de capacidad (k)*: Es una medida del grado de retención del analito, de acuerdo con el tiempo que se mantiene en la columna con respecto al tiempo que permanece en la fase móvil. Un factor de capacidad igual a cero, muestra que el analito no es retenido por la fase estacionaria, lo que impide la separación, mientras que uno mayor a 20 indica que el componente es fuertemente retenido en la columna y puede dificultar el análisis. Los valores ideales de k van de 1 a 20.^{26,27}

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t_R}{t_0} - 1$$

- *Selectividad (α)*: Muestra la retención relativa de dos componentes de la muestra, en base a su relación entre sus factores de capacidad. Debe ser mayor a uno para darse una separación física de los picos, sin embargo, por sí sola puede no describir una adecuada separación, pues no considera el impacto del ensanchamiento de los picos.^{26,27}

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

- *Resolución*: caracteriza el grado de separación entre analitos con fines cuantitativos. Se calcula como la diferencia de los tiempos de retención de dos picos adyacentes dividida entre el promedio del ancho de los picos (Figura 10). El objetivo de la mayoría de los métodos de HPLC es lograr una

separación con $R_s = 1,5$ para todos los analitos clave, para su precisa cuantificación (Figura 11).^{26,27}

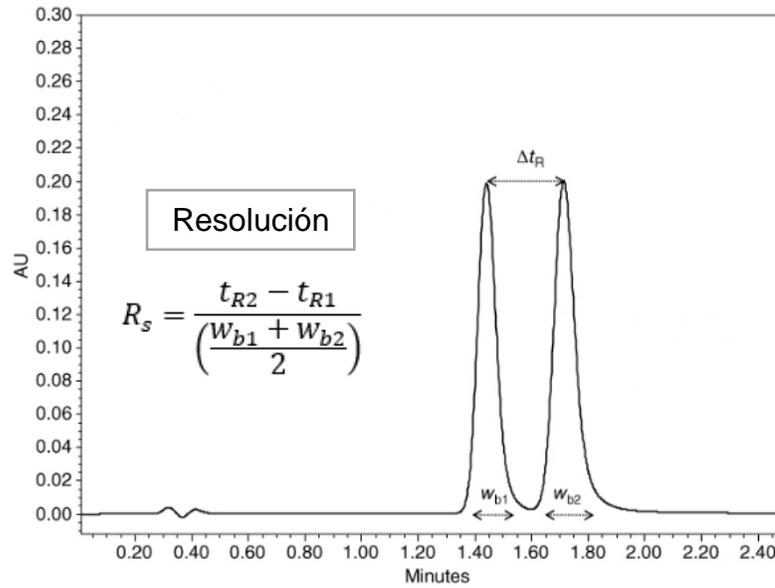


Figura 10. Cromatograma con dos picos y términos para el cálculo de su resolución.²⁶

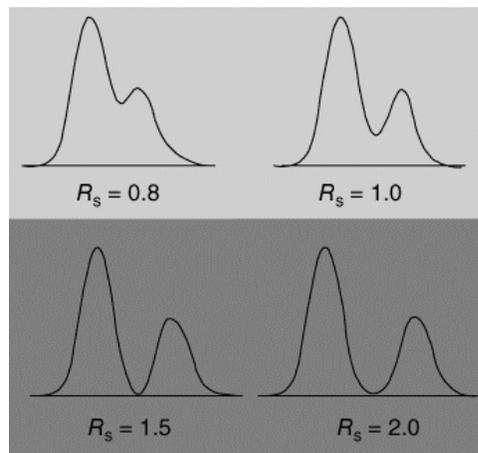


Figura 11. Representación de picos cromatográficos de dos analitos adyacentes con diferentes valores de resolución.²⁶

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La liberación eficiente y controlada de fármacos en su sitio de acción en una adecuada concentración y de manera cada vez más selectiva (apuntando a dianas moleculares específicas); representa uno de los objetivos principales para la innovación en el diseño de sistemas farmacéuticos. Los liposomas aprovechan la nanotecnología para generar alternativas que pueden representar una mejora de las formas farmacéuticas, traducida en un aumento en la selectividad del fármaco, protección frente a su metabolización/eliminación innecesaria, bloqueo de acceso a tejidos donde no es requerido, disminución de dosis sistémicas y liberación masiva en el lugar deseado.^{10,11,13}

El espermidin-colesterol es un lípido útil en la fabricación de liposomas catiónicos. Nuestro equipo de trabajo del Laboratorio de Oncología realiza la síntesis del lípido catiónico espermidin-colesterol mediante dos procesos, de los cuales se obtienen el lípido A y B; de cuyos procesos de síntesis se busca obtener patente. Posterior al proceso de síntesis, se fabrican y prueban los liposomas conformados por fosfatidilcolina y los lípidos provenientes de cada una de las dos síntesis en membranas biológicas. En esta fase se ha observado una diferencia considerable del comportamiento de ambas formulaciones en el medio biológico. Debido a que la espermidina es una molécula asimétrica, durante el proceso de síntesis del lípido se pueden obtener hasta tres isómeros estructurales. Por ello, es relevante conocer la composición de los productos de síntesis de cada uno de los lípidos, especialmente la de sus isómeros. Las posibles diferencias en sus propiedades

fisicoquímicas pueden influir en el comportamiento del liposoma en el medio biológico, lo que podría suponer diferencias en su eficacia y seguridad.

Por lo anterior, se pretende analizar los productos denominados lípido A y B; llevar a cabo la identificación y separación de los isómeros de espermidin-colesterol y demás componentes de los lípidos obtenidos de las síntesis; para su aplicación en la caracterización de ambas formulaciones y su asociación con la función que ejercen los liposomas.

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Separar los isómeros de dos lípidos de espermidin-colesterol obtenidos por métodos distintos de síntesis, por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa, para su caracterización y posterior asociación con una función determinada.

Objetivos específicos:

1. Desarrollar y optimizar una metodología cromatográfica a nivel analítico por HPLC de fase reversa para el análisis del lípido espermidin-colesterol sintetizado en el laboratorio de Oncología Celular y Cáncer de la UMIEZ.
2. Separar por medio de HPLC de fase reversa a nivel analítico los componentes de los lípidos de espermidin-colesterol obtenidos de dos procesos diferentes de síntesis.

3. Determinar la composición porcentual de cada uno de los isómeros de los lípidos obtenidos en la síntesis del lípido catiónico.
4. Determinar la composición de cada uno de los lípidos sintetizados para su caracterización.

5. HIPÓTESIS

Por medio del desarrollo y optimización de una metodología cromatográfica por HPLC de fase reversa para el análisis de espermidin-colesterol, se permitirá la identificación y separación analítica de los isómeros y demás componentes de los lípidos obtenidos de dos síntesis diferentes, así como la determinación de la composición de cada uno de ellos; para su caracterización y con ello futura asociación de la función efectuada con cada uno de los procedimientos de síntesis.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Tipo de estudio

Interferencia del investigador: Experimental.

Forma de recolección de información: Prospectivo.

Secuencia temporal de estudio: Transversal.

6.2 Población objetivo

Espermidin-colesterol sintetizado en el Laboratorio de Oncología de la UMIEZ de la FES Zaragoza.

6.3 Población de estudio

Espermidin-colesterol, lípidos A y B, sintetizados en el Laboratorio de Oncología de la UMIEZ de la FES Zaragoza, síntesis 2017 y 2022.

6.4 Criterios de inclusión

Espermidin-colesterol sintetizado en el Laboratorio de Oncología de la UMIEZ de la FES Zaragoza, síntesis 2017 y 2022.

6.5 Criterios de exclusión

Espermidin-colesterol no sintetizado en el Laboratorio de Oncología de la UMIEZ de la FES Zaragoza.

7. DESARROLLO EXPERIMENTAL

7.1 Materiales

- Matracas aforados de 100 y 250 mL.
- Vasos de precipitados de 30, 50, 100 y 250 mL.
- Tubos de ensayo de vidrio de 13x100 mm
- Pipetas graduadas de 2, 5 y 10 mL.
- Micropipeta de 1000 μ L, Vitlab®
- Puntas para micropipeta
- Soporte universal
- Pinzas de tres dedos
- Viales de vidrio con tapa para HPLC
- Viales de vidrio
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Equipo de filtración para disoluciones
- Filtro de PTFE hidrofóbico de 0.22 μ m marca Millipore
- Filtro de acetato de celulosa de 0.2 μ m marca Sartorius GmbH
- Filtro de jeringa de PVDF de 0.45 μ m marca Millipore Millex-HV
- Placas de sílica gel para TLC, Sigma Aldrich®

7.2 Reactivos

- Agua desionizada filtrada en equipo Milli-Q.
- Acetonitrilo grado HPLC, Sigma Aldrich®
- Ácido trifluoroacético 99%, Sigma Aldrich®

- Los siguientes disolventes en grado reactivo: diclorometano, acetona, metanol, etanol, isopropanol, 1-butanol, cloroformo, DMSO, acetato de etilo, DMF, éter etílico.
- Espermidin-colesterol Lípido A y Lípido B sintetizados en el Laboratorio de Oncología de la UMIEZ de la FES Zaragoza (Síntesis 2017 y 2022)
- Espermidina, Sigma Aldrich®, Lote #BCCF4655
- Colesterilcloroformiato, Sigma Aldrich®, Lote #MKBL8021B
- Solución alcohólica de ninhidrina al 0.1%

7.3 Equipos e instrumentos

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Alliance Waters modelo E2696, con detector UV de matriz de fotodiodos marca Waters modelo 2996, acoplado a una computadora Dell con software Empower versión 2 compilación 2154.
- Columna cromatográfica C18 para fase reversa Supelco Supelcosil® LC-ABZ, de 15 cm de largo y 4.6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 5 μm .
- Equipo de filtración de agua Milli-Q, Millipore®.
- Balanza analítica marca Ohaus, Explorer
- Bomba de vacío
- Vórtex
- Estufa

7.4 Metodología

7.4.1 Preparación de disoluciones de la fase móvil

Se prepararon las siguientes disoluciones, ambas el día de su uso:

- TFA al 0.1 % en acetonitrilo

Se colocaron aproximadamente 200 mL de acetonitrilo en un matraz aforado de 250 mL, se agregaron 252 μ L de TFA y posteriormente se llevó al aforo con acetonitrilo. La disolución se filtró al vacío con un filtro de PTFE hidrofóbico de 0.22 μ m. Se guardó en un frasco con tapa para disolventes de la fase móvil del HPLC.

- TFA al 0.1% en agua

Se colocaron aproximadamente 200 mL de agua Milli-Q en un matraz aforado de 250 mL, se agregaron 252 μ L de TFA y posteriormente se llevó al aforo con agua Milli-Q. La disolución se filtró al vacío con un filtro de acetato de celulosa de 0.22 μ m. Se guardó en un frasco con tapa para disolventes de la fase móvil del HPLC.

7.4.2 Determinación de condiciones del análisis cromatográfico

Las condiciones iniciales de la técnica cromatográfica por HPLC de fase reversa para el análisis de los lípidos de espermidin-colesterol sintetizados fueron propuestas con base en investigación bibliográfica de metodologías previamente reportadas^{18,28,29}; quienes proponen la fase reversa con columna C18, detección a 205 nm, temperatura ambiente y la utilización de TFA al 0.1% en ACN y TFA al 0.1 % en agua como fase móvil. La elección de la velocidad de flujo y tamaño de

partícula está dada por las especificaciones de la columna cromatográfica según su longitud y diámetro interno (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones iniciales para el análisis por HPLC de fase reversa de los lípidos de espermidin-colesterol.

Columna	C18 Supelcosil LC-ABZ 15 cm x 4.6 mm de DI.
Tamaño de partícula	5 µm
Velocidad de flujo	1 mL/min
Volumen de inyección	10 µL
Temperatura	25°C (ambiente)
Detección	205-400 nm

7.4.3 Determinación de fase móvil y gradiente a utilizar

Se probaron dos condiciones de elución las cuales fueron seleccionadas con base en fuentes bibliográficas para el análisis de espermidin-colesterol en HPLC^{18,28,29}. Las disoluciones preparadas para la fase móvil: TFA al 0.1 % en agua y TFA al 0.1 % en acetonitrilo se probaron en las siguientes proporciones en el HPLC, la primera corresponde a una fase móvil de composición fija (elución sin gradiente o isocrática) y la segunda a una elución con gradiente:

Tabla 4. Composición de la fase móvil para la elución isocrática y con gradiente.^{18,28,29}

Fase móvil de elución isocrática	Fase móvil de elución con gradiente A
67% de TFA al 0.1% en ACN 33% de TFA al 0.1% en agua	60% de TFA al 0.1% en ACN durante 4 minutos 60 a 70% de TFA al 0.1% en ACN durante 8 minutos

Se prepararon cuatro viales con las siguientes composiciones:

Tabla 5. Preparación de viales para la elución isocrática y con gradiente.

Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4
1 mg de lípido A (2017)	1 mg de lípido B (2017)	1 mg de espermidina	1 mg de colesteril-cloroformiato
0.67 mL de TFA al 0.1% en ACN	0.67 mL de TFA al 0.1% en ACN	0.67 mL de TFA al 0.1% en ACN	0.67 mL de TFA al 0.1% en ACN
0.33 mL de TFA al 0.1% en agua	0.33 mL de TFA al 0.1% en agua	0.33 mL de TFA al 0.1% en agua	0.33 mL de TFA al 0.1% en agua

7.4.4 Preparación de la muestra y solubilización de espermidin-colesterol

El lípido A fue poco soluble en la fase móvil, mientras que el lípido B y el colesterilcloroformiato fueron insolubles. La disolución de la muestra y su miscibilidad con todos los componentes de la fase móvil es imprescindible para el adecuado análisis cromatográfico, por lo cual se procedió a probar con diversos disolventes mencionados en fuentes bibliográficas en los cuales se reporta al espermidin-colesterol como soluble y posteriormente en algunos otros de diferentes polaridades. Para ello se pesó 1 mg de espermidin-colesterol y se colocó en un tubo de ensayo al cual se le agregó 1 mL de cada uno de los siguientes disolventes:

Tabla 6. Disolventes y mezclas usadas para probar la solubilidad del espermidin-colesterol.

Disolvente o mezcla (Constante dieléctrica k)	
Metanol (32.7)	Acetona (20.7)
Etanol (24.5)	Cloroformo (4.81)
Isopropanol (17.9)	Diclorometano (8.93)
1-Butanol (17.8)	DMSO (45.0)
Acetato de etilo (6.02)	DMF (37.7)
Acetonitrilo (37)	Éter etílico (4.33)
Metanol/Isopropanol 7/3	Metanol/diclorometano 1/1

Los disolventes en los cuales según diversas fuentes el espermidin-colesterol es soluble, no disolvieron a los lípidos de espermidin-colesterol sintetizados, por lo cual se buscó una proporción de disolventes específica para nuestros lípidos.

Se prepararon dos proporciones de butanol con fase móvil para probar la miscibilidad de butanol con la fase móvil y asegurar un adecuado comportamiento en el sistema cromatográfico:

Tabla 7. Proporciones de butanol con fase móvil, utilizadas para probar la miscibilidad del butanol en el HPLC.

Proporción	Butanol (mL)	Fase móvil (mL)
1	0.5	0.5
2	0.7	0.3

Se prepararon tubos con 1 mL de cada una de cinco proporciones de butanol/isopropanol para probar la solubilidad del espermidin-colesterol y su miscibilidad. A cada uno se agregó 1 mg de espermidin-colesterol. Se utiliza una mayor proporción de butanol debido a la mayor solubilidad de los lípidos en éste.

Tabla 8. Disoluciones de butanol/isopropanol a diferentes proporciones utilizadas para probar su miscibilidad y la solubilidad del espermidin-colesterol en c/u de ellas.

Proporción Butanol/Isopropanol	Butanol (mL)	Isopropanol (mL)
9/1	0.9	0.1
8/2	0.8	0.2
7/3	0.7	0.3
6/4	0.6	0.4
5/5	0.5	0.5

Posteriormente se prepararon cinco proporciones de butanol con diclorometano como cosolvente en tubos de ensayo para probar su miscibilidad y se agregó 1 mg de espermidin-colesterol a cada uno para probar su solubilidad.

Tabla 9. Disoluciones de butanol/diclorometano a diferentes proporciones utilizadas para probar su miscibilidad y la solubilidad del espermidin-colesterol en c/u de ellas.

Proporción Butanol/DCM	Butanol (mL)	DCM (mL)
9/1	0.9	0.1
8/2	0.8	0.2
7/3	0.7	0.3
6/4	0.6	0.4
5/5	0.5	0.5

Se probó la miscibilidad de dos proporciones del disolvente encontrado del espermidin-colesterol en la fase móvil (60% de TFA al 0.1% en ACN y 40% de TFA al 0.1% en agua), para encontrar la total miscibilidad de la proporción en la fase móvil y asegurara un adecuado comportamiento en el sistema cromatográfico.

Tabla 10. Proporciones de butanol/DCM/fase móvil preparadas para probar su miscibilidad y la solubilidad del espermidin-colesterol en cada una de ellas.

	Butanol	DCM	Fase móvil	
			TFA al 0.1% en ACN	TFA al 0.1% en agua
1	0.7	0.1	0.12	0.08
2	0.7	0.05	0.15	0.1

7.4.5 Perfil cromatográfico de los lípidos de espermidin-colesterol a las condiciones optimizadas.

Se prepararon 6 viales para HPLC con la siguiente composición:

Tabla 11. Preparación de viales para el análisis cromatográfico del espermidin-colesterol con las muestras disueltas, en una elución con gradiente.

Vial	Muestra	Disolventes
1	1 mg de lípido A (2017)	0.7 mL de butanol 0.05 mL de DCM
2	1 mg de lípido A (2022)	
3	1 mg de lípido B (2017)	0.1 mL de TFA al 0.1% en agua
4	1 mg de lípido B (2022)	
5	1 mg de espermidina	0.15 mL de TFA al 0.1% en ACN
6	1 mg de colesterilcloroformiato	

Los viales fueron analizados por medio de HPLC de fase reversa a las condiciones fijadas anteriormente en el punto 7.4.2, en una elución con el gradiente A.

7.4.6 Purificación de espermidin-colesterol por cromatografía en columna de sílica gel

Para considerar la posibilidad de una purificación de los lípidos de espermidin-colesterol por medio de cromatografía en columna de sílica gel, previamente se realizaron cromatografías en capa fina utilizando como eluyente diclorometano/metanol a siete diferentes proporciones y como revelador ninhidrina al 0.1%; para observar si había una adecuada separación de los componentes de los lípidos A y B. Se prepararon cámaras de elución con las siguientes proporciones de DCM/metanol: 1/1, 1.5/1, 2/1, 3/1, 4/1, 1/2 y 1/3.

Se llevaron a cabo tres purificaciones a microescala en una pipeta Pasteur, en la cual se colocó algodón y sílica gel; y se sujetó verticalmente con pinzas de tres dedos y soporte universal. Se preparó la muestra de lípido A (2017) a una concentración de 10 mg/mL, pesando 5 mg de lípido y disolviendo en 0.5 mL de DCM:metanol 2:1. La primera y segunda purificación se realizó con DCM:metanol 4:1 como eluyente, se recolectaron fracciones de 30 gotas en viales, posteriormente se secó el disolvente en una estufa a 100°C y se agregó 1-butanol/DCM/FM en la proporción antes mencionada para su análisis por HPLC. Una segunda purificación se realizó con DCM:metanol 2:1 como eluyente, se recolectaron fracciones de 40 gotas en viales, y se procedió de igual manera que en la primera purificación.

Las fracciones fueron analizadas en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución en una elución con el gradiente A, en las mismas condiciones fijadas anteriormente en el apartado 7.4.2.

8. RESULTADOS

Se describen los resultados del análisis inicial por HPLC de fase reversa de los lípidos de espermidin-colesterol sintetizados, el cual se llevó a cabo a las condiciones fijadas en la metodología, con una elución inicial isocrática y posteriormente una con el gradiente A.

8.1 Determinación de fase móvil y gradiente

Las corridas cromatográficas correspondientes a la elución sin gradiente y con gradiente resultadas del primer análisis cromatográfico; se llevaron a cabo observando la insolubilidad de la muestra de los lípidos y del colesterilcloroformiato en la fase móvil, utilizada inicialmente como disolvente para las muestras. Por tanto, por cuestiones de optimización de recursos, se analizaron únicamente el lípido A (2017) para las corridas sin gradiente y los lípidos A y B de la síntesis de 2017 para las corridas con gradiente.

8.1.1 Elución sin gradiente

Se obtuvieron los siguientes cromatogramas y espectros UV en un primer análisis empleando la elución sin gradiente. Inicialmente se dejó un tiempo de corrida de 40 minutos, para observar los tiempos de retención y asegurar la elución completa de los compuestos presentes en la muestra del lípido A (2017) (Figura 12).

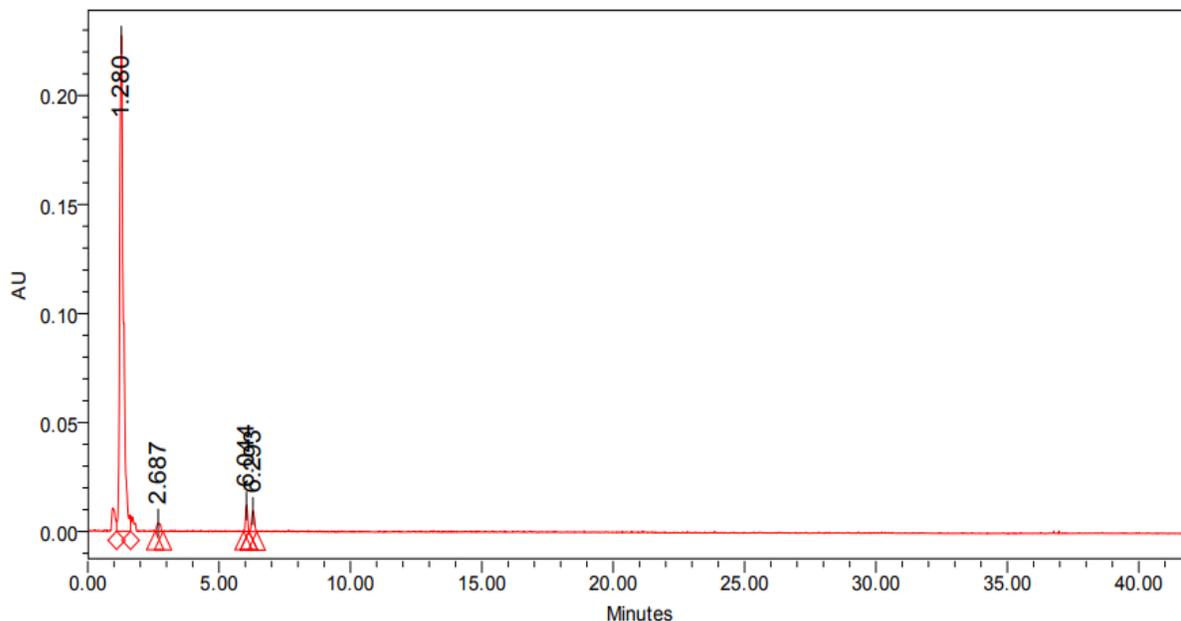


Figura 12. Perfil cromatográfico de lípido A (2017) disuelto en fase móvil en elución isocrática a un tiempo de corrida de 42 minutos.

El equipo permitió la generación de espectros UV de cada uno de los picos presentes en los cromatogramas. El pico mayoritario del lípido A 2017 a un t_R de 1.28 minutos posee un máximo de absorción en 346.5 nm (Figura 13). Los picos a los t_R de 2.687 y 6.293 minutos poseen cuatro máximos de absorción de valores similares, mientras que el pico al t_R de 6.044 minutos posee tres máximos de absorción.

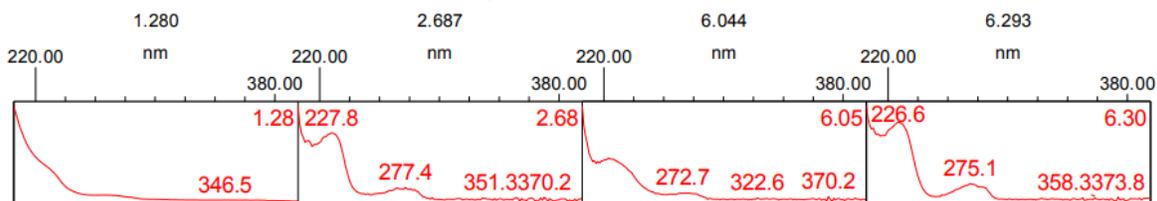


Figura 13. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de lípido A (2017) disuelto en fase móvil en elución isocrática.

Posteriormente se disminuyó el tiempo de corrida a 16 minutos, ya que se encontró que era suficiente para observar la elución de los compuestos en la muestra, además de permitir una mejor visualización de picos minoritarios y de su grado de separación (Figura 14).

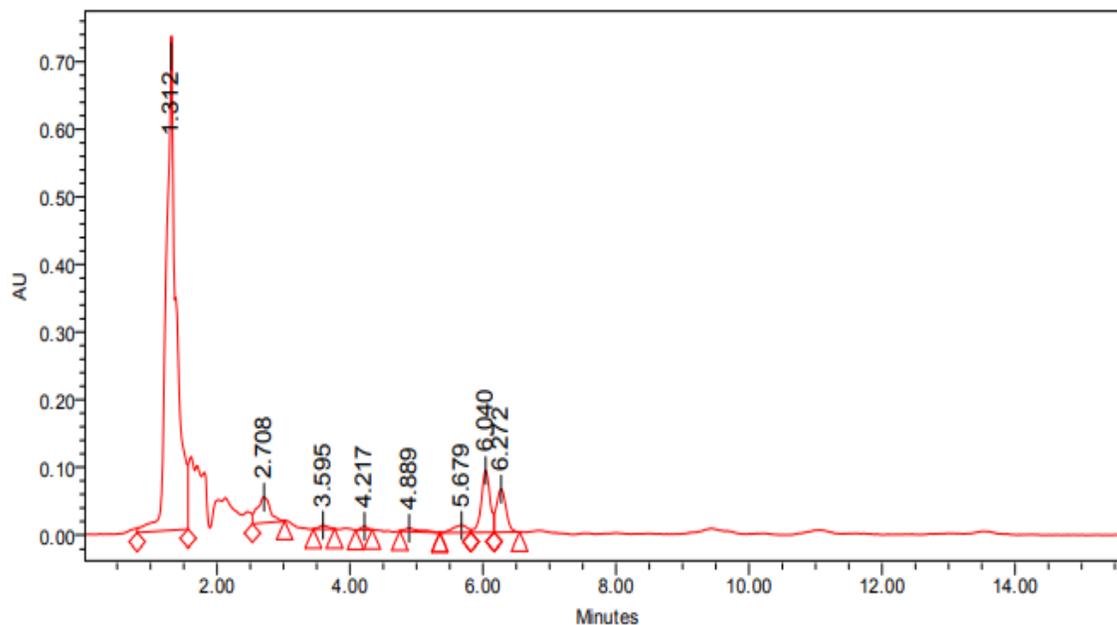


Figura 14. Perfil cromatográfico de lípido A (2017) disuelto en fase móvil en elución isocrática con menor tiempo de corrida.

Se observó que la presencia de un mayor número de picos provocó la obtención de espectros UV ligeramente diferentes, en el número de máximos de absorción y en los valores de dichos máximos, en comparación con los de los picos obtenidos a un mayor tiempo de corrida (Figura 15).

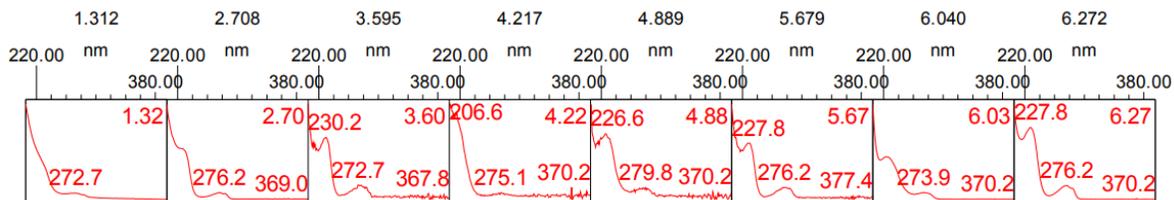


Figura 15. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de lípido A (2017) disuelto en fase móvil en elución isocrática con menor tiempo de corrida.

8.1.2 Elución con gradiente

Se obtuvieron los siguientes cromatogramas y espectros UV en la elución con gradiente (Figuras 16 a 19), con la cual se buscó mejorar la resolución de los picos cromatográficos observados poco resueltos en la elución sin gradiente; además, permitió ofrecer un punto de comparación con el trabajo de Bischoff R, et al¹⁸, quienes utilizaron el gradiente A para el análisis de isómeros de espermidin-colesterol. Se omiten los perfiles cromatográficos del lípido B (2017) y colesterilcloroformiato debido a su insolubilidad en la fase móvil.

El cromatograma de espermidina muestra tres picos, el máximo a un tiempo de retención de 1.3 minutos; de igual manera, se observó un coleo severo en el último pico (Figura 16).

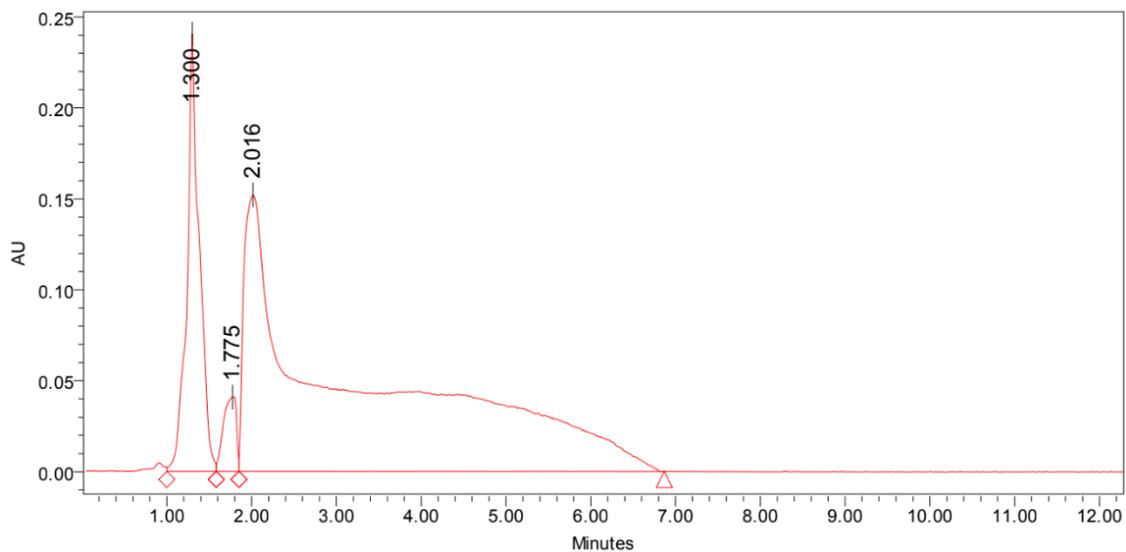


Figura 16. Perfil cromatográfico de la espermidina disuelta en fase móvil, en elución con gradiente.

Los espectros UV del cromatograma de espermidina muestran dos picos a los t_R de 1.775 y 2.016 minutos que poseen máximos de absorción de valores similares: 267.9 y 264.4 nm respectivamente (Figura 17).

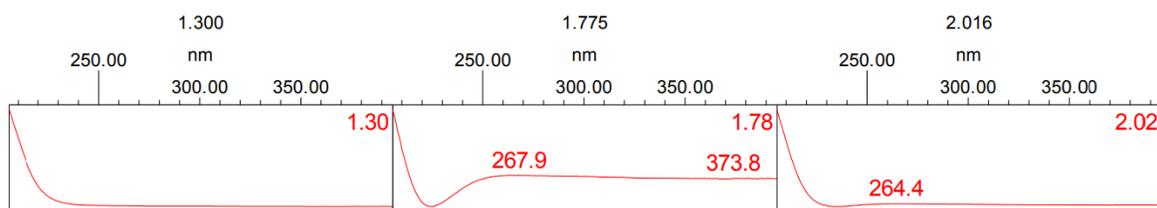


Figura 17. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de espermidina disuelta en fase móvil en elución con gradiente.

El cromatograma del lípido A presenta múltiples picos, los últimos no observados en el cromatograma de espermidina, a los t_R de 8.693 y 9.336 minutos (Figura 18).

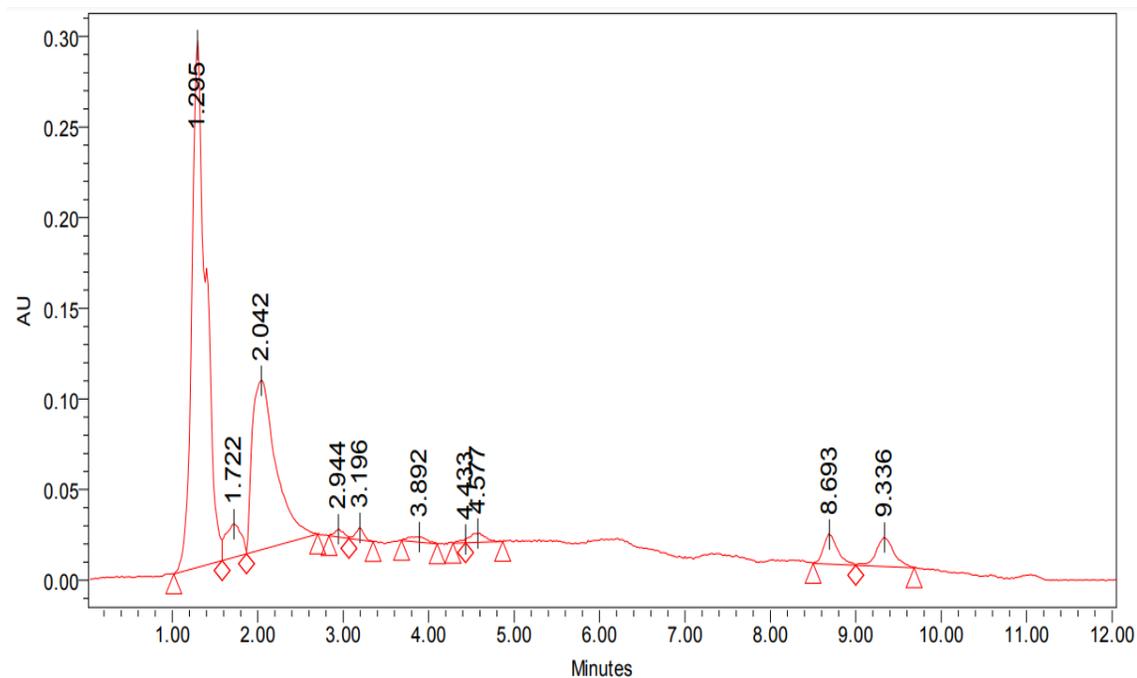


Figura 18. Perfil cromatográfico del lípido A (2017) disuelto en fase móvil, en elución con gradiente.

La Figura 19 muestra los espectros UV de los picos obtenidos en el cromatograma del lípido A (2017), los dos últimos picos se observan con tres máximos de absorción de valores similares.

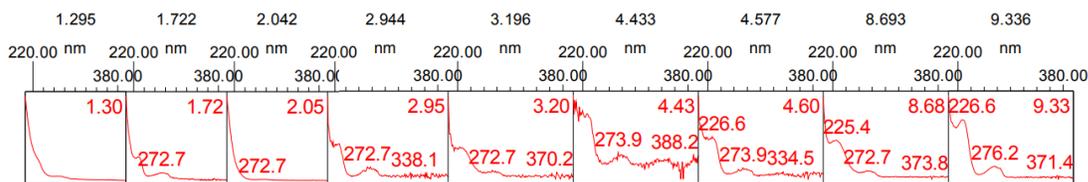


Figura 19. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico del lípido A (2017) disuelto en fase móvil en elución con gradiente.

8.2 Preparación de la muestra y solubilización de espermidin-colesterol

La solubilidad de los lípidos de espermidin-colesterol en distintos disolventes para la disolución de las muestras a analizar en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución se evaluó de manera visual, en una escala cualitativa, lo cual se reporta en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados de las pruebas de solubilidad del espermidin-colesterol, lípido A y B.

Disolvente o mezcla	Lípido A				Lípido B			
	-	Solubilidad		+	-	Solubilidad		+
	1	2	3	4	1	2	3	4
Metanol	•				•			
Etanol	•				•			
Isopropanol	•				•	•		
1-Butanol	•	•			•	•	•	
Acetato de etilo	•				•			
Acetonitrilo	•				•			
Acetona	•				•			
Cloroformo	•	•	•	•	•	•	•	•
Diclorometano	•	•	•	•	•	•	•	•
DMS	•				•			
DMF	•				•			
Éter etílico	•				•			
Metanol/ Isopropanol 7/3	•				•			
Metanol/ diclorometano 1/1	•				•			

Nota:

Se reporta la solubilidad en una escala cualitativa, como • para visualmente insoluble y •••• para visualmente soluble.

Los disolventes en los cuales según diversas fuentes el espermidin-colesterol es soluble, los lípidos A y B no lo fueron, por lo cual se buscó una proporción de disolventes específica para nuestros lípidos.

Se preparó y probó la miscibilidad de dos proporciones de butanol en fase móvil, para observar su comportamiento en el sistema cromatográfico, así como la solubilidad de los lípidos en las mismas; se encontró una proporción a la cual el butanol es miscible con la fase móvil (Tabla 13).

Tabla 13. Miscibilidad de las dos proporciones de butanol/fase móvil y solubilidad del espermidin-colesterol, Lípido A y B, en dichas proporciones.

Proporción	Butanol (mL)	Fase móvil (mL)	Miscibilidad	Solubilidad	
				Lípido A	Lípido B
1	0.5	0.5	No	•	••
2	0.7	0.3	Sí	•	•••

Nota:

Se reporta la solubilidad en una escala cualitativa, como • para visualmente insoluble y •••• para visualmente soluble

Se probó la miscibilidad de cinco proporciones de butanol/isopropanol y la solubilidad del espermidin-colesterol en ellas. El isopropanol cuenta con buena miscibilidad con la mayoría de los disolventes polares utilizados en la fase reversa, sin embargo, se observó que no fue miscible en 4 de las 5 proporciones preparadas (Tabla 14).

Tabla 14. Miscibilidad de cinco proporciones de butanol/isopropanol y solubilidad del espermidin-colesterol, lípido A y B, en dichas proporciones.

Proporción Butanol/ isopropanol	Butanol (mL)	Isopropanol (mL)	Miscibilidad	Solubilidad	
				Lípido A	Lípido B
9/1	0.9	0.1	No	•	•
8/2	0.8	0.2	No	•	•
7/3	0.7	0.3	No	•	•
6/4	0.6	0.4	No	•	•••
5/5	0.5	0.5	Sí	•	••

Nota:

Se reporta la solubilidad en una escala cualitativa, como • para visualmente insoluble y •••• para visualmente soluble.

Debido a que se observó poca solubilidad en las proporciones de butanol/isopropanol, se prepararon cinco proporciones con butanol y diclorometano para disminuir la polaridad y mejorar la solubilidad de los lípidos (Tabla 15).

Tabla 15. Miscibilidad de cinco proporciones de butanol/DCM y solubilidad del espermidin-colesterol, lípido A y B, en dichas proporciones.

Proporción Butanol/ DCM	Butanol (mL)	DCM (mL)	Miscibilidad	Solubilidad	
				Lípido A	Lípido B
9/1	0.9	0.1	Sí	••••	••••
8/2	0.8	0.2	Sí	••••	••••
7/3	0.7	0.3	Sí	••••	••••
6/4	0.6	0.4	Sí	••••	••••
5/5	0.5	0.5	Sí	••••	••••

Nota:

Se reporta la solubilidad en una escala cualitativa, como • para visualmente insoluble y •••• para visualmente soluble

Se observó que a todas las proporciones los dos disolventes son miscibles entre sí, además de que disuelven a los lípidos, por lo que se procedió a probar su miscibilidad con la fase móvil. Se buscó usar la mínima cantidad de diclorometano, debido a que es inmisible con la fase móvil; los resultados se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16. Miscibilidad de dos proporciones de butanol/DCM/fase móvil y solubilidad del espermidin-colesterol, lípido A y B, en dichas proporciones.

	Butanol	DCM	Fase móvil		Miscibilidad	Solubilidad	
			TFA al 0.1% en ACN	TFA al 0.1% en agua		Lípido A	Lípido B
1	0.7	0.1	0.12	0.08	No	••••	••••
2	0.7	0.05	0.15	0.1	Sí	•••	••••

Nota:

Se reporta la solubilidad en una escala cualitativa, como • para visualmente insoluble y •••• para visualmente soluble

En la segunda proporción se observó la completa miscibilidad de la muestra, por lo que se escogió como la ideal para el análisis cromatográfico. Ambos disolventes (diclorometano y butanol) poseen una fuerza de elución menor que la fase móvil, por lo que se esperaba poca variación o perturbación de la línea base por el cambio de disolvente para las muestras.

8.3 Perfil cromatográfico por HPLC de fase reversa de los lípidos de espermidin-colesterol a las condiciones optimizadas

Se obtuvieron los siguientes cromatogramas al analizar las muestras completamente disueltas en la proporción antes mencionada.

El cromatograma de espermidina presenta múltiples picos, el máximo a un t_R de 2.506 minutos, asimismo, se observa una variación de la línea base (Figura 20).

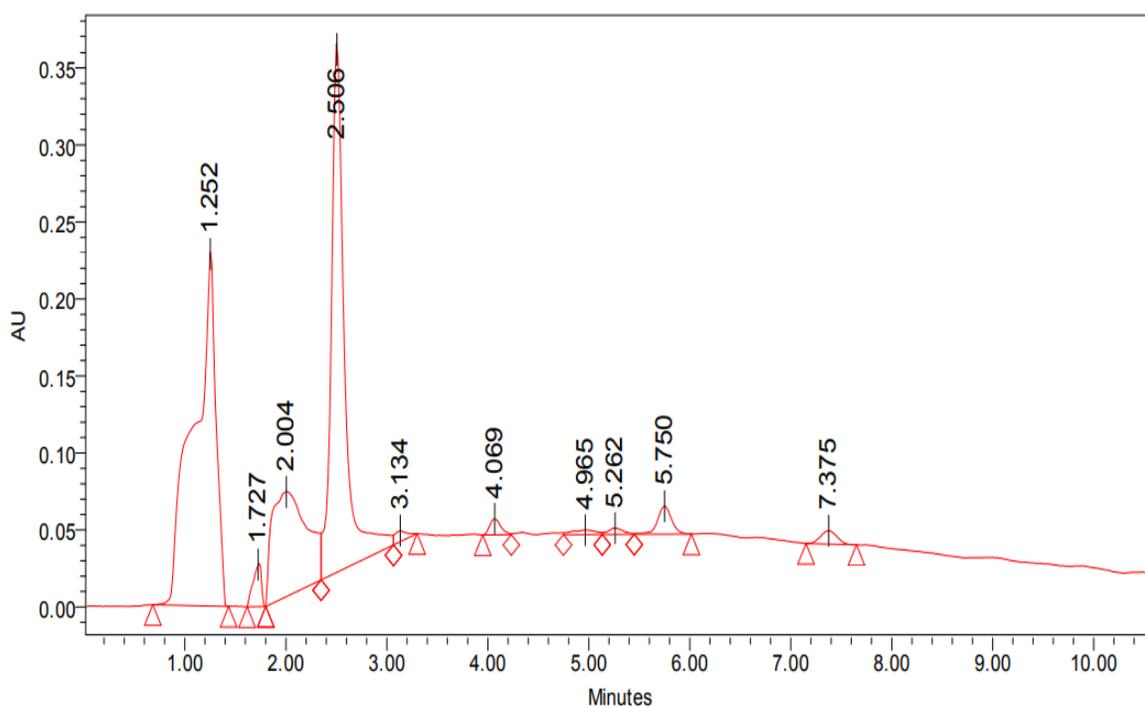


Figura 20. Perfil cromatográfico de espermidina disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A

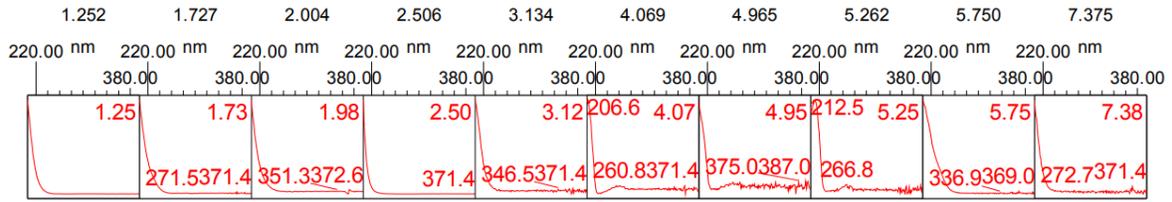


Figura 21. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de espermidina disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

El cromatograma de colestirilcloroformiato posee múltiples picos, el máximo a un t_R de 2.596 minutos; no se observa variación de la línea base (Figura 22).

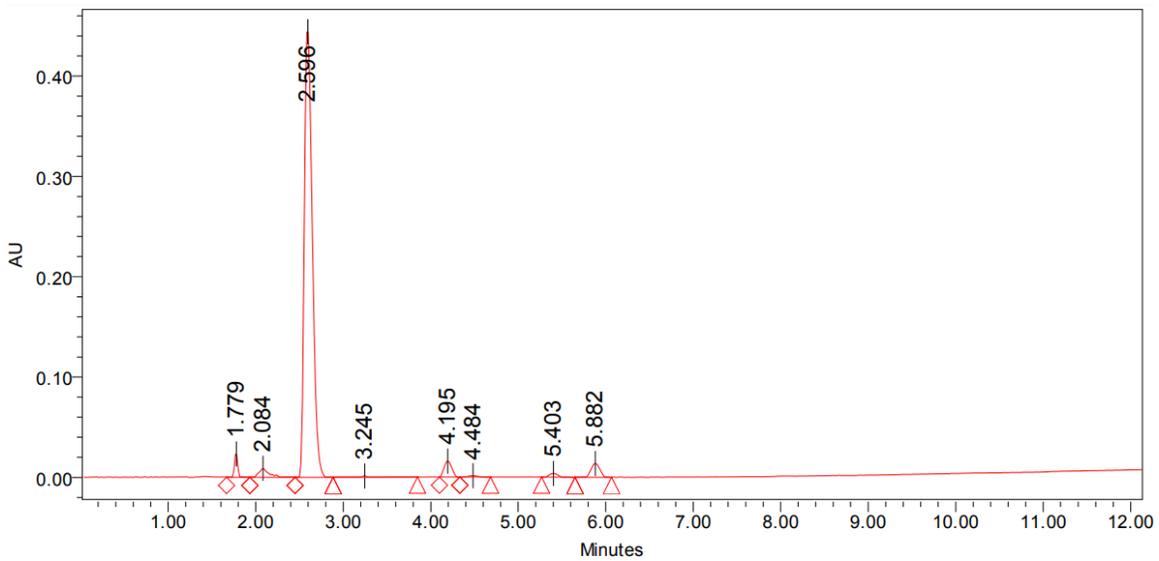


Figura 22. Perfil cromatográfico de colestirilcloroformiato disuelto en 1-butanol/DCM/FM usando gradiente A.

En el espectro UV del pico mayoritario de colesterilcloroformiato se observó que no posee ningún máximo de absorción (Figura 23).

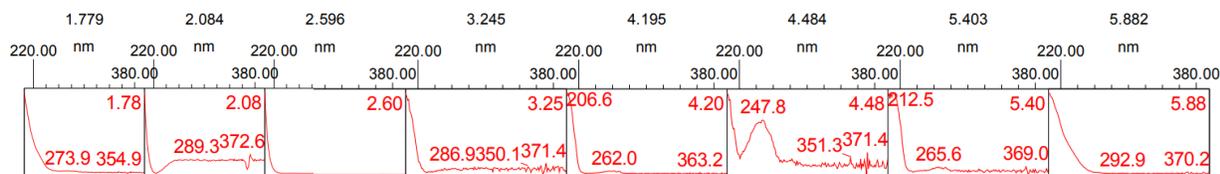


Figura 23. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de colesterilcloroformiato disuelto en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

En el cromatograma del lípido A (2017) se observó variación de la línea base, además de múltiples picos, el máximo a un t_R de 2.569 minutos. Posee dos picos no observados en los cromatogramas de espermidina ni colesterilcloroformiato, a los t_R de 8.144 y 8.757 minutos (Figura 24).

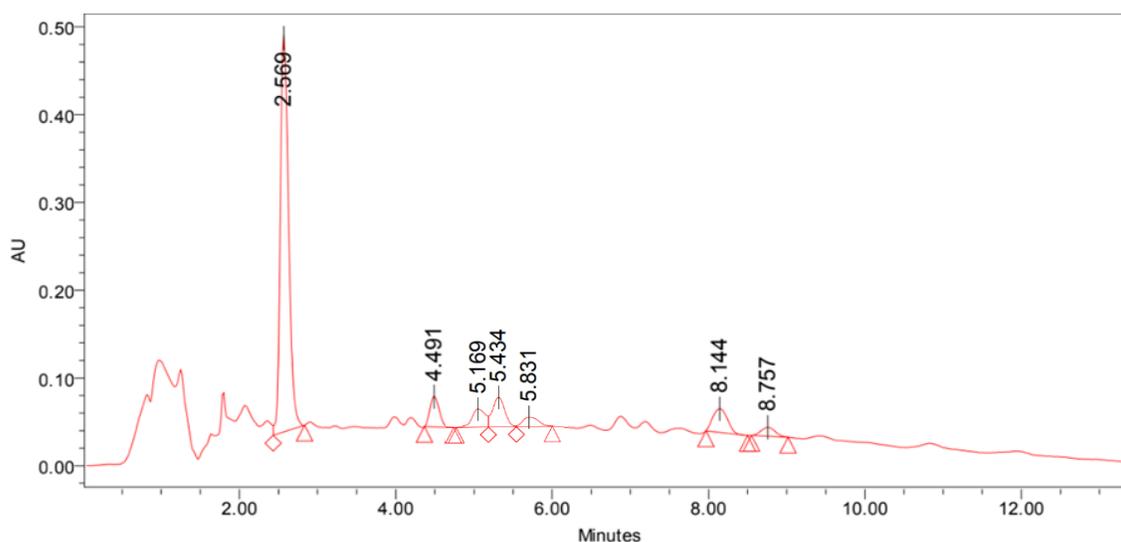


Figura 24. Perfil cromatográfico de lípido A (2017) disuelto en butanol/DCM/FM usando gradiente A.

Los dos últimos picos poseen tres máximos de absorción, el primero a 272.7, 354.9 y 369 nm; mientras que el último a 226.6, 277.4 y 362.2 nm (Figura 25).

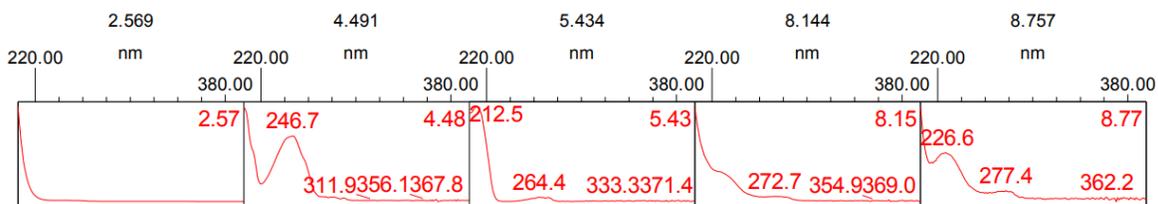


Figura 25. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de lípido A (2017) disuelto en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

El cromatograma del lípido A (2022) muestra variación de la línea base y múltiples picos; el máximo a un t_R de 2.531 minutos. Se observó que el último pico, a un t_R de 8.049 minutos, no está presente en los cromatogramas de espermidina ni colesterilcloroformiato (Figura 26).

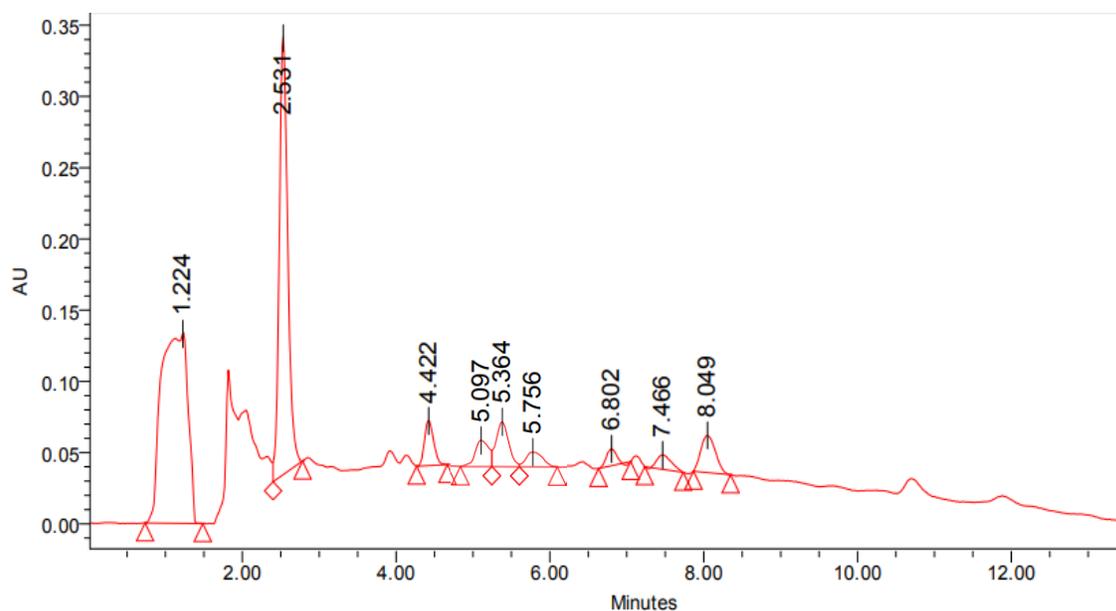


Figura 26. Perfil cromatográfico de lípido A (2022) disuelto en butanol/DCM/FM usando gradiente A.

El último pico posee dos máximos de absorción a 275.1 y 367.8 nm (Figura 27).

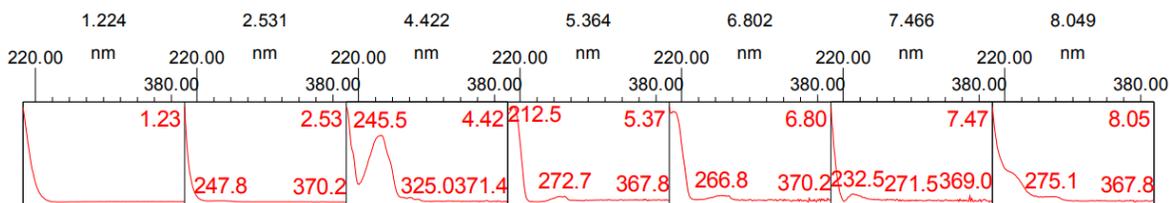


Figura 27. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de lípido A (2022) disuelto en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

El cromatograma del lípido B (2017) no presenta variación de la línea base y posee múltiples picos; el máximo a un t_R de 2.602 minutos. Se observó un pico no presente en los cromatogramas de espermidina ni colesterilcloroformiato, a un t_R de 8.238 minutos (Figura 28).

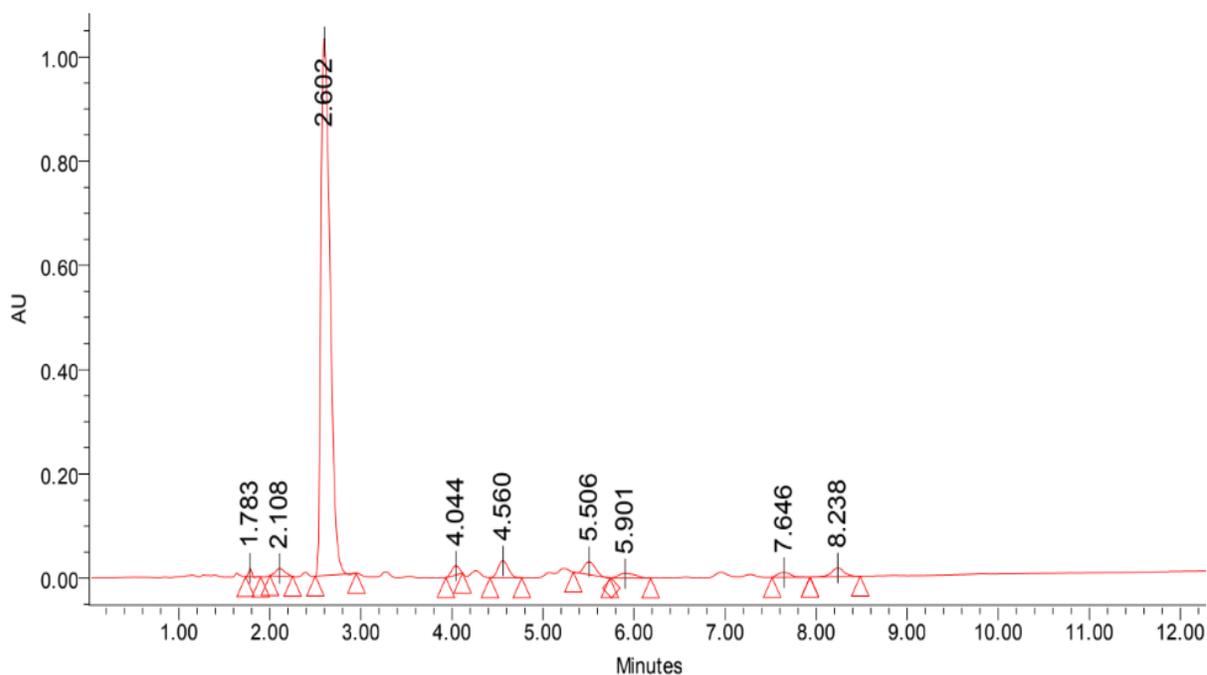


Figura 28. Perfil cromatográfico de lípido B (2017) disuelto en butOH/DCM/FM usando gradiente A.

El último pico posee un máximo de absorción a 276.2 nm (Figura 29).

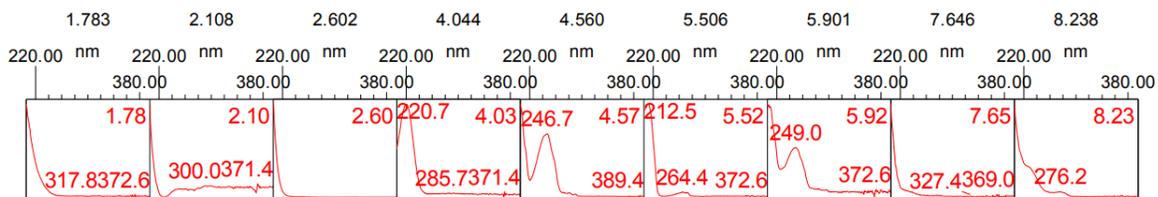


Figura 29. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de lípido B (2017) disuelto en butOH/DCM/FM, elución con gradiente A.

El cromatograma del lípido B (2022) muestra variación de la línea base y múltiples picos; el máximo a un t_R de 2.514 minutos. Presenta un pico no observado en los cromatogramas de espermidina ni colesterilcloroformiato, a un t_R de 8.023 minutos (Figura 30).

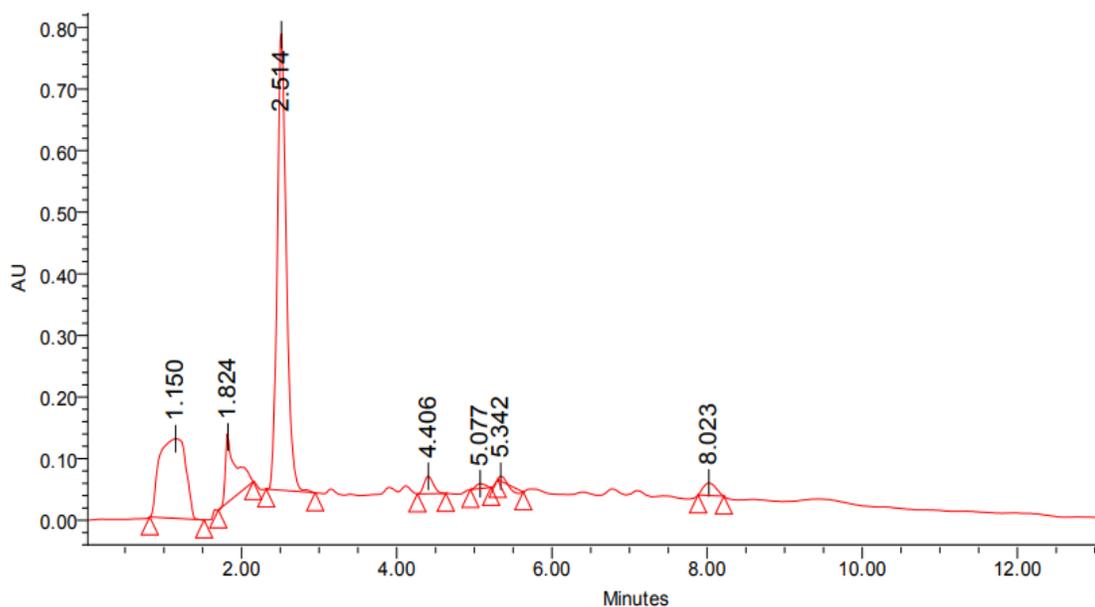


Figura 30. Perfil cromatográfico de lípido B (2022) disuelto en butanol/DCM/FM usando gradiente A.

El pico máximo del lípido B (2022) no posee máximos de absorción, mientras que el último pico posee dos máximos de absorción a 273.9 y 369 nm (Figura 31).

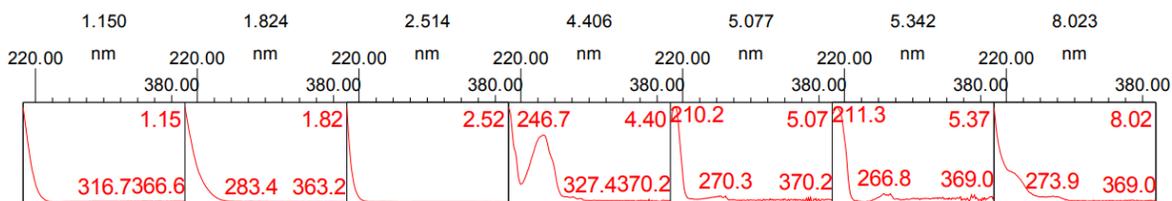


Figura 31. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de lípido B (2022) disuelto en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

8.4 Purificación de espermidin-colesterol por cromatografía en columna de sílica gel

Se obtuvieron los siguientes cromatogramas en la primera purificación, la cual se vio interrumpida por el sismo, por lo que sólo se recolectaron 6 fracciones. Se omiten algunos espectros UV por comodidad, para evitar la repetibilidad de espectros de fracciones cuyas composiciones son similares.

La primera fracción no presenta variación de la línea base, se observan dos picos máximos que no poseen máximos de absorción UV (Figuras 32 y 33).

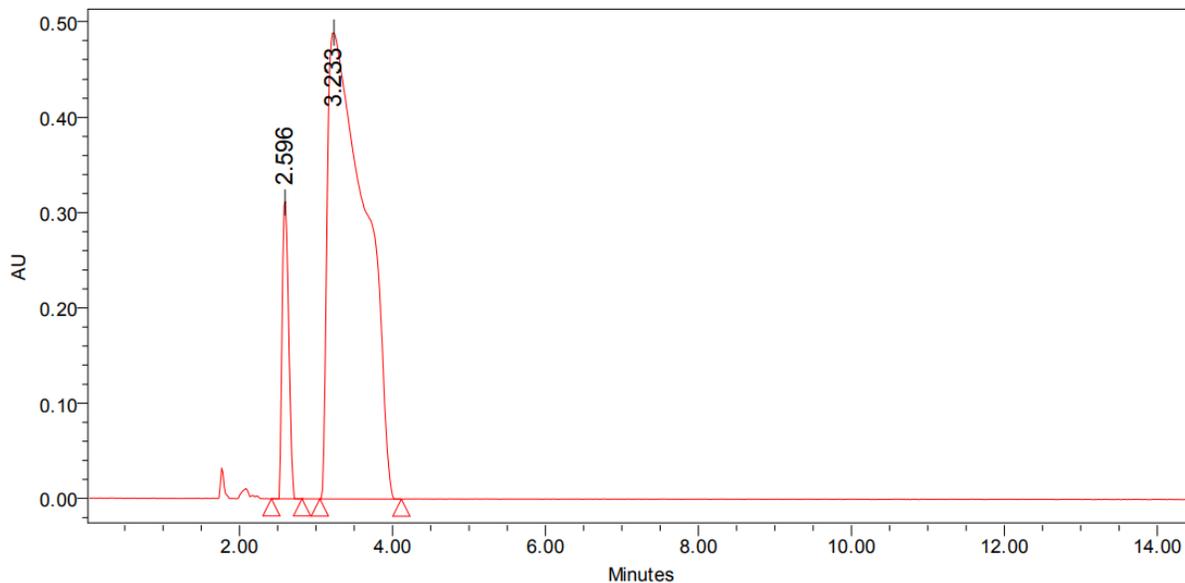


Figura 32. Perfil cromatográfico de la fracción 1 de la primera purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

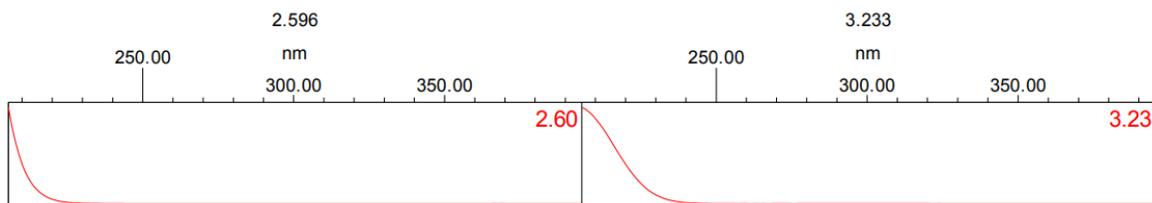


Figura 33. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de la fracción 1 de la primera purificación del lípido A (2017) disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

La fracción 2 presenta variación de la línea base y un pico máximo al t_R de 2.589 minutos (Figura 34).

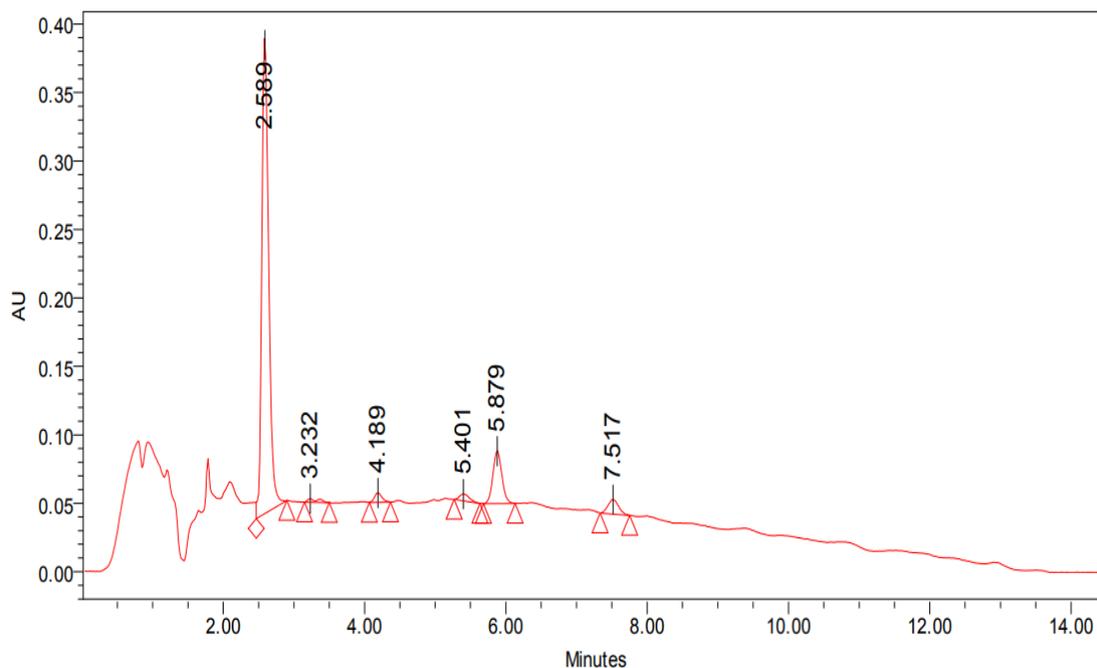


Figura 34. Perfil cromatográfico de la fracción 2 de la primera purificación del lípido A (2017), disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

Los cromatogramas de las fracciones 3 y 4 son similares, no presentan variación de la línea base, poseen un pico máximo a los t_R de 2.607 y 2.592 minutos, respectivamente; los cuales no poseen máximos de absorción UV (Figuras 35, 36 y 37).

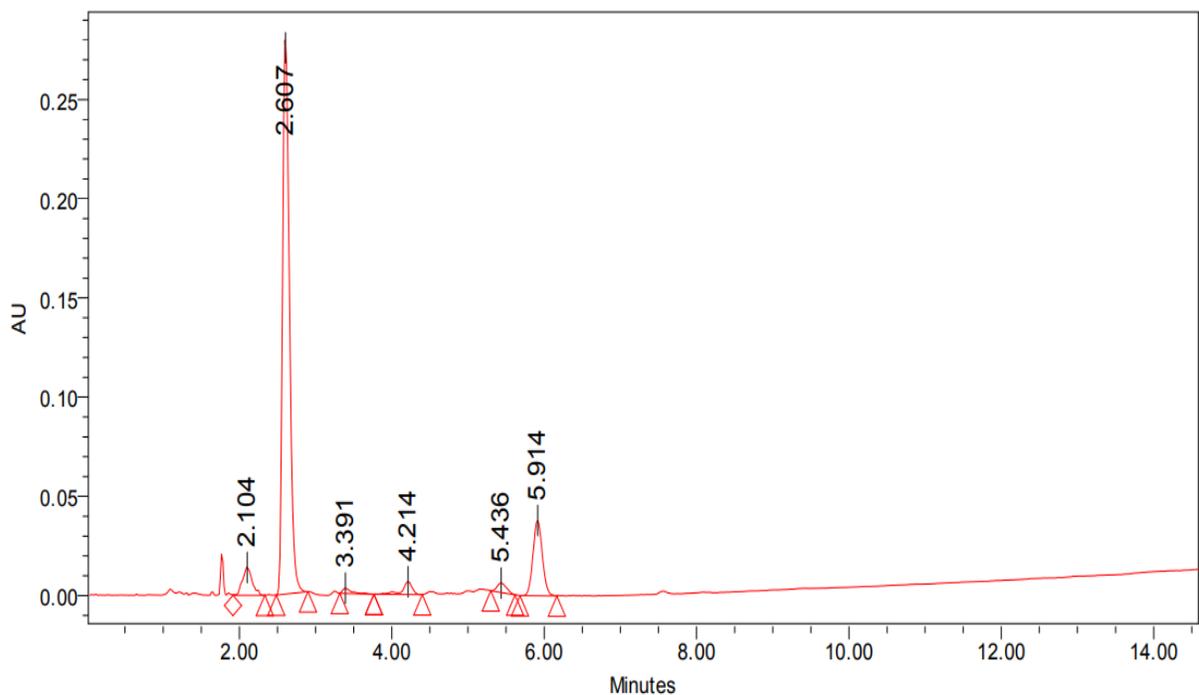


Figura 35. Perfil cromatográfico de la fracción 3 de la primera purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

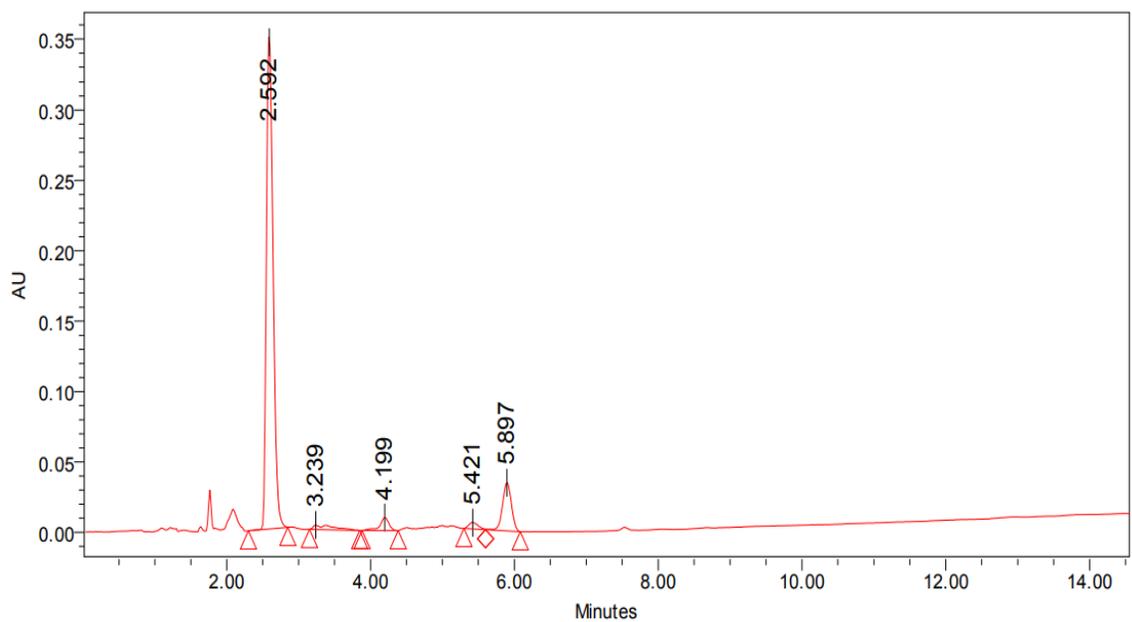


Figura 36. Perfil cromatográfico de la fracción 4 de la primera purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

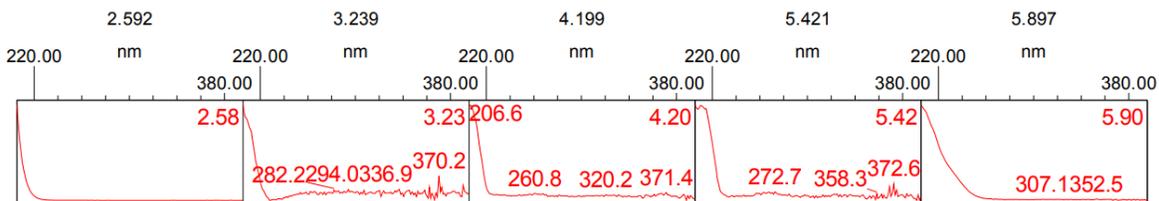


Figura 37. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de la fracción 4 de la primera purificación del lípido A (2017) disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

La fracción 5 no presenta variación de la línea base y posee un solo pico a un t_R de 2.589 minutos (Figura 38).

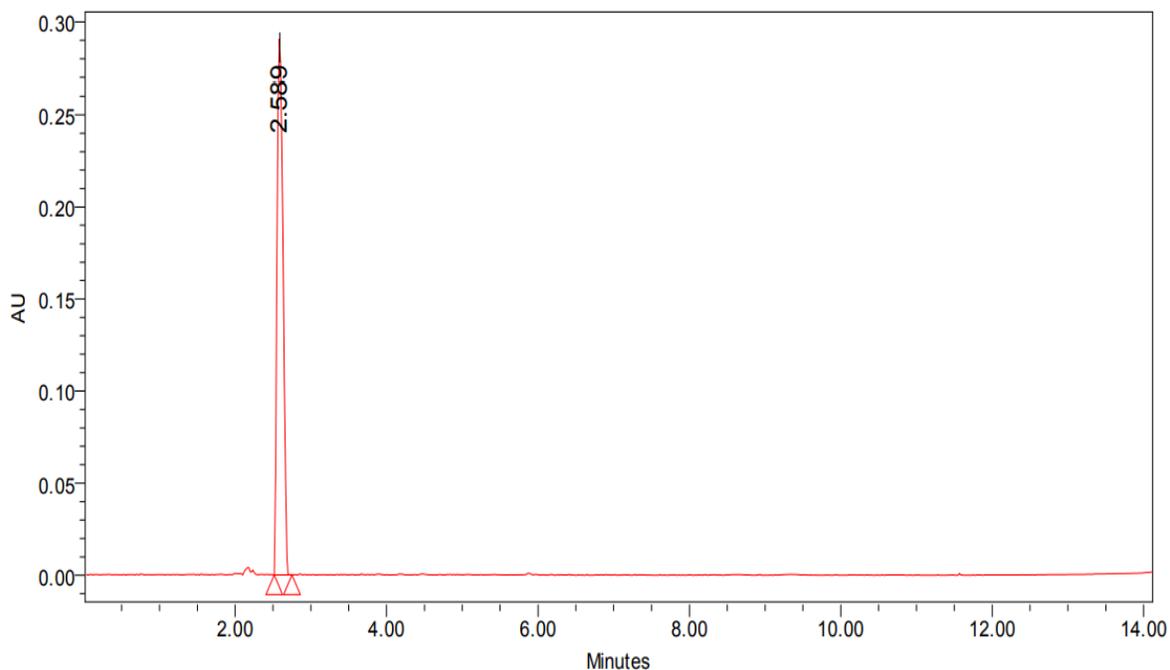


Figura 38. Perfil cromatográfico de la fracción 5 de la primera purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

La fracción 6 se observó similar a las fracciones 3 y 4, con excepción de los dos últimos picos a los t_R de 8.651 y 9.352 minutos, que no se observan en dichas fracciones, ni en las anteriores (Figura 39).

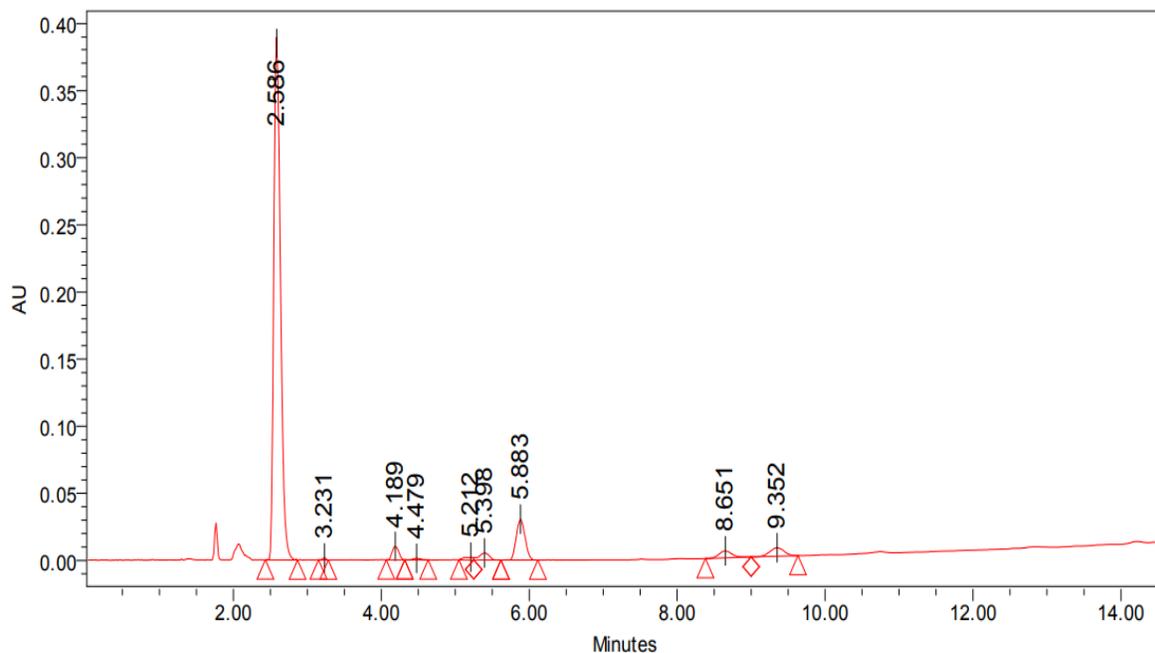


Figura 39. Perfil cromatográfico de la fracción 6 de la primera purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

El pico máximo no posee máximos de absorción, mientras que el pico al t_R de 8.651 minutos posee dos, a 226 y 277.4 nm; y el pico al t_R de 9.352 minutos posee solo uno, a 277.4 nm (Figura 40).

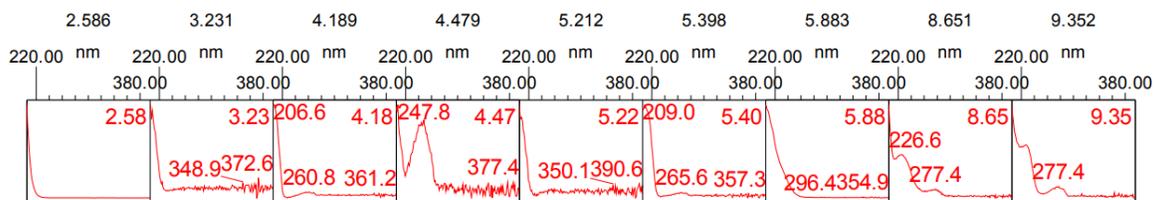


Figura 40. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de la fracción 6 de la primera purificación del lípido A (2017) disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

Se llevó a cabo una segunda purificación, en la cual se recolectaron más fracciones para observar de manera más completa el proceso de purificación. Por cuestión de ahorro de recursos las primeras cuatro fracciones se unieron, para un enfoque de las fracciones que no se lograron recolectar en la primera purificación.

El cromatograma de la fracción 1-4 no presenta variación de la línea base y posee dos picos máximos, los cuales no tienen máximos de absorción UV (Figura 41 y 42).

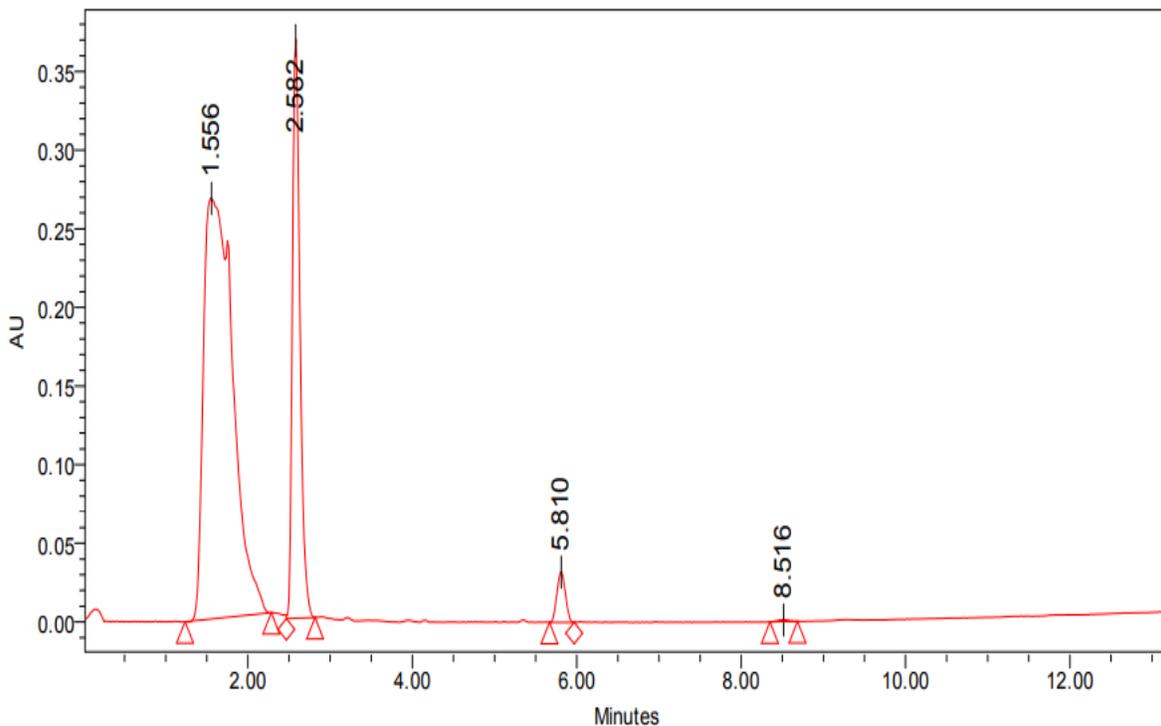


Figura 41. Perfil cromatográfico de fracciones 1-4 de la segunda purificación disueltas en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

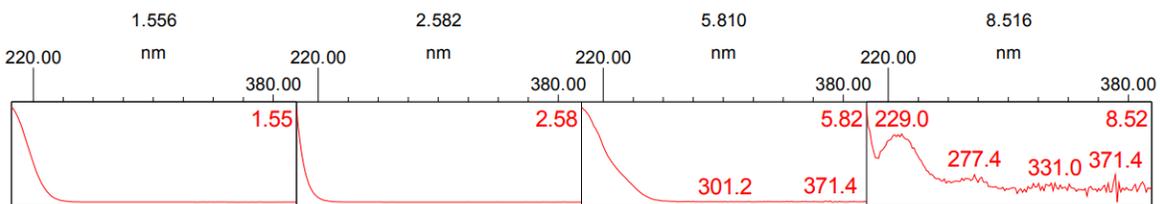


Figura 42. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de la fracción 1-4 de la segunda purificación del lípido A (2017) disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

La fracción 5 muestra una variación de la línea base, posee un pico máximo a un t_R de 2.471 minutos, el cual no tiene máximos de absorción (Figuras 43 y 44).

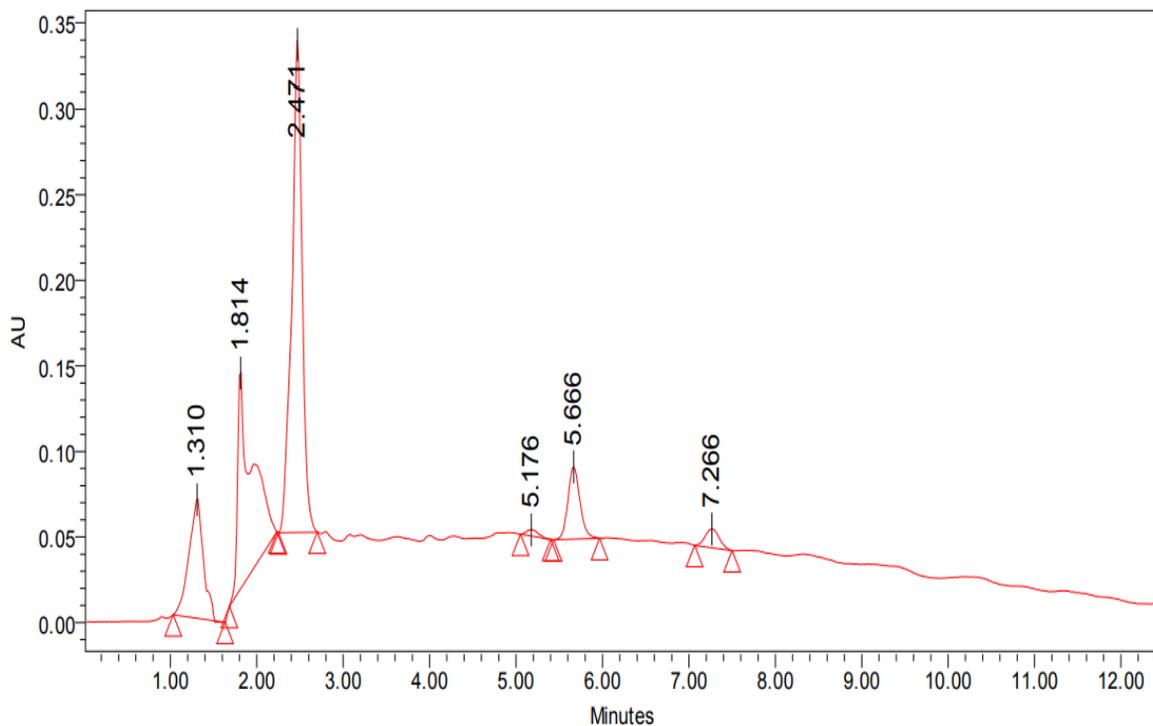


Figura 43. Perfil cromatográfico de la fracción 5 de la segunda purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM elución con gradiente A.

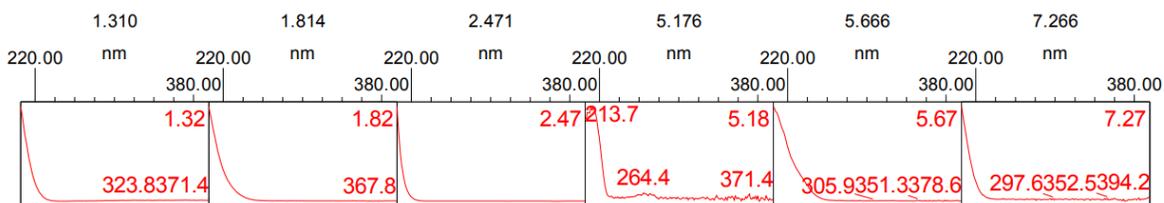


Figura 44. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de la fracción 5 de la segunda purificación del lípido A (2017) disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

Los cromatogramas de las fracciones 6, 7 y 8 son similares a la fracción 5, pero poseen picos adicionales: la fracción 6 a un t_R de 8.569 minutos, la fracción 7 al t_R de 8.589 minutos y la fracción 8 a los t_R de 8.597, 9.301 minutos (Figuras 45 a 47).

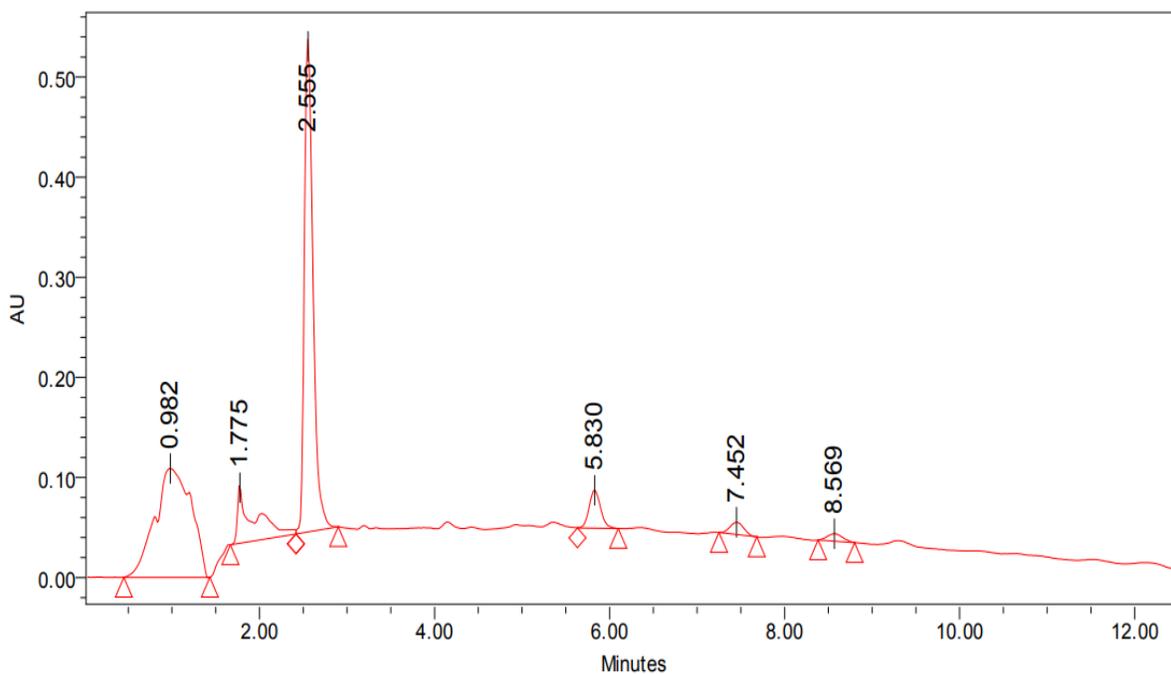


Figura 45. Perfil cromatográfico de la fracción 6 de la segunda purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

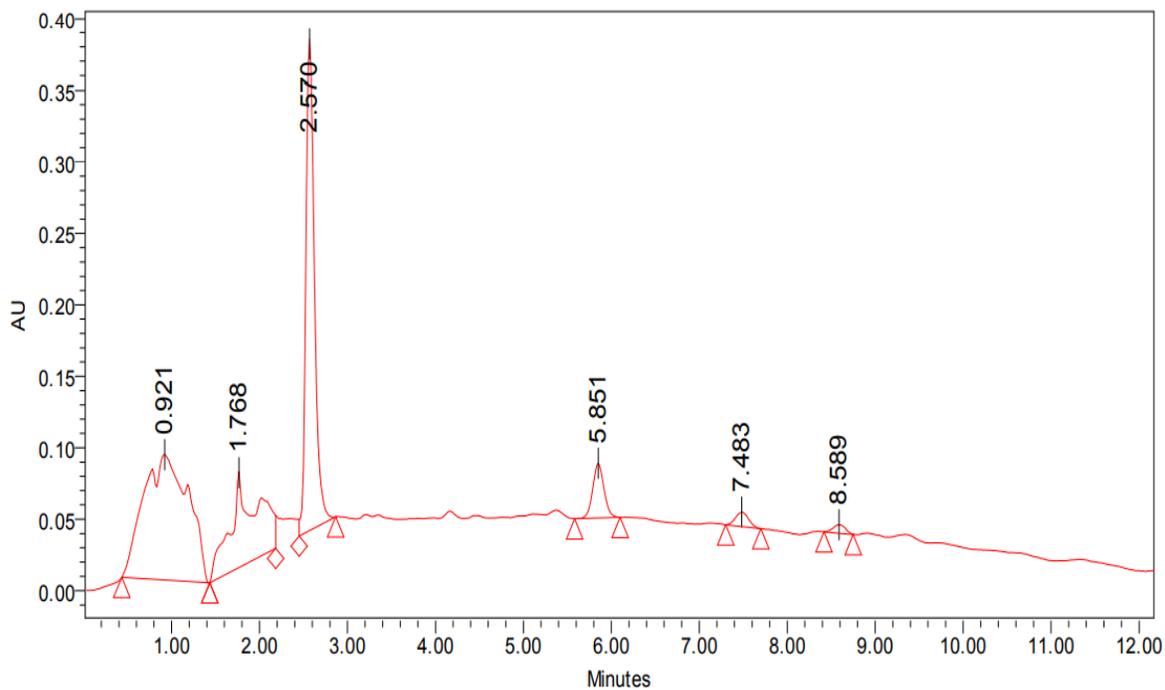


Figura 46. Perfil cromatográfico de la fracción 7 de la segunda purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

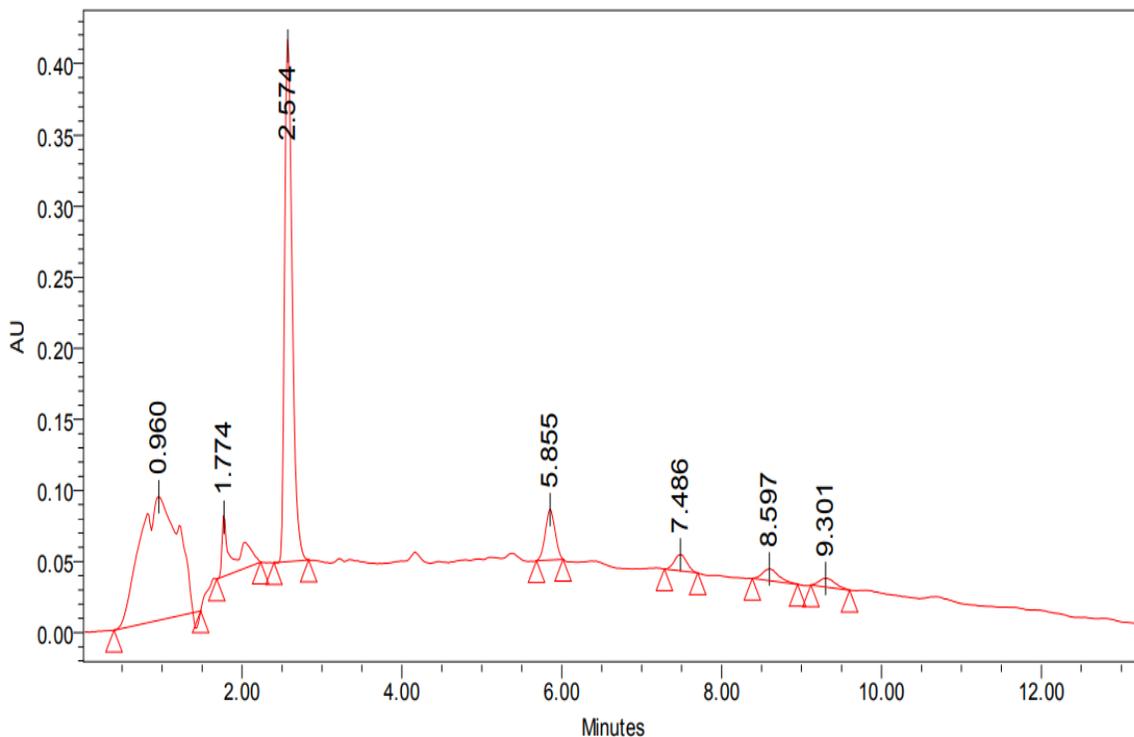


Figura 47. Perfil cromatográfico de la fracción 8 de la segunda purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM elución con gradiente A.

Los dos últimos picos de la fracción 8 poseen máximos de absorción similares, el primero a 282.2 y 369 nm; y el último a 276.2 y 369 nm (Figura 48).

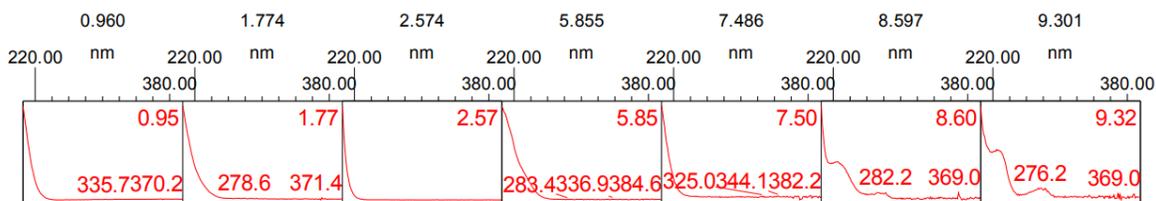


Figura 48. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de la fracción 8 de la segunda purificación del lípido A (2017) disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

La fracción 9 no presenta variación de la línea base y posee solo un pico a 2.586 minutos (Figura 49).

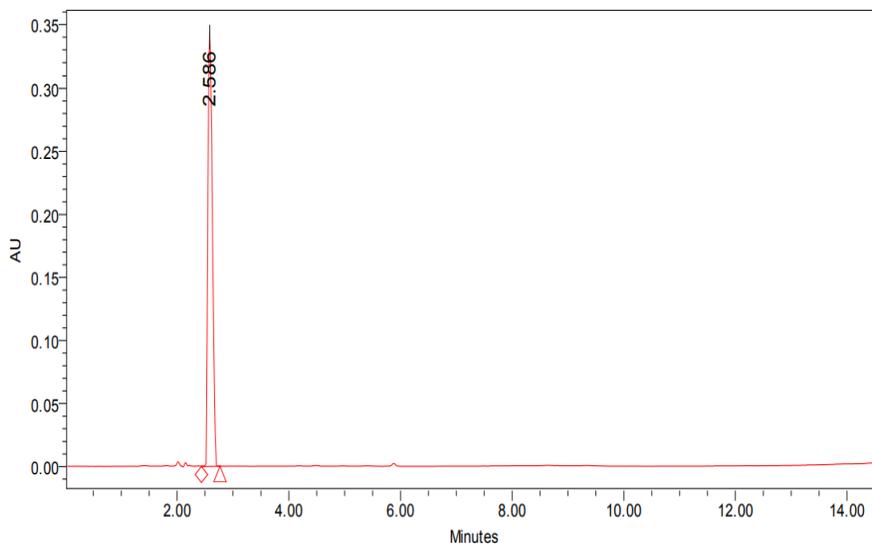


Figura 49. Perfil cromatográfico de la fracción 9 de la segunda purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

Los cromatogramas de las fracciones 10, 12 y 13 se observaron similares, con múltiples picos y variación de la línea base, mientras que la fracción 11 tiene menor presencia de picos y no presenta variación de su línea base (Figuras 50 a 53).

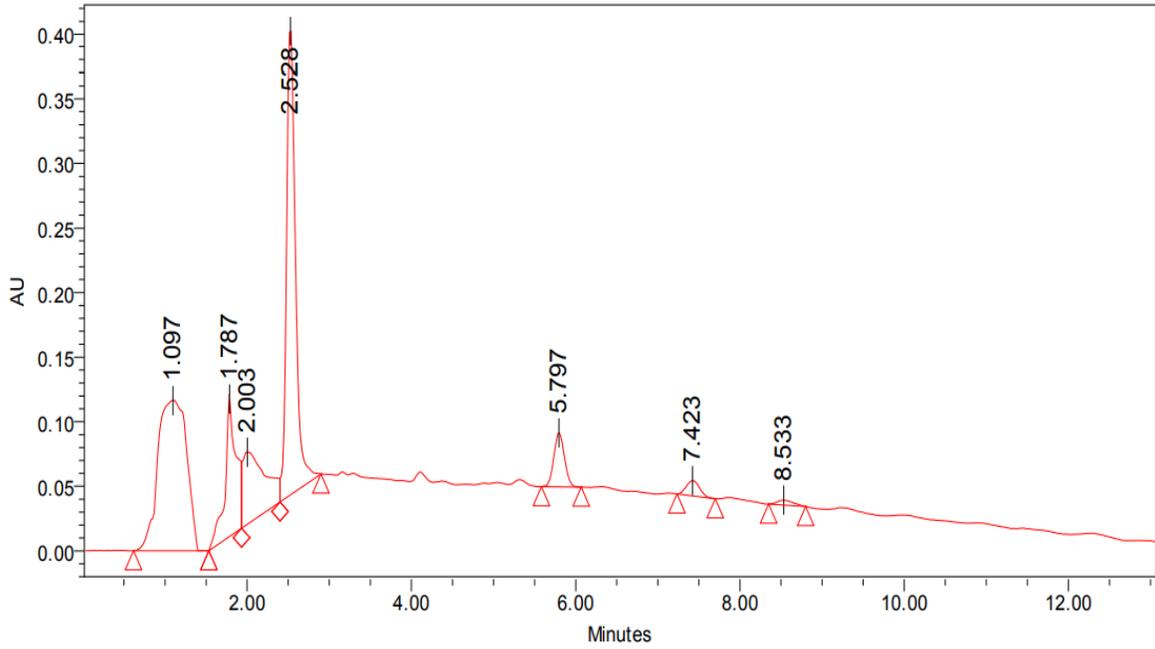


Figura 50. Perfil cromatográfico de la fracción 10 de la segunda purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

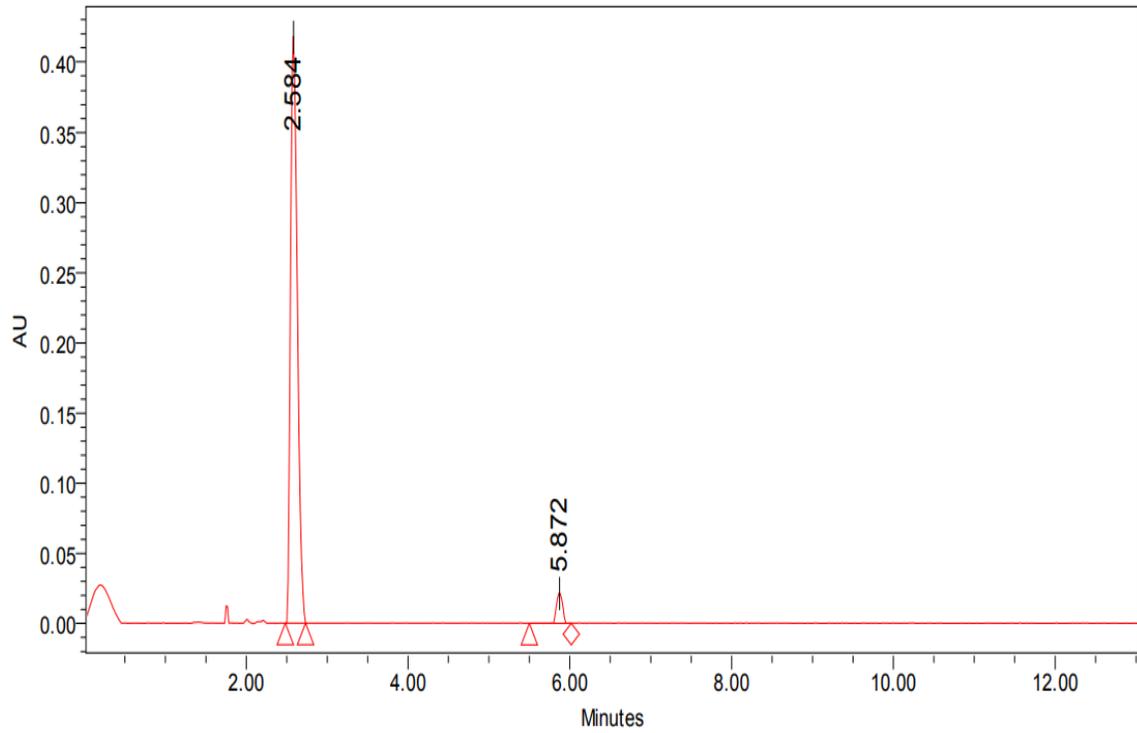


Figura 51. Perfil cromatográfico de la fracción 11 de la segunda purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

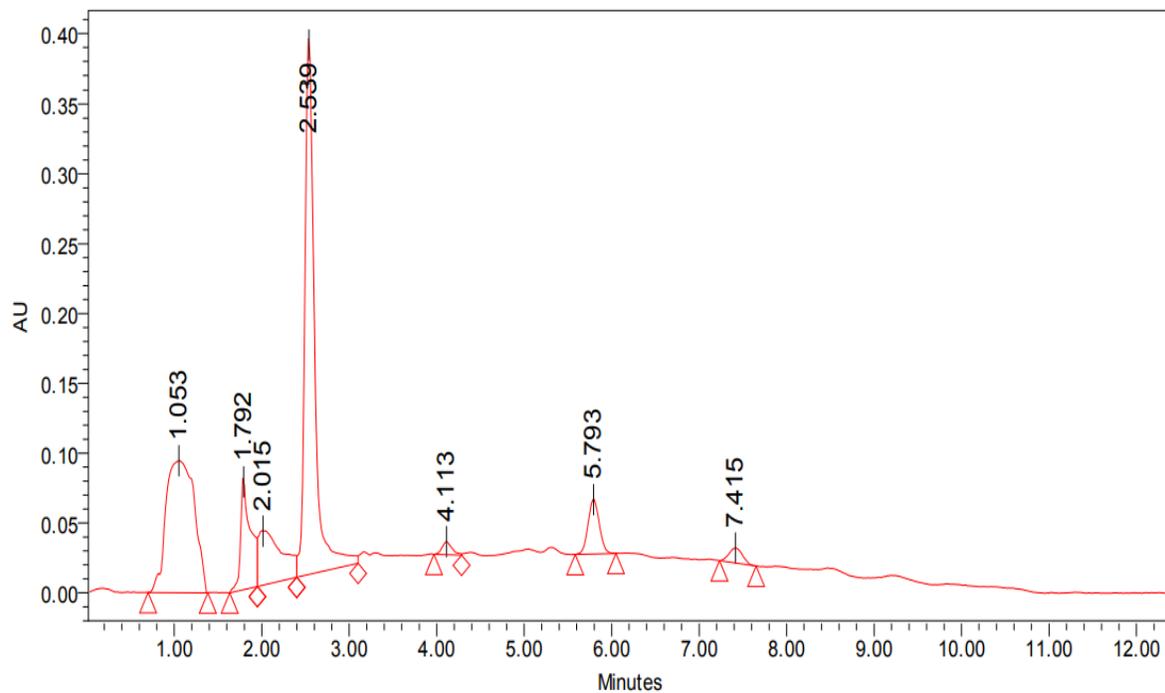


Figura 52. Perfil cromatográfico de la fracción 12 de la segunda purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

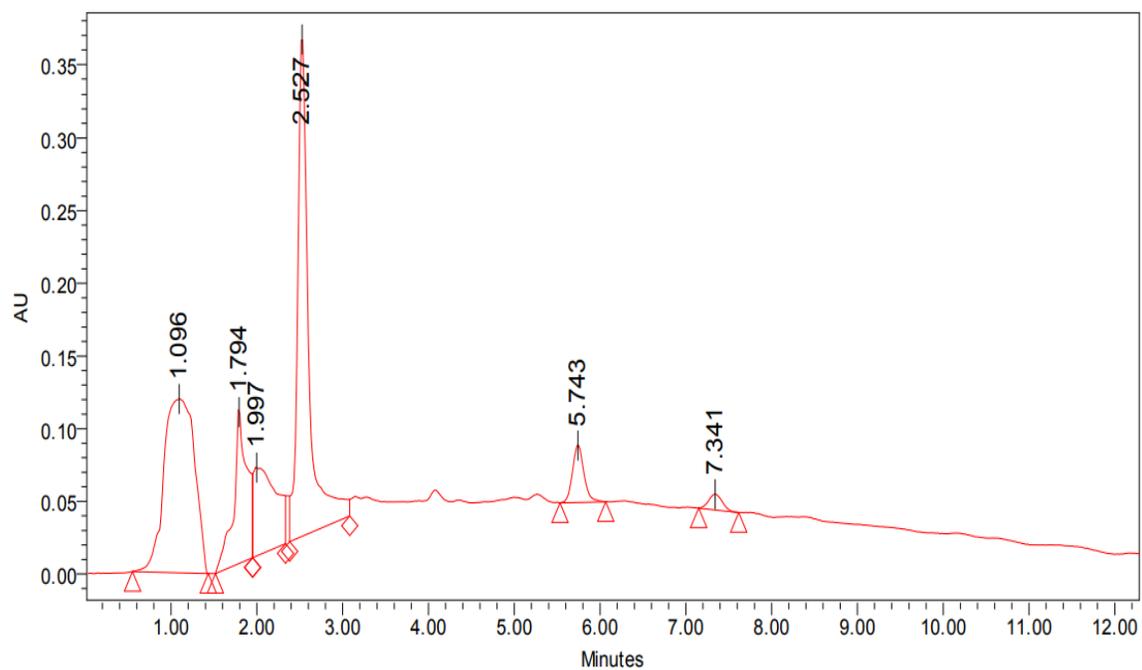


Figura 53. Perfil cromatográfico de la fracción 13 de la segunda purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

Se obtuvieron los siguientes cromatogramas de la tercera purificación del lípido A (2017):

En la fracción 1 no se observa variación de la línea base, posee un pico máximo al t_R de 2.664 minutos sin máximos de absorción UV (Figuras 54 y 55). La fracción 2 se observa similar (Figura 56).

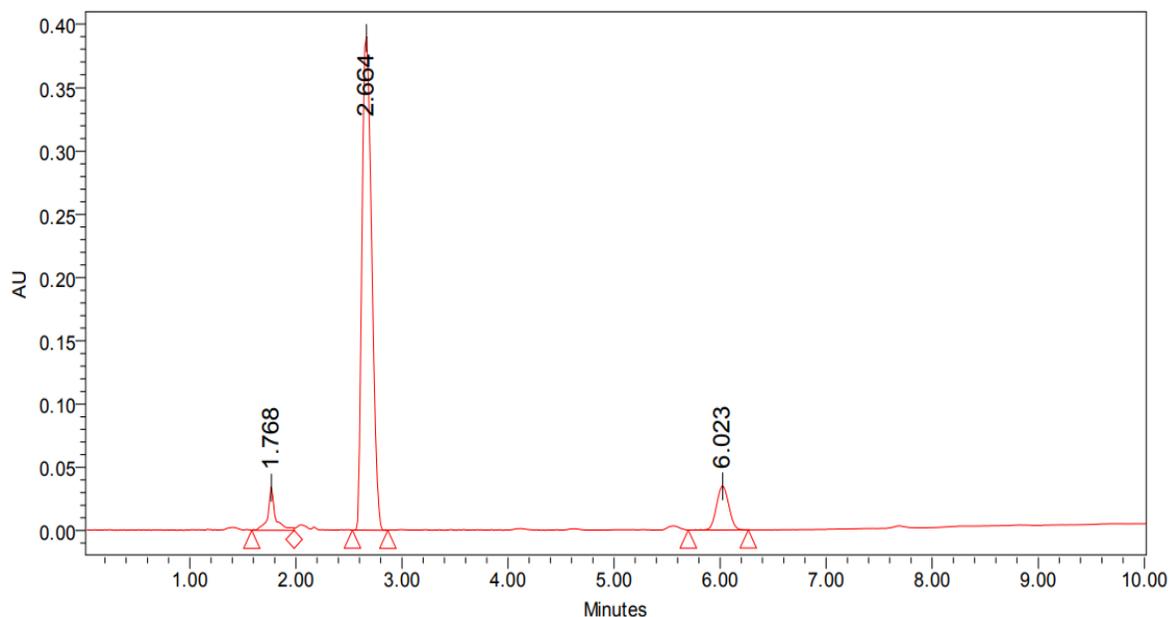


Figura 54. Perfil cromatográfico de la fracción 1 de la tercera purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

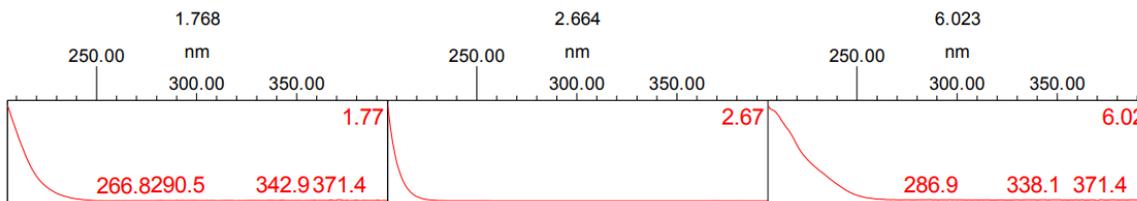


Figura 55. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de la fracción 1 de la tercera purificación del lípido A (2017) disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

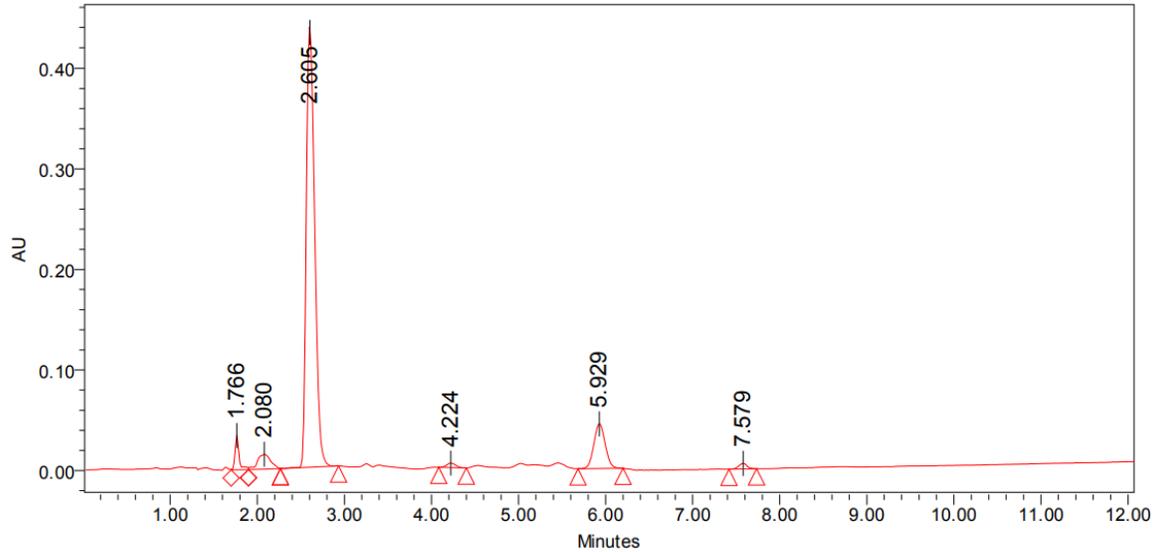


Figura 56. Perfil cromatográfico de la fracción 2 de la tercera purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

El cromatograma de la fracción 3 presenta variación de la línea base y múltiples picos, el máximo a un t_R de 2.523 minutos, el cual no posee máximos de absorción (Figuras 57 y 58).

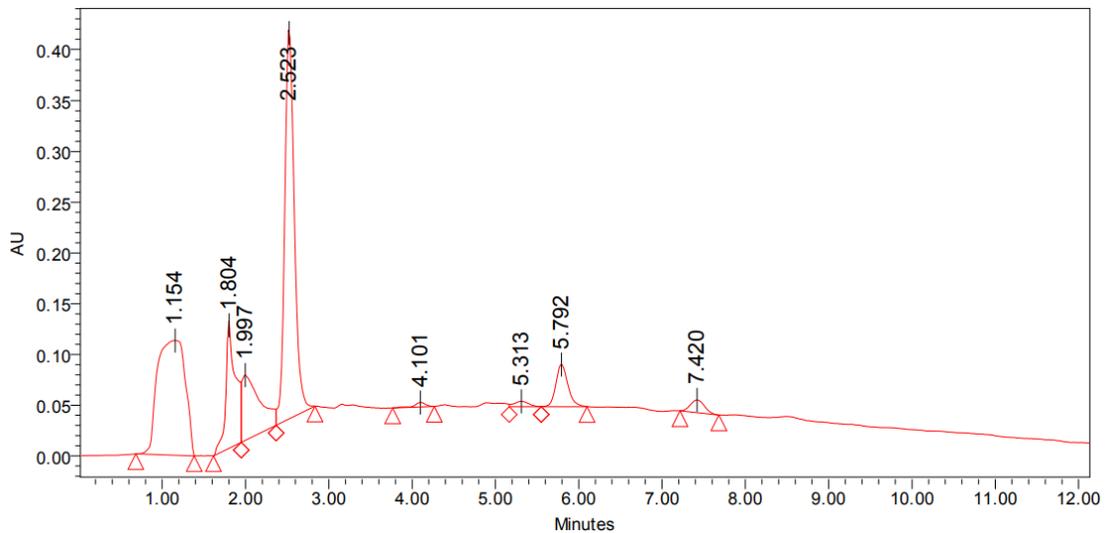


Figura 57. Perfil cromatográfico de la fracción 3 de la tercera purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

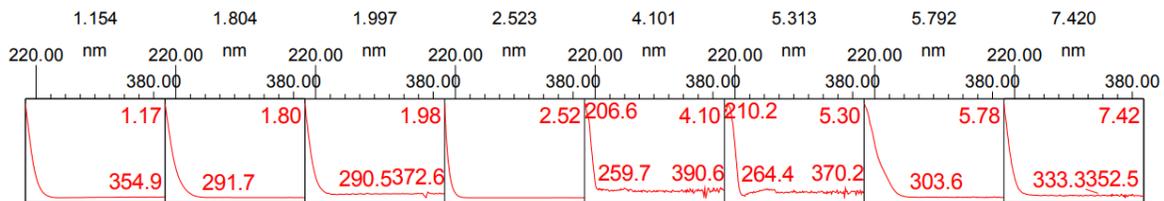


Figura 58. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de la fracción 3 de la tercera purificación del lípido A (2017) disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

La fracción 4 se observó similar a la fracción 3, presentó variación de la línea base y múltiples picos, el máximo a un t_R de 2.515 minutos, sin máximos de absorción. Se observaron dos últimos picos adicionales, el primero a un t_R de 8.526 minutos tiene un máximo de absorción a 272.7 nm y el último al t_R de 9.278 minutos tiene dos máximos a 226.6 y 276.2 nm (Figuras 59 y 60).

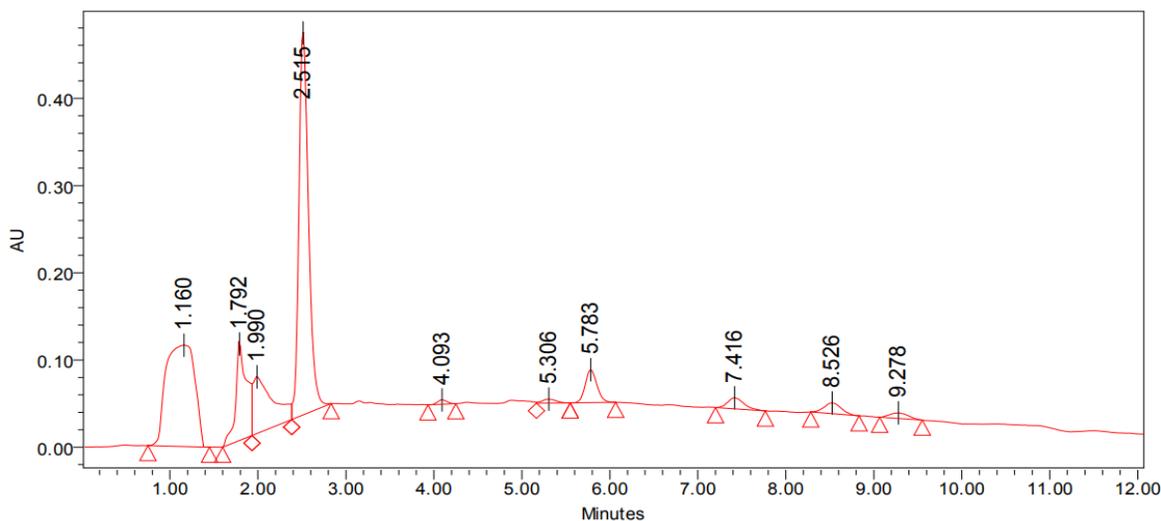


Figura 59. Perfil cromatográfico de la fracción 4 de la tercera purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

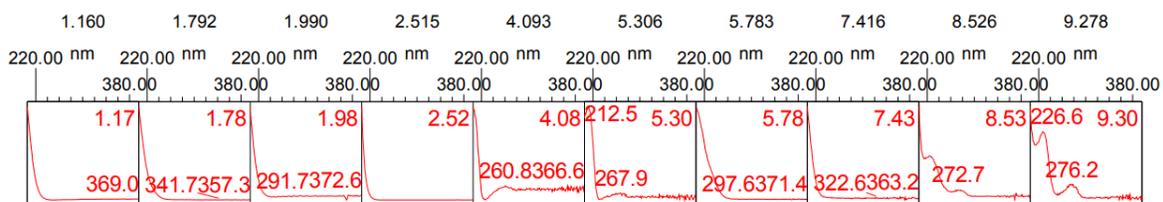


Figura 60. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de la fracción 4 de la tercera purificación del lípido A (2017) disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

La fracción 5 muestra similitud con la 4, se observan incluso los dos últimos picos, a un t_R de 8.521 y 9.258 minutos. Ambos poseen tres máximos de absorción, el primero a 226.6, 273.9 y 372.6 nm; y el segundo igualmente a 226.6, 273.9 y 365.3 nm (Figuras 61 y 62).

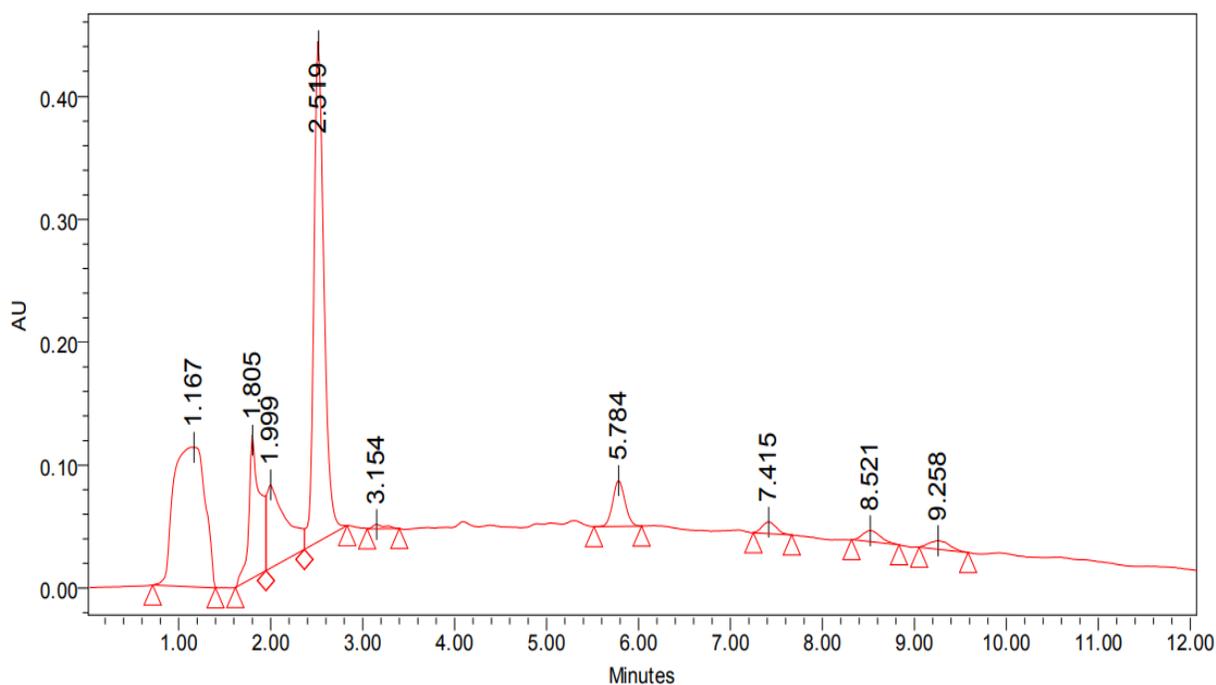


Figura 61. Perfil cromatográfico de la fracción 5 de la tercera purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

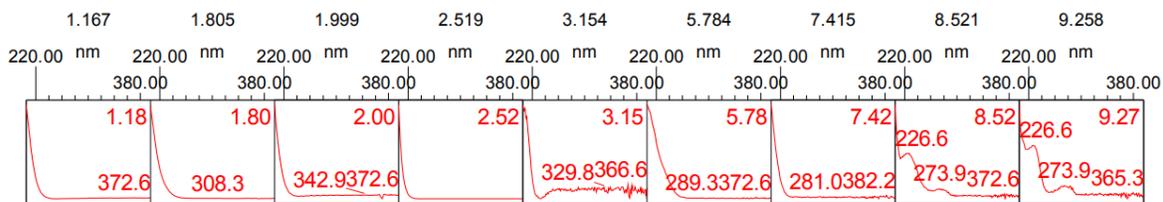


Figura 62. Espectros UV de los picos del perfil cromatográfico de la fracción 5 de la tercera purificación del lípido A (2017) disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

La fracción 6 no presenta variación de la línea base y se observan múltiples picos, el máximo a un t_R de 2.595 minutos (Figura 63).

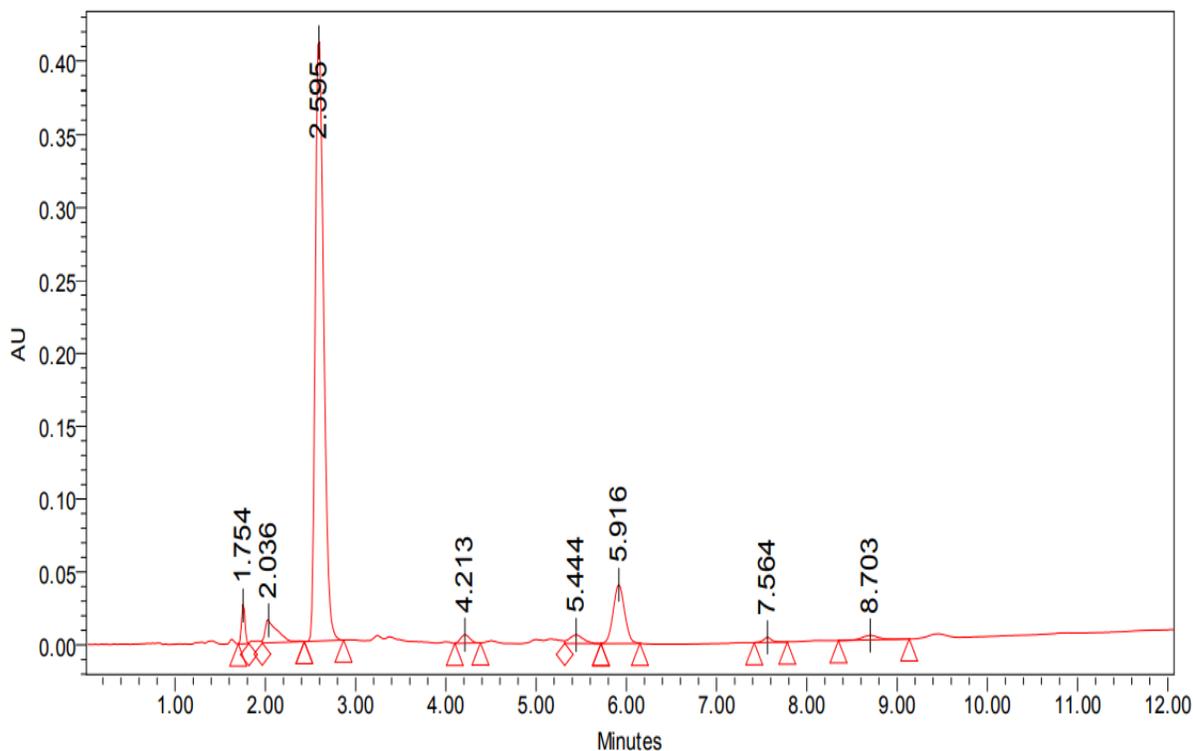


Figura 63. Perfil cromatográfico de la fracción 6 de la tercera purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

Las fracciones 7 a 10 se observaron similares a la 3, presentan variación de la línea base y múltiples picos, el máximo a un t_R de 2.513, 2.515, 2.502 y 2.458 minutos, respectivamente (Figuras 64 a 67).

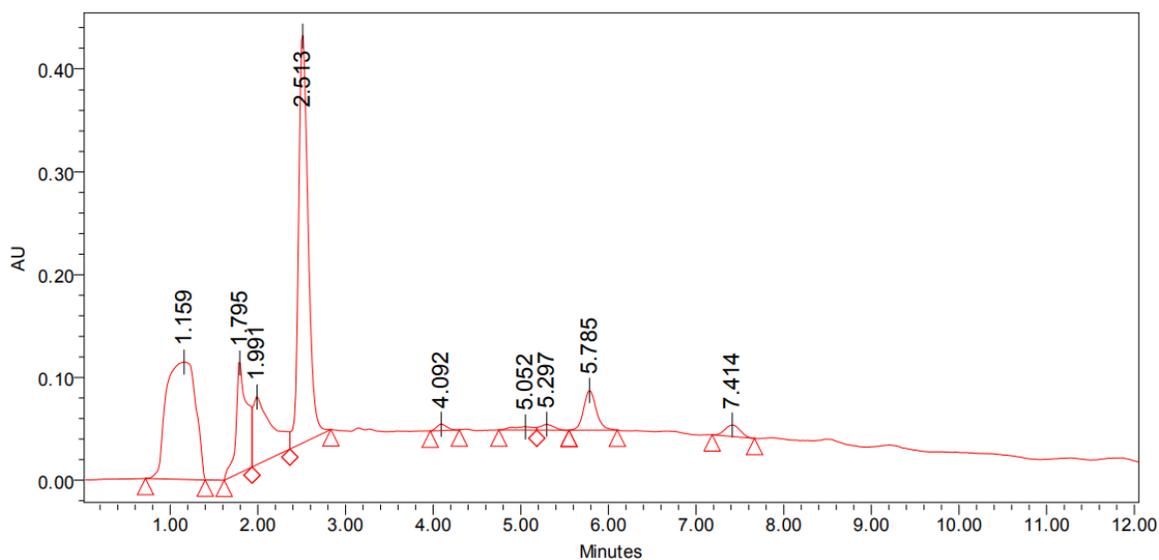


Figura 64. Perfil cromatográfico de la fracción 7 de la tercera purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

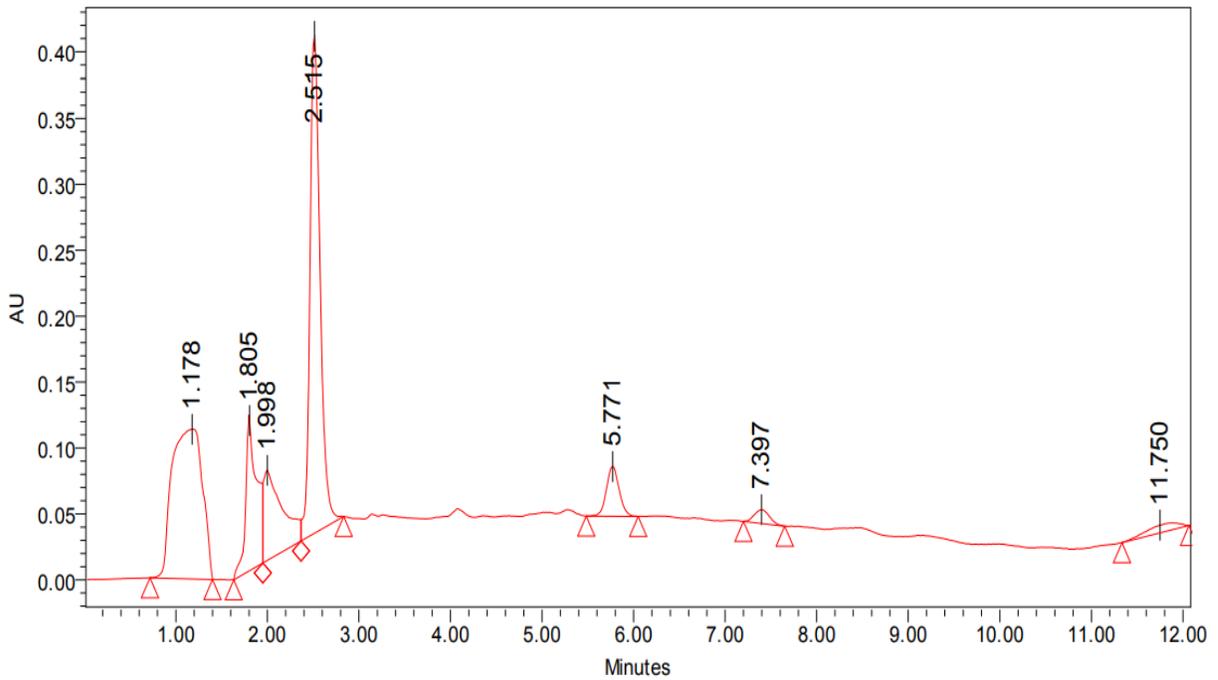


Figura 65. Perfil cromatográfico de la fracción 8 de la tercera purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

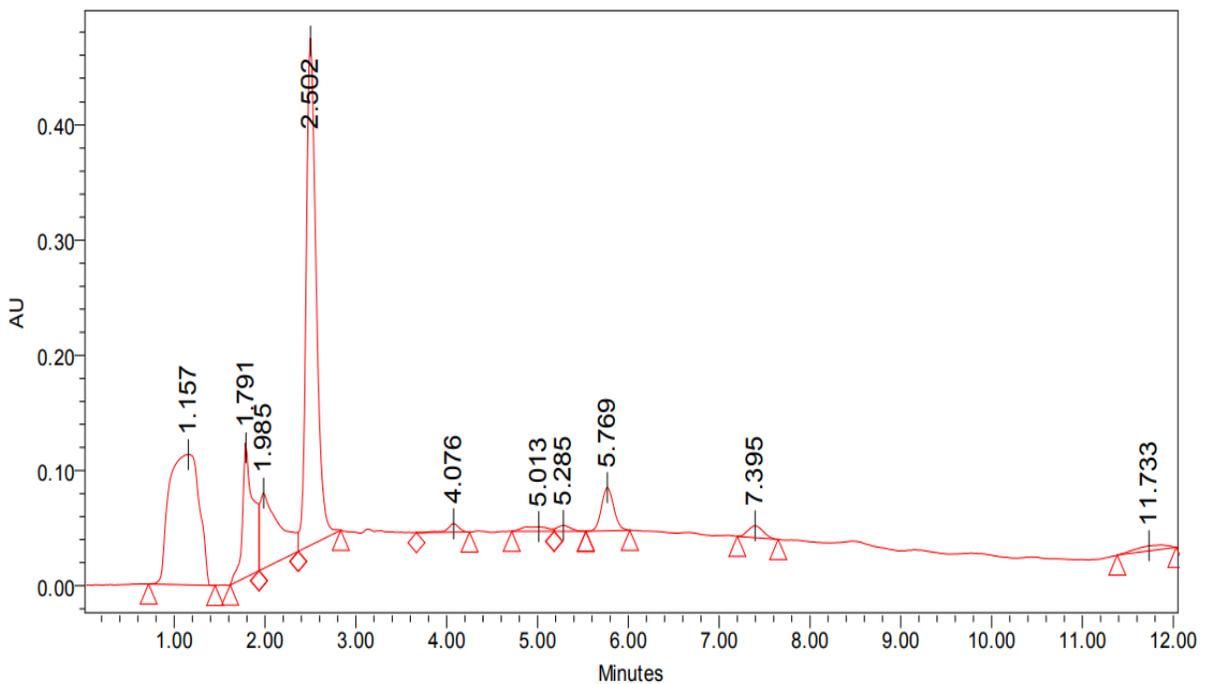


Figura 66. Perfil cromatográfico de la fracción 9 de la tercera purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

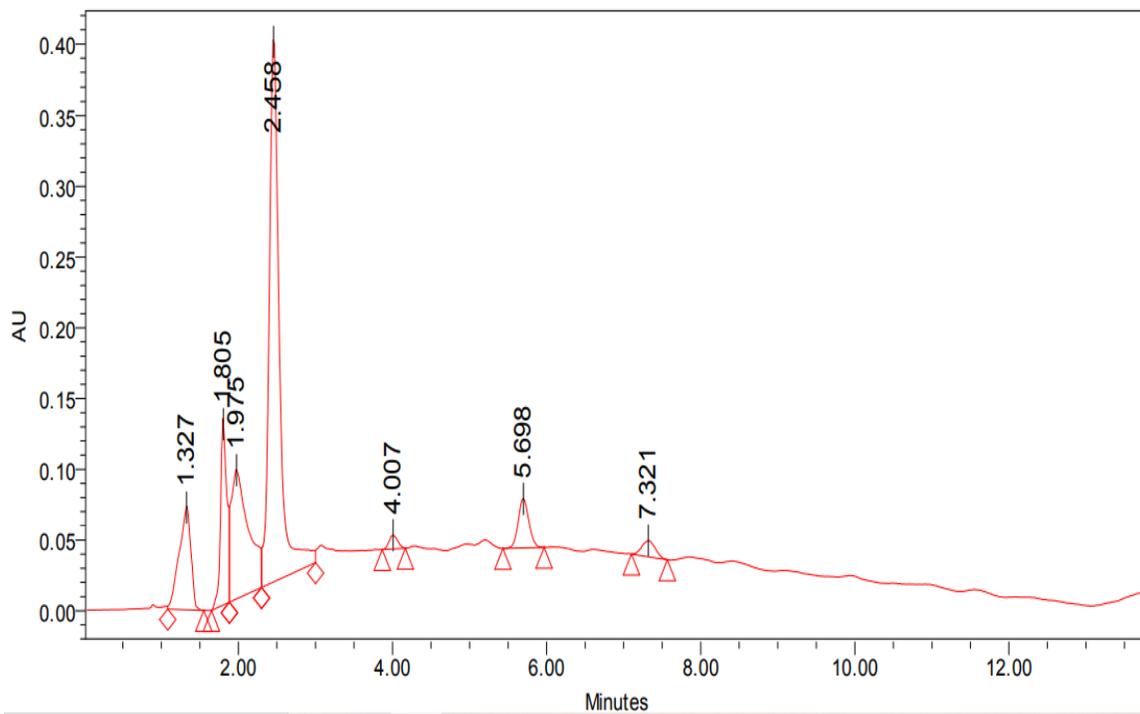


Figura 67. Perfil cromatográfico de la fracción 10 de la tercera purificación, disuelta en 1-butanol/DCM/FM, elución con gradiente A.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1 Determinación de fase móvil y gradiente a utilizar

Para la separación por HPLC de fase reversa de espermidin-colesterol se han usado como fase móvil en diferentes metodologías metanol, isopropanol²⁸ y acetonitrilo¹⁸. Las tres opciones más comunes de disolventes para HPLC de fase reversa son acetonitrilo, metanol y tetrahidrofurano. El orden de sus fuerzas eluotrópicas es metanol<acetonitrilo<tetrahidrofurano. Los tres solventes tienen propiedades distintivamente diferentes en su selectividad, capacidad de aceptación de protones, capacidad de donación de protones e interacciones dipolo-dipolo. El acetonitrilo posee fuerte fuerza eluotrópica, baja viscosidad (0,37 cP) lo que conduce a una mayor eficiencia de la columna y buena transparencia UV (hasta a 190 nm). Por esto último, es el más adecuado para el análisis de alta sensibilidad en longitudes de onda cortas y aporta bajas presiones a la columna; por lo cual se decidió probar una fase móvil que usara acetonitrilo. Una práctica común es el uso de aditivos en ambas disoluciones componentes de la fase móvil, tal como ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% en acetonitrilo cuando se usa TFA al 0.1% en agua como disolvente. El uso de dicho aditivo no afecta la reproducibilidad de la separación o el orden de elución, pero permite la reducción de los cambios en la detección UV debido al gradiente a longitudes de onda bajas.²³

9.1.1 Elución sin gradiente

En la primera corrida cromatográfica de la elución isocrática, se observó la presencia del último pico cromatográfico en un tiempo de retención de 6.293 minutos, por lo que acortar el tiempo de corrida permitiría una mejor visualización

de los picos de interés. En una segunda corrida de 16 minutos todos los picos se observaron traslapados o con una resolución menor a 1.5. Los dos últimos picos, que, de acuerdo con el orden de elución reportado por Bischoff, et al¹⁸, se espera sean de espermidin-colesterol, se muestran con una mayor separación, sin embargo, poseen una resolución de 0.93, lo que indica un grado de separación inadecuado.

9.1.2 Elución con gradiente

La elución con gradiente permite la variación en la fuerza de elución de la fase móvil, por lo que puede ayudar a mejorar la resolución de picos poco resueltos.

Bischoff R, et al¹⁸ reportan la elución de los isómeros de espermidin-colesterol en la elución con el gradiente A en los tiempos de retención de 6.2, 8.2 y 8.6 minutos aproximadamente; por lo que fueron los tiempos de retención a los cuales se esperaba su elución.

La espermidina mostró solubilidad en la fase móvil de la elución isocrática (67% TFA al 0.1% en ACN / 33% TFA al 0.1% en agua), el lípido A se mostró ligeramente soluble, mientras que las muestras de lípido B y de colesterilcloroformiato fueron insolubles en dicha proporción de disolventes; por lo cual se observó una absorbancia mínima en los cromatogramas y no se obtuvieron picos apreciables correspondientes a la composición del lípido B.

Al pH de trabajo la mayoría de las moléculas de espermidina se encuentran con todos sus grupos amino cargados, lo que podría explicar su corto tiempo de elución,

pues al tratarse de una especie cargada, el carácter menos hidrofóbico que la molécula neutra, provoca una menor interacción con la fase estacionaria.

Los picos a los tiempos de retención de 1.3, 1.775 y 2.016 minutos y hasta el coleo del minuto 7, presentes en el cromatograma de la espermidina se observan también en el perfil cromatográfico del lípido A, lo cual podría indicar la presencia de una proporción elevada de espermidina en dicho lípido (Figura 68). La coincidencia entre los picos se evaluó también mediante sus espectros UV, observando que el pico al $t_R=1.3$ minutos en ambos cromatogramas, poseen espectros UV similares (Figura 69). El coleo severo (19.6 de factor de coleo) en el cromatograma de la espermidina, además de la presencia de múltiples picos considerando que se trata de una sustancia pura, indican que el sistema de elución es inadecuado para esta. Los máximos de absorción en los espectros UV de 267.9 y 264.4 nm para la espermidina coincidieron con la $\lambda_{m\acute{a}x}$: 260 nm reportados en la literatura (Figura 69).

La insolubilidad del colesterilcloroformiato impidió la visualización de sus picos y por tanto su identificación en los cromatogramas del lípido A y el lípido B. La insolubilidad del lípido B podría deberse a un menor contenido de espermidina y mayor contenido de colesterilcloroformiato, contrario al lípido A, cuya presencia de espermidina (soluble en FM) podría haber permitido en cierto grado la solubilidad de la muestra.

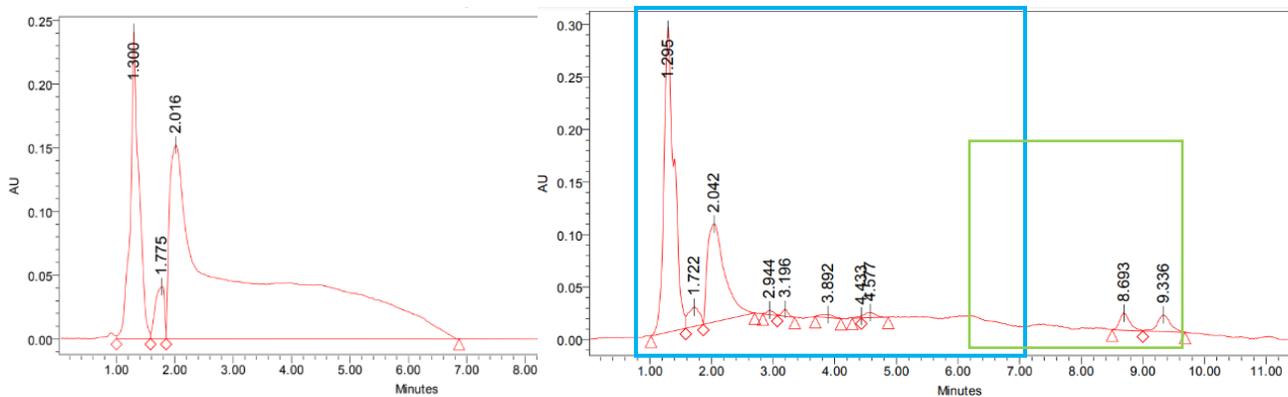


Figura 68. Coincidencias de picos en los cromatogramas de espermidina (izquierda) y lípido A 2017 (derecha), ambos disueltos en FM, en la elución con gradiente, se marca con un cuadro azul el área correspondiente a los picos de espermidina y con un cuadro verde el área de la elución de los isómeros de espermidin-colesterol en el cromatograma del lípido A (2017).

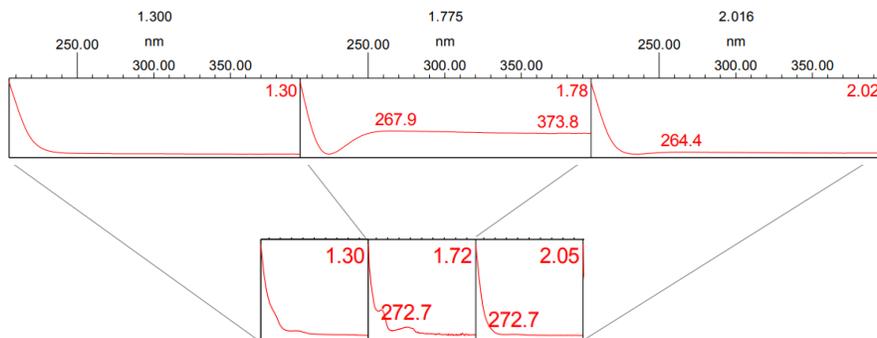


Figura 69. Comparación de los espectros UV y los t_R de los picos de los cromatogramas de espermidina (espectros de arriba) y lípido A 2017 (espectros de abajo), disueltos en FM, en elución con gradiente.

Los picos a los tiempos de retención de 8.693 y 9.336 minutos, presentes en el área de elución esperada para los isómeros, en una proporción de 3.15% para el primer pico y 3.87% el segundo, muestran espectros UV con tres picos máximos de

absorción de valores similares (Figura 70, Tabla 17). Dichos picos poseen una resolución de 2.1, lo que indica que el gradiente A es adecuado para su análisis, observando un buen grado de separación de picos en el área de elución esperada para los isómeros de espermidin-colesterol; sin embargo, debido a la poca solubilidad del lípido A y la insolubilidad del lípido B y el colesterilcloroformiato en la fase móvil fue necesario buscar un disolvente adecuado para solubilizar las muestras y mejorar el análisis cromatográfico.

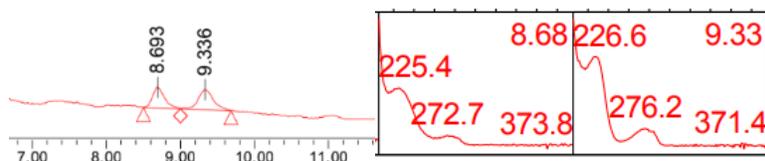
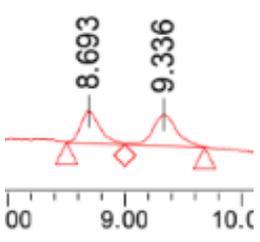
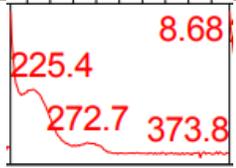
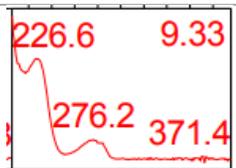


Figura 70. Espectros UV (derecha) de los dos últimos picos del cromatograma del lípido A 2017 (izquierda), eluidos en el área donde se esperaba la elución de los isómeros de espermidin-colesterol, con un t_R de 8.693 y 9.336 minutos, se observan tres máximos de absorción de valores similares.

Tabla 17. Comparación de espectros UV, cálculo de porcentaje y resolución de los picos de espermidin-colesterol presentes en los cromatogramas del lípido A (2017) disuelto en fase móvil, elución con gradiente.

Lípido A 2017	t_R (minutos)	Espectro UV	Porcentajes	Resolución
	8.693		3.15%	2.1
	9.336		3.87%	

9.2 Preparación de la muestra y solubilización de espermidin-colesterol.

La insolubilidad de los lípidos en los disolventes usados en diferentes fuentes bibliográficas pudo deberse a la presencia mayoritaria de las materias primas de síntesis en los lípidos catiónicos, las cuales, al encontrarse en mayor cantidad, podrían haber modificado las propiedades de solubilidad y por ello no coincidir con las reportadas.

9.3 Perfil cromatográfico por HPLC de fase reversa de los lípidos de espermidin-colesterol a las condiciones optimizadas

Ambos disolventes (diclorometano y butanol) usados para la disolución del espermidin-colesterol poseen una fuerza de elución menor que la fase móvil, por lo que se observó poca variación o perturbación de la línea base por el cambio de disolvente para las muestras.

El área de elución de picos de colesterilcloroformiato se traslapó con el área de elución de la espermidina, por lo que su identificación en cada uno de los cromatogramas de los lípidos se vio dificultada. Sin embargo, fue posible al realizar además la comparación de los espectros UV de los picos con tiempos de retención similares. Los picos mayoritarios en los cromatogramas de espermidina y colesterilcloroformiato se encuentran en tiempos de retención muy similares, por lo que ambos picos se superponen. Se observó que la presencia de colesterilcloroformiato desplaza el t_R del pico hacia la derecha, más cercanos a 2.596 minutos, que es el tiempo de retención de su pico mayoritario. Por el contrario, la presencia de espermidina desplaza el pico mayoritario a la izquierda, más cercano al t_R de 2.506, donde se encuentra su pico mayoritario.

La espermidina provocó una variación en la línea base a partir de los dos minutos aproximadamente, lo que previamente se había observado como un coleo; ambos podrían deberse a una interacción secundaria con la fase estacionaria.

El primer pico de espermidina al t_R de 1.26 minutos se observó en los cromatogramas del lípido A 2017 y 2022 (Figura 71), por lo que se confirmó que ambos lípidos contienen espermidina. En el cromatograma del lípido A 2017 se observa la presencia de picos en el área de elución de la espermidina; sin embargo, se muestran con baja resolución. El espectro UV del pico en el cromatograma de colesterilcloroformiato al t_R de 4.48 coincide con el de los picos en los t_R de 4.49 y 4.42 minutos de los cromatogramas de los lípidos A 2017 y 2022 respectivamente (Figuras 72 y 73); los tres espectros muestran máximos de absorción de valores similares, por lo que se confirmó la presencia de colesterilcloroformiato en dichos lípidos.

Los picos en los tiempos de retención de 8.144 y 8.757 minutos en el cromatograma del lípido A (2017) y de 8.049 minutos en el cromatograma del lípido A (2022); no coinciden con picos correspondientes a las materias primas y se encuentran en el área de elución esperada para los isómeros de espermidin-colesterol, como se observa en la Figura 71. En comparación con los t_R de los picos de espermidin-colesterol en el cromatograma inicial de lípido A 2017 disuelto en fase móvil, se observó que el cambio de disolvente de la muestra provocó la elución de los isómeros a menores tiempos de retención. La resolución de los picos es de 1.7, que se considera adecuada.

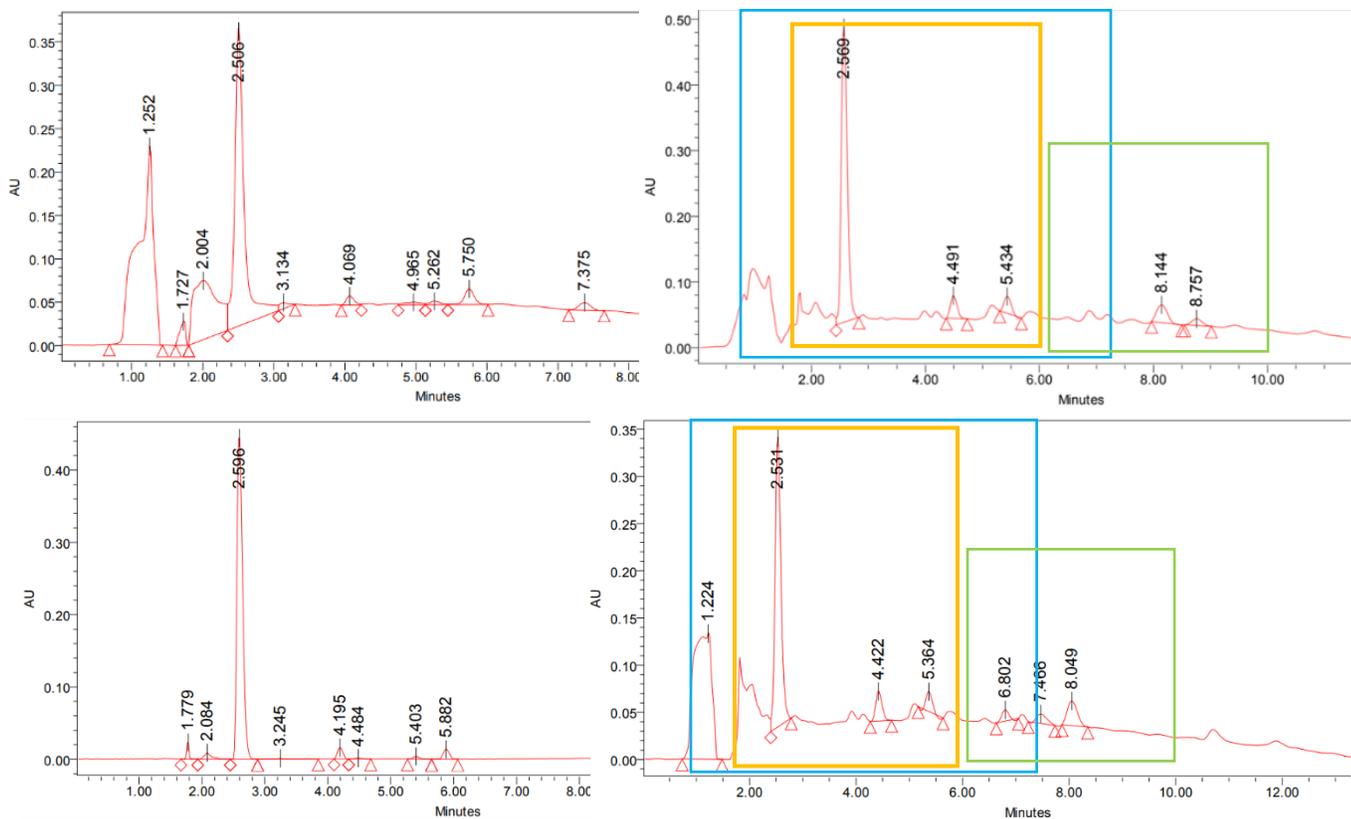


Figura 71. Coincidencias de picos entre los cromatogramas de espermidina (arriba, izquierda) y colesterilcloroformiato (abajo, izquierda) con los del lípido A 2017 (arriba, derecha) y A 2022 (abajo derecha), todos disueltos en butanol/DCM/FM, en elución con gradiente. Se marca con un cuadro azul el área correspondiente a los picos de espermidina, un cuadro naranja el área de colesterilcloroformiato y con un cuadro verde el área de la elución de los isómeros de espermidin-colesterol en los cromatogramas de los lípidos A (2017 y 2022).

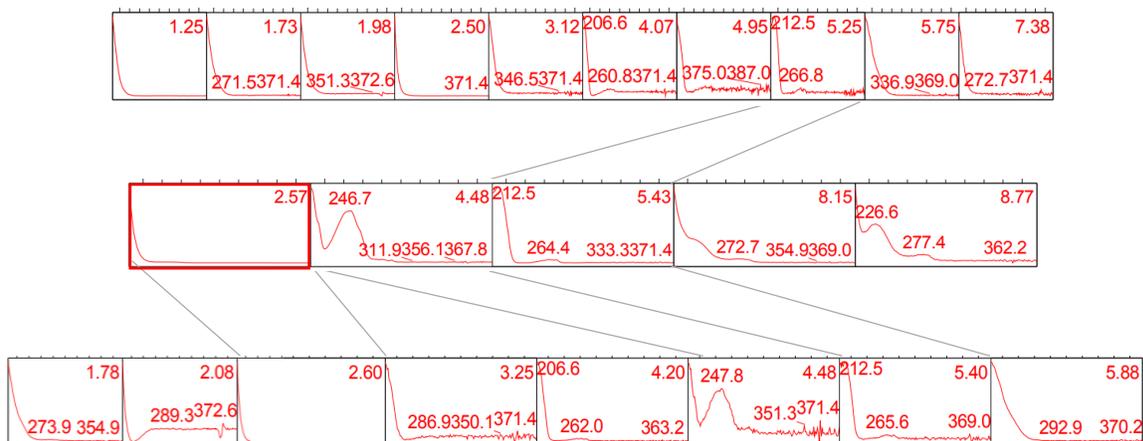


Figura 72. Comparación de los espectros UV y los t_R de los picos de los cromatogramas de espermidina (espectros de arriba), lípido A 2017 (espectros del centro) y colesterylcloroformiato (espectros abajo). Se marcan en un rectángulo rojo los picos mayoritarios del lípido A 2017.

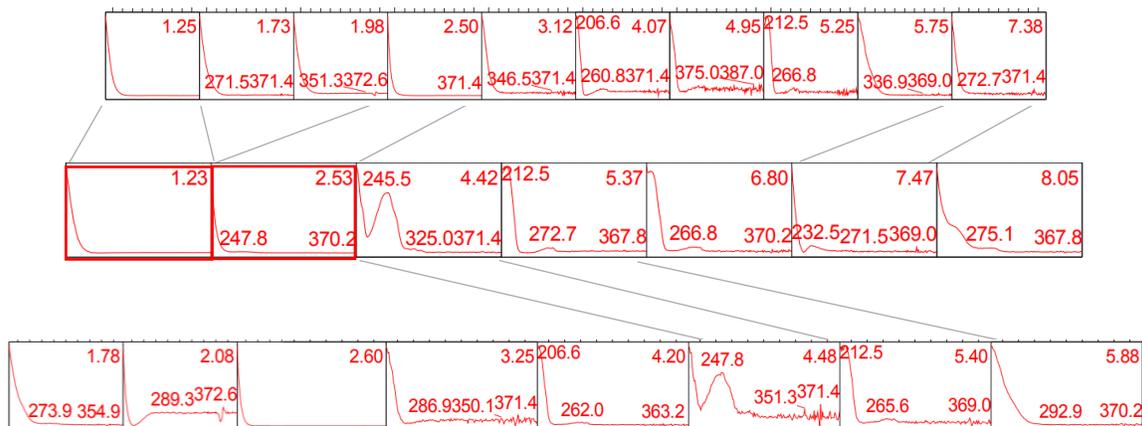


Figura 73. Comparación de los espectros UV y los t_R de los picos de los cromatogramas de espermidina (espectros de arriba), lípido A 2022 (espectros del centro) y colesterylcloroformiato (espectros abajo). Se marcan en un rectángulo rojo los picos mayoritarios.

El cromatograma del lípido B 2017 (Figura 74, arriba, derecha) no muestra variación de la línea base ni los picos iniciales característicos de la espermidina, lo que se atribuyó a la poca presencia de ésta en dicho lípido. Por el contrario, el cromatograma del lípido B 2022 (Figura 74, abajo, derecha) muestra mayor variación en la línea base y el pico inicial a un t_R de 1.15 minutos que coincide con el t_R y el espectro UV del pico inicial de espermidina, lo que indica que hay una mayor proporción de espermidina en dicho lípido. (Figura 75).

El espectro UV del pico en el cromatograma de colesterilcloroformiato al t_R de 4.48 minutos coincide con el de los picos en los t_R de 4.57 y 4.4 minutos de los cromatogramas de los lípidos B 2017 y 2022 respectivamente (Figuras 75 y 76); los tres espectros muestran máximos de absorción de valores similares, por lo que se confirmó la presencia de colesterilcloroformiato en ambos lípidos.

Los picos en el t_R de 8.238 minutos en el cromatograma del lípido B (2017) y de 8.023 minutos en el cromatograma del lípido B (2022); no coinciden con picos correspondientes a las materias primas y se encuentran en el área de elución esperada para los isómeros de espermidin-colesterol, como se observa en la Figura 74.

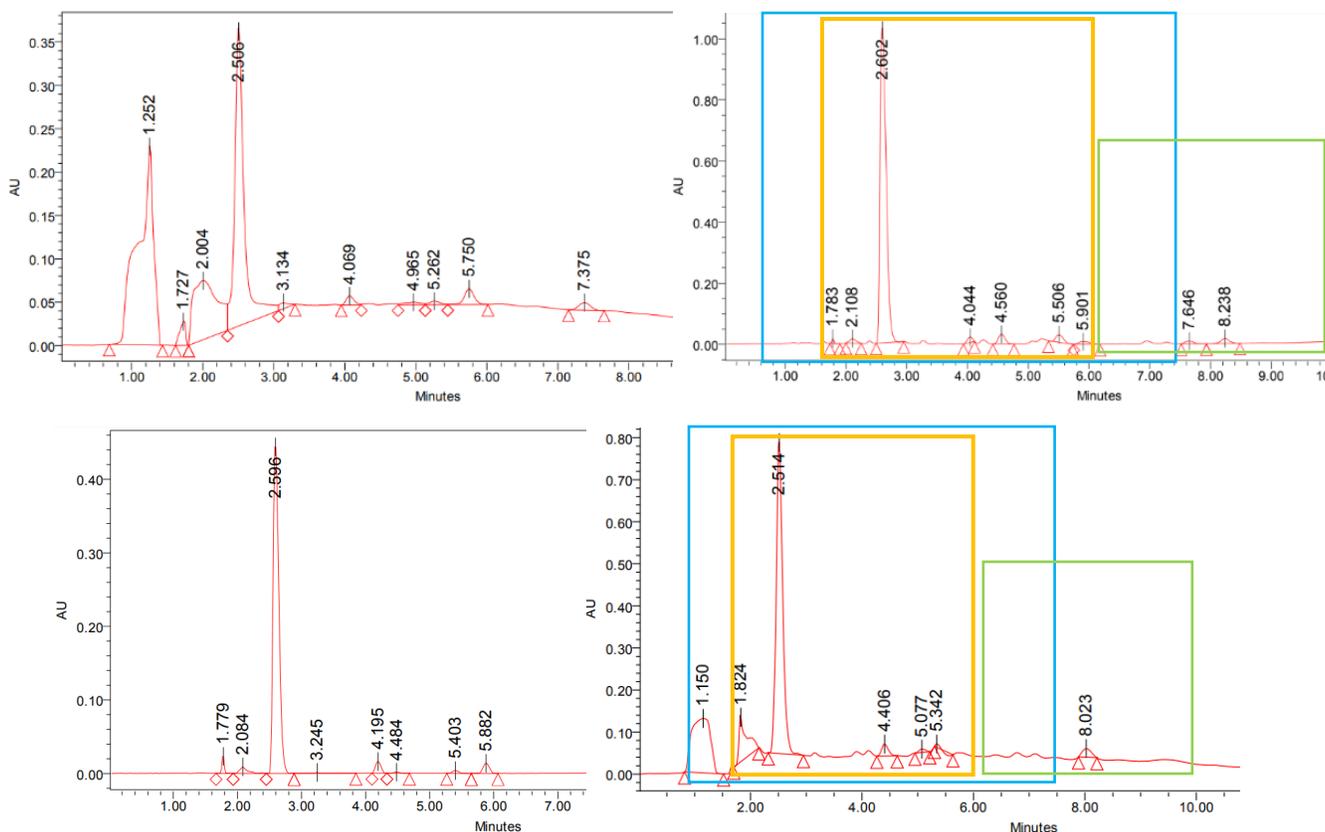
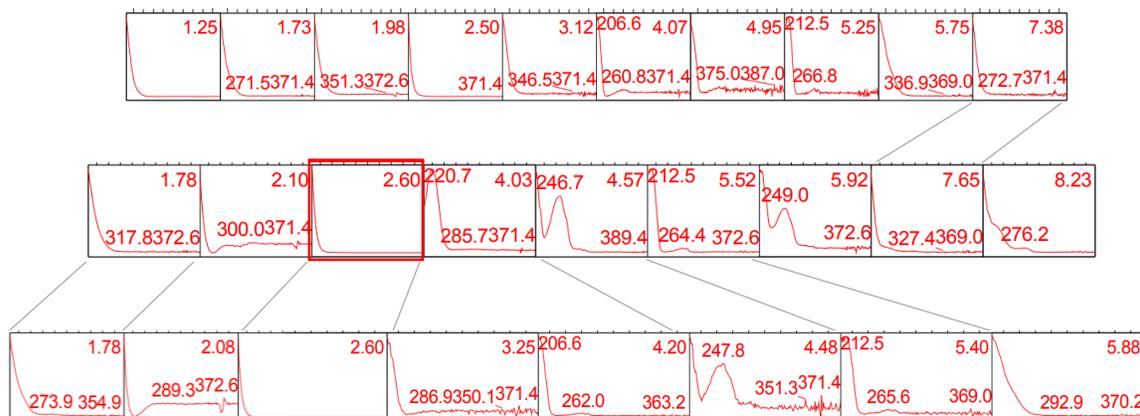


Figura 74. Coincidencias de picos entre los cromatogramas de espermidina (arriba, izquierda) y colesterilcloroformiato (abajo, izquierda) con los del lípido B 2017 (arriba, derecha) y B 2022 (abajo, derecha), todos disueltos en butOH/DCM/FM, en elución con gradiente. Se marca con un cuadro azul el área correspondiente a los picos de espermidina, un cuadro naranja el área de colesterilcloroformiato y con un cuadro verde el área de la elución de los isómeros de espermidin-colesterol en los cromatogramas de los lípidos B (2017 y 2022).



cromatogramas de espermidina (espectros de arriba), lípido B 2017 (espectros del centro) y colesterilcloroformiato (espectros abajo. Se marcan en un rectángulo rojo los picos mayoritarios.

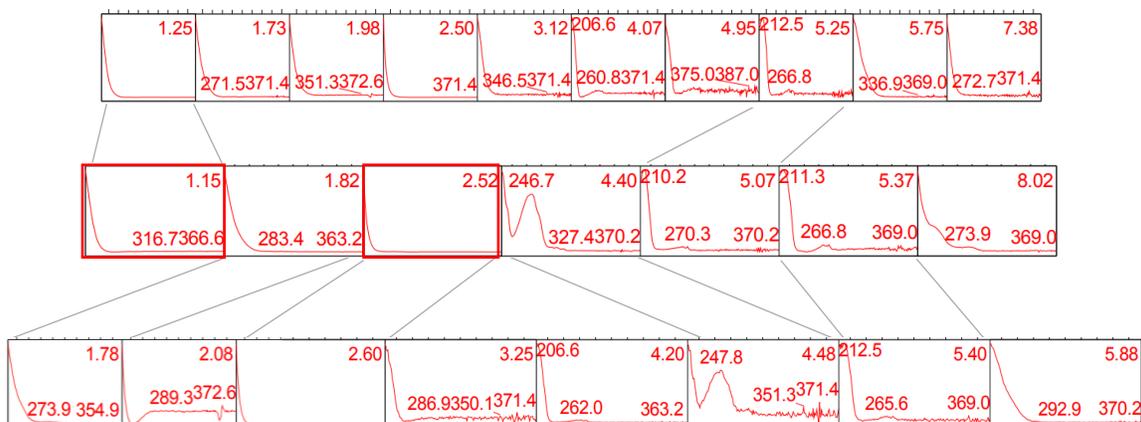


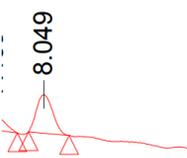
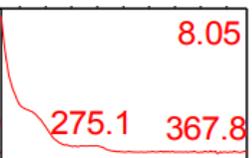
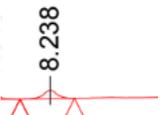
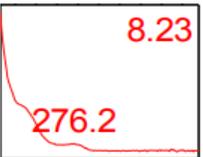
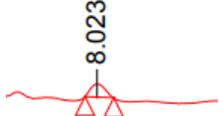
Figura 76. Comparación de los espectros UV y los t_R de los picos de los cromatogramas de espermidina (espectros de arriba), lípido B 2022 (espectros del centro) y colesterilcloroformiato (espectros abajo). Se marcan en un rectángulo rojo los picos mayoritarios.

En el cromatograma del lípido A (2017) se observó la elución de dos picos en el área de elución esperada del espermidin-colesterol, mientras que en los lípidos A (2022), B (2017) y B (2022) únicamente se detectó un pico. Los cromatogramas del lípido B (ambas síntesis, 2017 y 2022) podrían contener un menor porcentaje de espermidin-colesterol en su composición en comparación con el lípido A (ambas síntesis), debido al menor tamaño de sus picos de espermidin-colesterol. (Tabla 18)

Los primeros picos eluidos en el área esperada de los isómeros de espermidin-colesterol, a los tiempos de retención de 8.144 (A 2017), 8.049 (A 2022), 8.238 (B 2017) y 8.023 minutos (B 2022); poseen espectros UV diferentes en comparación al último pico del lípido A 2017, a un tiempo de retención de 8.757 minutos. Los primeros picos muestran espectros UV con dos máximos de absorción de valores similares, con excepción del espectro del pico correspondiente al lípido B 2017, en

el que se muestra sólo un máximo de absorción, esto podría deberse a la baja concentración del isómero, lo que dificulta su detección UV (Tabla 18). El último pico del cromatograma del lípido A (2017) al t_R de 8.757 minutos (Tabla 18), posee tres máximos de absorción de valores similares a los observados en los espectros UV de los dos últimos picos de la muestra de dicho lípido disuelto en fase móvil (Tabla 17).

Tabla 18. Comparación de los espectros UV, cálculo de porcentaje y resolución de los picos de espermidin-colesterol presentes en los cromatogramas de los lípidos disueltos en butOH/DCM/FM.

Lípido	t_R (minutos)	Espectro UV	Porcentajes	Resolución
A 2017 	8.144		3.66	1.7
	8.757		1.23	
A 2022 	8.049		3.72	-
B 2017 	8.238		1.68	-
B 2022 	8.023		2.6	-

9.4 Purificación de espermidin-colesterol por cromatografía en columna de sílica gel

El tamaño pequeño de los picos de los isómeros de espermidin-colesterol y por tanto la baja absorbancia (UA), debido a la baja concentración del lípido, dificulta la visualización de los espectros UV. Se omiten comparaciones y espectros UV de fracciones similares, para evitar redundancias.

Las purificaciones se llevaron a cabo con el lípido A (2017), se esperaba posteriormente llevar a cabo con los demás lípidos una vez halladas las condiciones exitosas.

La primera y segunda purificación llevadas a cabo con el mismo eluyente (DCM:metanol 4:1), muestran diferencias en el orden de elución de los reactivos de síntesis, por lo que no se consideró como una técnica reproducible y no permitió la separación del espermidin-colesterol de los demás componentes de la muestra (Tabla 19 y 20).

Tabla 19. Compuestos presentes en cada una de las fracciones de la 1ª purificación identificados mediante la comparación de los tiempos de retención y espectros UV de sus picos cromatográficos.

Fracción	Espermidina	Colesteril-cloroformiato	Espermidin-colesterol
1		•	
2	•		
3		•	
4		•	
5		•	
6		•	•

La segunda purificación mostró una interacción considerable de la espermidina en la fase estacionaria, ya que se encuentra en 8 de las 13 fracciones recolectadas (Tabla 20).

Tabla 20. Compuestos presentes en cada una de las fracciones de la 2ª purificación identificados mediante la comparación de los tiempos de retención y espectros UV de sus picos cromatográficos.

Fracción	Espermidina	Colesteril-cloroformiato	Espermidin-colesterol
1-4	•	•	• (un pico)
5	•	•	
6	•		• (un pico)
7	•		• (un pico)
8	•		•
9		•	
10	•	•	• (un pico)
11		•	
12	•		
13	•		

De igual manera, la tercera purificación llevada a cabo con DCM:metanol 2:1 como eluyente no permitió la separación del espermidin-colesterol de los demás componentes de la muestra e incluso presentó menor grado de separación y en la mayoría de las fracciones obtenidas se observó la presencia de los reactivos de síntesis. (Tabla 21).

Tabla 21. Compuestos presentes en cada una de las fracciones de la 3ª purificación identificados mediante la comparación de los tiempos de retención y espectros UV de sus picos cromatográficos.

Fracción	Espermidina	Colesteril-cloroformiato	Espermidin-colesterol
1		•	
2	•	•	
3	•	•	
4	•		•
5	•	•	•
6		•	• (un pico)
7	•		
8	•		
9	•		
10	•		

En los espectros UV de la fracción 5 de la tercera purificación (Tabla 22) se muestran los perfiles UV más completos de los últimos dos picos correspondientes a los isómeros, se observan espectros con los tres máximos de absorción característicos de los picos que se encuentran en el área de elución esperada para los isómeros de espermidin-colesterol, observados anteriormente en las muestras no purificadas.

Tabla 22. Comparación de los tiempos de retención y los espectros UV de los picos de espermidin-colesterol en las fracciones obtenidas de las tres purificaciones del lípido A 2017.

	Espectro UV	Tiempos de retención
Fracción 6 1ª purificación		
Fracción 8 2ª purificación		
Fracción 4 3ª purificación		
Fracción 5 3ª purificación		

10. CONCLUSIONES

Las condiciones de la técnica por HPLC de fase reversa a nivel analítico establecidas para el análisis de espermidin-colesterol permitieron la separación de los isómeros y de los demás componentes de los lípidos catiónicos sintetizados en el Laboratorio de Oncología Celular y Cáncer.

Con base en los resultados obtenidos del análisis cromatográfico, la comparación de cromatogramas y espectros UV de las muestras; y su confrontación con los resultados reportados por otros autores¹⁸; se concluye lo siguiente como parte de la composición de los lípidos A y B:

- Fue posible determinar la proporción de espermidin colesterol en cada uno de los lípidos analizados: 4.90% en el lípido A 2017, 3.72% en el A 2022, 1.68% en el B 2017 y 2.60% en el lípido B 2022.
- El lípido A 2017 contiene dos isómeros, mientras que los lípidos A 2022, B 2017 y B 2022 tienen un isómero.
- Los lípidos A 2017, A 2022 y B 2022 contienen espermidina.
- La composición mayoritaria de los lípidos A (2022) y lípido B (2022) es espermidina.
- El lípido B 2017 no contiene espermidina y se compone mayoritariamente de colesterilcloroformiato.

La baja cantidad de espermidin-colesterol obtenido en la síntesis en comparación con la presencia mayoritaria de los reactivos de síntesis dificultó la visualización de picos y espectros UV de los isómeros de dicho compuesto, por lo cual se probaron

dos técnicas de purificación en columna de sílica gel, sin embargo, estas no permitieron una separación adecuada del espermidin-colesterol de los demás componentes de la muestra, lo cual sugiere la aplicación de otras técnicas de purificación.

11. PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados observados, posteriormente se puede buscar la optimización del proceso de síntesis para la obtención de mayores rendimientos de espermidin-colesterol.

Se puede optimizar la técnica para una mejor identificación de las materias primas de síntesis: espermidina y colesterilcloroformiato.

Evaluar en membranas biológicas el lípido B (2022) podría dilucidar la diferencia que provoca la presencia de espermidina en el comportamiento del lípido biológico de este lípido en comparación con su síntesis de 2017.

En un futuro se puede escalar a una separación por HPLC de fase reversa a escala preparativa, con lo cual se podría realizar análisis estructural de cada uno de los isómeros de espermidin-colesterol obtenidos en la síntesis del lípido.

12. REFERENCIAS

1. National Academies Of Sciences, Engineering, And Medicine, et al. Innovations in Pharmaceutical Manufacturing on the Horizon: Technical Challenges, Regulatory Issues, and Recommendations. Whashington, DC: The National Academies Press [Internet]; 2021 [Citado 05 Ene 2022]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570308/pdf/Bookshelf_NBK570308.pdf
2. Kumar A, Chen F, Mozhi A, Zhang X, Zhao Y, Xue X, Hao Y, Zhang X, Wang PC, Liang XJ. Innovative pharmaceutical development based on unique properties of nanoscale delivery formulation. Nanoscale [Internet]. 2013; 5(18): 8307-8325 [Citado 05 Ene 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3934102/>
3. Allen T, Cullis P. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. Advanced drug delivery reviews [Internet]. 2013; 65(1): p. 36-48 [Citado 05 Ene 2022]. Disponible en: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1054248/mod_resource/content/0/Liposome%20Review-2012.pdf
4. Bangham AD, Horne RW. Tinción negativa de fosfolípidos y su modificación estructural por agentes tensioactivos como se observa en el microscopio electrónico. J. Mol. Biol [Internet]. 1964; 8 :660–668 [Citado 25 Ene 2022]. Disponible en:
5. Liu P, Chen G, Zhang J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. Molecules [Internet]. 2022; 27(4):1372 [Citado 05 Ene 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8879473/pdf/molecules-27-01372.pdf>
6. Sercombe L, et al. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. Frontiers in pharmacology [Internet]. 2015; 6(1): p. 286 [Citado 05

- Ene 2022]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2015.00286/full>
7. Tortora G, Derrickson B. Principios de Anatomía y Fisiología. 11ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2006.
 8. Zhao H y Lappalainen P. A simple guide to biochemical approaches for analyzing protein–lipid interactions. *Molecular biology of the cell* [Internet]. 2012 [Citado 12 Ene 2022]; 23(15): pp 2823-2830. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/230589683_A_simple_guide_to_biochemical_approaches_for_analyzing_protein-lipid_interactions
 9. Delves P. Liposomas. Enciclopedia de inmunología. Departamento de Inmunología, Univ Coll London Medical School, Londres. [Internet] 1998 [citado 12 de Ene de 2022]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122267656004205>
 10. Navarro G, et al. Diseño de liposomas para el transporte de diclofenac sódico. *Rev. colomb. cienc. quim. farm.* [Internet]. 2008 [citado 12 de Ene de 2022]; 37(2): pp.212-223. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74182008000200009&lng=en
 11. Carvalho E, de la Fuente M, Seijo B. El potencial de los liposomas como formas de administración ocular de fármacos. *Arch Soc Esp Oftalmol* [Internet]. 2004, [citado 12 de Ene de 2022]: 79(4): pp.151-152. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-66912004000400002
 12. Khan S, Hossain M. Classification and Properties of Nanoparticles. *Nanoparticle-Based Polymer Composite* [Internet]. 2022, [citado 12 de Ene 2022]: p44. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/355978333_Classification_and_Properties_of_Nanoparticles
 13. Torelló M, et al. Liposomas (I) Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas. *OFFARM* [Internet]. 2002, 21(9) [citado 12 de Ene de

- 2022]; pp.188-190. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-liposomas-i-conceptos-generales-relacion-13038745>
14. Petukhov I, et al. Synthesis of polycationic lipids based on cholesterol and spermine. Russ.Chem.Bull [Internet]. 2010 [citado 17 Ene de 2022]; 59(1): p. 260-266. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/226459960_Synthesis_of_polycationic_lipids_based_on_cholesterol_and_spermine
 15. Guasco C, et al. Poliaminas: pequeños gigantes de la regulación metabólica. Rev. educ. bioquím [Internet]. 2014 [citado 17 Ene 2022]; 33(2): p. 51-57. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952014000200004&lng=es
 16. Markov O, et al. Novel cationic liposomes provide highly efficient delivery of DNA and RNA into dendritic cell progenitors and their immature offsets. Jour. of Controlled Release [Internet]. 2012 [citado 17 Ene 2022]; 160(2): p. 200-210. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365911010881?via%3Dihub>
 17. Guy-Caffey J, et al. Novel Polyaminolipids Enhance the Cellular Uptake of Oligonucleotides. Journ. of Biol. Chem. [Internet]. 1995 [citado 19 Ene 2022]; 270(52): p. 31391- 31396. Disponible en: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(17\)35406-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(17)35406-6/pdf)
 18. Bischoff R, et al. Transfection of Myoblasts in Primary Culture with Isomeric Cationic Cholesterol Derivatives. Analytical biochemistry [Internet]. 1997 [Citado 19 Ene 2022]; 254(1): pp 69-81. Disponible en: <https://www-sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S0003269797924015?via%3Dihub>
 19. Bulugahapitiya V. Isomerism in Organic Chemistry. Univ of Ruh [Internet]. 2020 [Citado 23 de Ene 2022]. Disponible en:

<https://www.researchgate.net/publication/349034908> Isomerism in Organic Chemistry

20. Malviya R, et al. High-performance liquid chromatography: a short review. Journal of global pharma technology [Internet]. 2010 [Citado 23 Ene 2022]; 2(5): pp 22-26. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/235987484> High performance liquid chromatography A short review
21. Alzuhairi M. (2013). Introduction to High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Training course in Germany [Internet]. 2013 [Citado 23 Ene 2022]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/303812584> INTRODUCTION to High Performance Liquid Chromatography HPLC
22. Dorantes J. Calificación de instalación y operación de un sistema CLAR con detector de dispositivo de diodos [Tesis Licenciatura]. México, D.F.: UNAM, FES Zaragoza; 2011.
23. Parmar A. Latest development in HPLC. Research Gate publication [Internet]. 2021 [Citado 23 de Ene 2022]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/350153825> Latest Development in HPLC
24. Hernández A. Validación de un método cromatográfico para el análisis de paracetamol, cafeína y AAS en medicamentos comerciales. Bachelor's thesis, Benem Univ Autón Puebla [Internet]. 2015 [Citado 23 Ene 2022]. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/bitstream/handle/20.500.12371/6126/230815T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
25. Liu Q, et al. (2017). Simultaneous determination of aminoglycoside antibiotics in feeds using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. Rsc Advances [Internet]. 2017 [Citado 25 Ene de 2022]; 7(3): pp 1251-1259. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/ra/c6ra26581b>

26. Dong M. HPLC and UHPLC for practicing scientists. 2^a ed. New York: John Wiley & Sons; 2019: pp 15-44.
27. Moldoveanu S y David V. Essentials in Modern HPLC Separations. Massachusetts: Elsevier; 2013: pp 53-83.
28. Lee E, et al. Cationic amphiphiles containing spermine or spermidine cationic group for intracellular delivery of therapeutic molecules. U.S. Patent No 5,783,565. 1998.
29. Colletti S, Stanton M. Novel low molecular weight cationic lipids for oligonucleotide delivery. EP Patent No. 2 629 802 B1. 2019.