



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**Desarrollo de Métodos para la Determinación de Poliaminas
por Electroforesis Capilar utilizando la Detección UV y la
Fluorescencia Inducida por Láser**

INFORME DE TRABAJO
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. EDGAR MUÑOZ RAMÍREZ



TUTOR: Dra. Ma Gabriela Vargas Martínez AÑO: 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

A la Dra. Ma. Gabriela Vargas Martínez del Laboratorio L-401, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por el apoyo y dedicación prestadas durante la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Andrea Trejo Márquez del Laboratorio de Postcosecha de Productos Vegetales, CAT, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por las facilidades prestadas durante la elaboración de este proyecto.

Al Consejo nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca con numero de registro 173252, otorgada por el periodo Septiembre/2002 a Agosto/2004.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por la beca-tesis para posgrado en la modalidad de maestría, otorgada por el periodo Diciembre/2005 a Mayo/2006.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos L-401 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, campo 1, UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Ma. Gabriela Vargas Martínez y fue presentado en los siguientes congresos:

XVIII CONGRESO MEXICANO DE QUIMICA ANALITICA. Pachuca, Hgo. Del 30 de junio al 02 de Julio de 2004. “Determinación de poliaminas por cromatografía capilar micelar electrocinética previa derivatización”. Modalidad, Presentación: Cartel.

XXXIX CONGRESO MEXICANO DE QUIMICA. Mérida, Yucatán. Del 03 al 07 de Octubre de 2004. “Determinación de poliaminas por cromatografía Capilar micelar electrocinética previa derivatización”. Modalidad, Cartel.”

XIX CONGRESO NACIONAL DE QUIMICA ANALITICA. Guadalajara, Jalisco. Del 11 al 13 de Octubre de 2005. “Determinación de poliaminas en muestras de mango y plasma por cromatografía capilar micelar electrocinética con detección por Fluorescencia Inducida por Láser”. Modalidad, Presentación: Cartel.

INDICE GENERAL

Índice General	I
Índice de Figuras	IV
Índice de Tablas	VI
Abreviaturas	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO GENERAL	3
2.1. Objetivos Particulares	3
3. PRINCIPIOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR	4
3.1. Principios de la separación	4
3.1.1. Movilidad Electroforética	4
3.1.2. Flujo Electroosmótico	4
3.1.3. Movilidad Aparente y Tiempo de Migración	5
3.2. Clasificación de los Modos de Separación	6
3.2.1. Electroforesis Capilar de Zona	6
3.2.2. Cromatografía Capilar Electrocínética Micelar	7
3.3. Instrumentación	8
3.4. Modos de Detección	8
4. POLIAMINAS	9
4.1. Poliaminas y los alimentos	9
4.2. Importancia económica del Mango	10
4.3. Poliaminas y Cáncer	10
5. DERIVATIZACIÓN	11
5.1. Detección Indirecta	11
5.2. Derivatización	11

6. PARTE EXPERIMENTAL	12
6.1. Reactivos	12
6.2. Equipo	12
6.3. Derivatización con Cloruro de Benzoilo y Detección Por UV	12
6.3.1. Fundamento de la reacción de derivatización	12
6.3.2. Metodología de la reacción de derivatización	12
6.4. Derivatización con FITC y detección por LIF	13
6.4.1. Fundamento de la reacción de derivatización	13
6.4.2. Preparación de las muestras	13
6.4.2.1. Mangos	13
6.4.2.2. Plasma	13
6.4.3. Preparación de estándares	13
7. RESULTADOS Y DISCUSION	14
7.1. Derivatización con Cloruro de Benzoilo y Detección Por UV	14
7.1.1. Desarrollo y optimización del método	14
7.1.2. Influencia del pH en la separación	14
7.1.3. Efecto del modificador orgánico	15
7.1.4. Condiciones óptimas de la separación	16
7.2. Derivatización con FITC y detección por LIF	16
7.2.1. Optimización del método	16
7.2.2. Efecto de disolventes en el buffer de separación	16
7.2.3. Efecto del pH del buffer de separación	16
7.2.4. Efecto de la concentración de SDS	17
7.2.5. Derivatización	17
7.2.6. Condiciones de la derivatización	18
7.2.7. Cinética de la reacción	19
7.2.8. Condiciones óptimas de la derivatización.	19
7.3. Límites de detección	19
7.4. Aplicación a muestras reales	20
7.4.1. Condiciones óptimas de la separación	21

8. CONCLUSIONES	23
9. PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS	24
10. BIBLIOGRAFIA	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Teoría de la doble capa y potencial zeta	5
2	Flujo Electroósmotico y movimiento de los iones.	5
3	Migración aparente de cationes, aniones y moléculas neutras.	6
4	Electroforesis Capilar de Zona	6
5	Cromatografía capilar electrocinética micelar	7
6	Equipo de Electroforesis Capilar	8
7	Estructura de las poliaminas	9
8	Reacción de derivatización de una amina con Cloruro de Benzoilo.	12
9	Reacción de derivatización de una amina primaria con FITC	13
10	Mezcla de estándares de poliaminas benzoilatadas y el blanco. Buffer de boratos 20 mM, SDS 10 mM a pH 8.5, 25 kV. 1= Put, 2= Spd y 3= Spm	14
11	Mezcla de estándares de poliaminas benzoilatadas. Buffer de boratos 20 mM, SDS 10 mM, pH 8.5, Etanol al 8%, 25 kV. 1= Put, 2= Spd y 3= Spm	14
12	Influencia del pH en la separación. Boratos 20 mM, SDS 10 mM, etanol al 8%, 25 kV. 1=Put, 2=Spd y 3=Spm	14
13	Variación de la cantidad de Etanol. Boratos 20 mM, SDS 10 mM, pH 9.0. a) 3% de Etanol, b) 5% de Etanol y c) 8% de Etanol. 1=Put, 2=Spd y 3=Spm, 25 kV.	14
14	Estándares de poliaminas benzoilatadas (20 ppm). Boratos 20 mM, SDS 10 mM, pH 9.0 y 5% de Etanol, 30 kV y 25°C. 1=Put, 2=Spd y 3=Spm	15
15	Mezcla de estándares de poliaminas benzoilatadas (20 ppm) sin la presencia de etanol. Buffer de boratos 20 mM, SDS 10 mM y pH 9.0, 30 kV y 25°C. 1=Put, 2=Spd y 3=Spm	15
16	Efecto de la concentración de SDS en la separación. Boratos 20 mM pH 8.5, 25 kV. [put]= 1.24×10^{-5} M, [spd]= 7.85×10^{-6} M, [spm]= 5.74×10^{-6} M, [FITC]= 1.89×10^{-6} M.	16

...CONTINUACIÓN DE FIGURAS

17	Efecto de la adición de solventes (metanol y acetonitrilo al 10% v7v). Boratos 20 mM pH 8.5, 25 kV, SDS 100 mM. [put]= 1.24×10^{-5} M, [spd]= 7.85×10^{-6} M, [spm]= 5.74×10^{-6} M, [FITC]= 1.89×10^{-6} M.	16
18	Influencia del pH en la separación. Boratos 20 mM, SDS 100 mM, 30 kV. [put]= 6.2×10^{-6} M, [spd]= 3.92×10^{-6} M, [spm]= 2.87×10^{-6} M, FITC= 9.49×10^{-4} M	17
19	Variación de la concentración de SDS. Boratos 20 mM, pH 9.5, 30 kV, [put] = 1×10^{-6} M, [spd] = 1.96×10^{-6} M, [spm] = 1.43×10^{-6} M, [FITC]= 4.725×10^{-7} M	17
20	Electroferograma de estándares de poliaminas derivatizadas. Boratos 20 mM, pH 9.5, SDS 50 mM, 30 kV. [put]= [spd]= [spm]= 5×10^{-7} M, [FITC] = 1.2×10^{-6} M.	18
21	Variación de la cantidad de FITC. Buffer de boratos 20 mM, pH 9.5, SDS 50 mM. 30 kV.	18
22	Efecto del tiempo de reacción sobre la formación de los derivados. Boratos 20 mM, pH 9.5, SDS 50 mM. 30 kV.	
24	Electroferograma de pulpa de mango y estándar. Boratos 20 mM, pH 9.5, SDS 50 mM, 30 kV, 25 °C.	20
25	Electroferograma de pulpa de mango. Boratos 20 mM, pH 9.5, SDS 70 mM, 30 kV, 25 °C.	20
26	Condiciones óptimas de separación. Boratos 20 mM, pH 9.5, SDS 70 mM, β -CD 5 mM, 30 kV, 25 °C. [Cada poliamina]= 3×10^{-7} M	21
27	Electroferograma de poliaminas derivatizadas en pulpa de mango. Condiciones de la separación iguales a la de la Figura 26.	21

... CONTINUACION DE FIGURAS

- 28 Electroferograma de poliaminas derivatizadas en piel de mango. Condiciones de separación iguales a las de la figura 26. 22
- 29 Electroferograma de poliaminas derivatizadas en plasma de una persona sana. Condiciones de la separación iguales a las de la figura 26. 22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
I	pKa's de los grupos aminos primarios y secundarios de las poliaminas	9
II	Limites de detección de las poliaminas	20

ABREVIATURAS

<i>Put</i>	Putrescina
<i>Spd</i>	Espermidina
<i>Spm</i>	Espermina
<i>DNA</i>	Ácido desoxiribonucleico
<i>RNA</i>	Ácido ribonucleico
<i>EC</i>	Electroforesis Capilar
<i>EOF</i>	Flujo electroosmótico
<i>v</i>	Velocidad del analito
μ	Movilidad electroforética
<i>E</i>	Campo eléctrico aplicado
<i>q</i>	Carga del analito ionizado
η	Viscosidad del buffer
<i>r</i>	Radio del analito
HPLC o CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
μ_e	Movilidad efectiva del analito
μ_{EOF}	Movilidad debida al EOF
ECZ	Electroforesis Capilar de Zona
CCEM	Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar
CMC	Concentración micelar critica
SDS	Dodecilsulfato de sodio
UV-Vis	Ultravioleta visible
LIF	Fluorescencia Inducida por Láser
nm	Nanómetros
ODC	Ornitina descarboxilasa
β-CD	Beta ciclodextrina
CHES	(ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfónico)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína isomero I
NaOH	Hidroxido de sodio
Psi	Unidades de presión
kV	Kilovolts
rpm	Revoluciones por minuto
M	Concentración Molar
N	Concentración Normal
mM	Concentración Milimolar
LD	Límite de detección
Ppm	Partes por millón
Ppb	Partes por billón

1. INTRODUCCIÓN

Las poliaminas o aminas biogénicas son bases orgánicas de bajo peso molecular y de naturaleza policatiónica, son componentes celulares importantes que regulan diversas funciones biológicas y se encuentran por naturaleza en diversos sistemas biológicos. Putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm), son las poliaminas celulares en mayor cantidad en el cuerpo humano y las más importantes [1-3]. Se ha descrito su importancia en muchos procesos biológicos y debido a su carga neta positiva a pH fisiológico se unen a macromoléculas cargadas negativamente como fosfolípidos, proteínas, DNA y RNA. Las poliaminas alteran la expresión genética y la actividad de ciertas enzimas, varían la fluidez y la permeabilidad de las membranas biológicas, tienen capacidad antioxidante y estabilizadora de las membranas e influyen en los procesos de división celular [3]. En plantas, las poliaminas están involucradas en procesos fisiológicos como la floración, desarrollo del fruto, formación de raíces, son reguladores del crecimiento, del desarrollo de órganos y la maduración de los frutos; han sido asociadas con los mecanismos de resistencia al estrés y la modulación de la senescencia o envejecimiento de los frutos [4]. Se reconoce que muchas poliaminas son esenciales para los sistemas vivientes, sin embargo, en ciertos niveles que han sido estimados promueven efectos adversos sobre la salud humana como náuseas, migraña o asma. Entre los papeles biológicos de las poliaminas, la participación en el crecimiento celular y proliferación han sido de extraordinario interés, ya que pueden estar involucradas en el desarrollo de tumores [5]. El incremento significativo en los niveles de poliaminas en pacientes con cáncer ha sido reportado, las poliaminas se consideran carcinogénicas por su capacidad para reaccionar con nitritos y producir nitrosaminas potencialmente carcinogénicas [6].

Por lo tanto, el estudio de las poliaminas es de interés no solo por su riesgo toxicológico, sino también por su utilidad como indicadores de la calidad de los alimentos y por el potencial vínculo entre los niveles de poliaminas con ciertos tipos de cáncer, pues podrían utilizarse como posibles marcadores de malignidad y eficiencia de tratamientos terapéuticos en pacientes con cáncer, todo esto ha fomentado el interés en el desarrollo de técnicas analíticas sensibles capaces de detectar y cuantificar poliaminas en diferentes matrices biológicas. Una variedad de métodos han sido empleados para la determinación de poliaminas tanto cualitativa como cuantitativamente, como la Cromatografía de Gases [7-9], Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR o HPLC) [10-15] y Electroforesis Capilar [1, 16-23]. De todos estos métodos el de cromatografía de líquidos ha sido el más utilizado para el análisis de estos compuestos. La Electroforesis Capilar (EC) puede ser de gran utilidad, ya que es una técnica muy versátil y se obtienen resoluciones similares a cualquier otra técnica cromatográfica. Algunas de las ventajas de esta técnica son: se requiere de pequeñas cantidades de muestra y de reactivos, su alta resolución, alta eficiencia, se puede automatizar y puede ser aplicada a diferentes matrices biológicas [1].

El presente trabajo tiene como finalidad desarrollar métodos analíticos por EC para establecer las condiciones adecuadas para el análisis cuantitativo y cualitativo de las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina mostrando su aplicación en muestras reales como lo son: mangos y plasma. En plasma por la relación que existe entre las poliaminas y diferentes tipos de cáncer. En mangos por la relación que tienen con los *daños por frío*, un problema que presentan los frutos tropicales al ser almacenados a bajas temperaturas durante su vida postcosecha y que afectan su vida de anaquel. Los tratamientos térmicos han mostrado su utilidad en el control de enfermedades de

postcosecha y en la reducción de los daños por frío en productos tropicales. Algunos de los mecanismos por los cuales estos tratamientos proporcionan protección contra los desórdenes de postcosecha comprenden el cambio en la composición de lípidos de la membrana [24], la inactivación de ciertos sistemas enzimáticos y la síntesis de metabolitos como las *poliaminas* que pueden ayudar a estabilizar y proteger a la membrana [25].

2. OBJETIVO GENERAL:

- Desarrollar metodologías analíticas por Electroforesis Capilar, para el análisis cualitativo y cuantitativo de las poliaminas: Putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm), con detección por UV y por Fluorescencia Inducida por Láser (LIF) utilizando reacciones de derivatización, para obtener mejor sensibilidad en su detección en diferentes matrices biológicas.

2.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar un método analítico por Electroforesis Capilar, mediante una reacción de derivatización con cloruro de benzoilo y establecer las condiciones adecuadas para el análisis cuantitativo y cualitativo de las poliaminas, utilizando detección UV.
- Desarrollar un método analítico por Electroforesis Capilar, mediante una reacción de derivatización con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) y establecer las condiciones adecuadas para el análisis cuantitativo y cualitativo de las poliaminas, utilizando detección con Fluorescencia Inducida por Láser
- Estudiar los factores que influyen en la separación de las poliaminas derivatizadas.
- Optimizar los procedimientos de derivatización de las poliaminas para su detección por UV y por fluorescencia inducida por láser.
- Establecer las condiciones óptimas para el análisis de estos compuestos en muestras reales (mango y plasma).
- Establecer en base a la comparación de los límites de detección de cada compuesto en cada uno de los métodos desarrollados, cual de ellos es la mejor alternativa en el análisis de las poliaminas.

3.- PRINCIPIOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR

Desde principios de los años 50's, los científicos han hecho grandes esfuerzos para desarrollar nuevas metodologías analíticas para la detección de sustancias químicas, para entender mejor y elucidar los roles que cada una de las sustancias juegan en los sistemas biológicos. Muchos químicos han concentrado sus energías sobre el desarrollo de técnicas analíticas que sean altamente sensibles y altamente específicas. Entre los diversos procedimientos modernos para este tipo de análisis, el que utiliza electromigración dentro de un capilar de sílice fundida es la denominada "Electroforesis Capilar" (EC), la cual satisface los requerimientos de alta sensibilidad y alta especificidad y ha demostrado por si misma ser una técnica de separación útil para el análisis de una amplia variedad de sustancias [26]. Las ventajas de la EC son: alta resolución, alta eficiencia, tiempos de análisis cortos, pequeñas cantidades de muestra y bajo costo [27].

3.1.- PRINCIPIOS DE LA SEPARACIÓN

3.1.1 MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

Bajo la influencia de un campo eléctrico, cuando ningún flujo electroosmótico esta presente, un analito cargado eléctricamente migrará a través de un buffer con una velocidad dado por la ecuación (1):

$$v = \mu E \quad (1)$$

De la ecuación (1) se aprecia que la velocidad del analito (v) es directamente proporcional a la movilidad electroforética (μ) y a el campo eléctrico aplicado (E). La movilidad electroforética¹ (μ) esta dada por la ecuación (2) [28].

$$\mu = q/6 \pi \eta r \quad (2)$$

De la ecuación (2), puede observarse que la movilidad electroforética de un analito depende de su carga (q), tamaño (r) y de la viscosidad del buffer de separación (η), pero, también esta influenciada por la fracción presente de la especie iónica, su forma, la temperatura, naturaleza y concentración del analito. Las propiedades del disolvente tales como la fuerza iónica, pH del buffer y la constante dieléctrica, la viscosidad o la adición de un disolvente orgánico afectan también la movilidad electroforética.

3.1.2 FLUJO ELECTROOSMÓTICO

El Flujo Electroosmótico (EOF), es el flujo de una solución iónica o buffer a través del capilar que ocurre cuando un voltaje es aplicado, este fenómeno se presenta porque la pared interna del capilar esta cargada. Cuando un capilar de sílice fundida se llena con buffer, los cationes en el buffer son atraídos por las cargas negativas de la pared del capilar y esta interacción electrostática resulta en un incremento de la concentración de cationes en la interfase entre la pared del capilar y el buffer. Las cargas negativas de la pared del capilar y los contraiones del buffer, además de mantener el balance de la carga, forman una doble capa eléctrica constituida por una capa interna o fija, la cual es atraída con fuerza por los grupos SiO^- y una capa difusa o móvil, la cual no está unida con fuerza porque se encuentra mas lejos de los grupos SiO^- (Figura 1).

¹ Es la movilidad de las moléculas en solución bajo la influencia de un campo eléctrico.

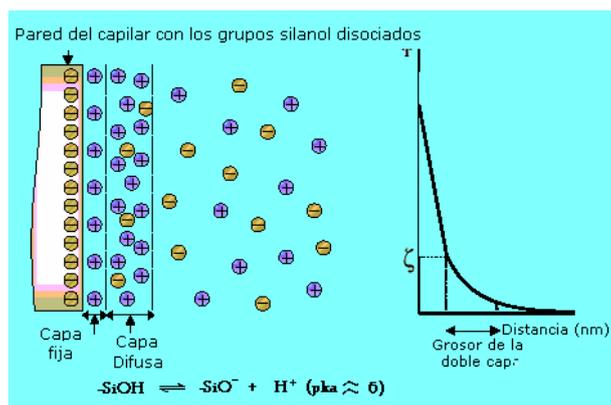


Figura 1. Teoría de la doble capa y potencial zeta

Los iones presentes en el sistema, cuando un voltaje es aplicado, son desplazados hacia el cátodo o ánodo de acuerdo a su carga. Los cationes migran hacia el cátodo y la migración de éstos resulta en un movimiento del buffer a través del capilar, originando así el llamado *Flujo Electroosmótico* (Figura 2). A medida que el pH del buffer se incrementa, las cargas negativas del capilar también incrementan y con ello la concentración de los cationes dando como resultado un incremento en la velocidad del EOF.

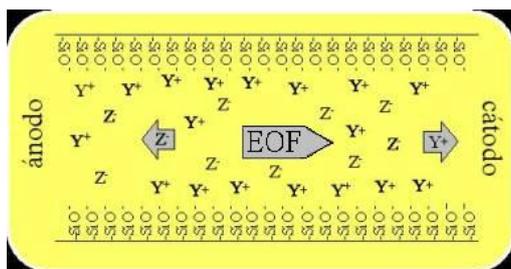


Figura 2. Flujo Electroosmótico y movimiento de los iones.

El perfil de flujo del EOF es casi plano, este perfil es contrario al perfil laminar observado en sistemas controlados por presión y no sufre de resistencia grande en las paredes del capilar, además de ser benéfico porque no contribuye directamente a la dispersión de zonas de los analitos y provoca el movimiento de todas las especies, sin importar su carga, en la misma dirección. Con modificaciones químicas de la superficie del capilar se puede reducir, eliminar o cambiar la dirección del EOF. El cambio de dirección del EOF también puede conseguirse al invertir la polaridad del voltaje aplicado [28-30]. Los parámetros que afectan al EOF son cambios en el pH del buffer, en la composición del buffer como la fuerza iónica, la constante dieléctrica, la viscosidad o la adición de un solvente orgánico [28-29].

3.1.3 MOVILIDAD APARENTE Y TIEMPO DE MIGRACIÓN

La movilidad aparente de un analito, puede ser expresada como la suma de la movilidad efectiva del analito (μ_e) y la movilidad debida al EOF (μ_{EOF}) del sistema. La movilidad efectiva puede ser calculada de la movilidad aparente midiendo independientemente el EOF, utilizando un marcador neutro, el cual se mueve a una velocidad igual que el EOF (Figura 3) [28-30].

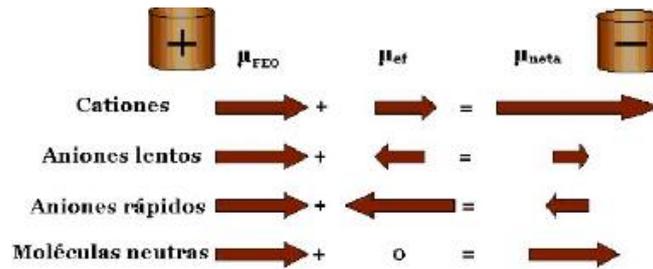


Figura 3. Migración aparente de cationes, aniones y moléculas neutras en el interior de un capilar bajo la acción de un campo eléctrico.

3.2 CLASIFICACIÓN DE LOS MODOS DE SEPARACIÓN.

La clasificación de los diferentes modos de electroforesis capilar basada en el principio de separación es la más aceptada. Los diferentes modos de separación son: electroforesis capilar de zona, de enfoque isoeléctrico, electroforesis capilar en gel, isotacoforesis capilar, electrocromatografía capilar y cromatografía capilar electrocinética micelar [29]. Los más utilizados son la electroforesis capilar de zona y la cromatografía capilar electrocinética micelar.

3.2.1 ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA.

Es el modo más utilizado de Electroforesis Capilar, ya que es relativamente simple y es aplicable a diferentes tipos de muestras y análisis. En la Electroforesis Capilar de Zona (ECZ) el capilar se llena con un electrolito soporte, que en la mayoría de los casos es un buffer y se introduce una muestra dentro del capilar, cuando se aplica un voltaje, los analitos migran a través del capilar en zonas discretas y se separan debido a sus diferencias en las velocidades de migración, que depende de su movilidad electroforética (Figura 4). Si existe EOF (pH entre 3-12), la migración de todos los analitos se ve influenciada por éste.

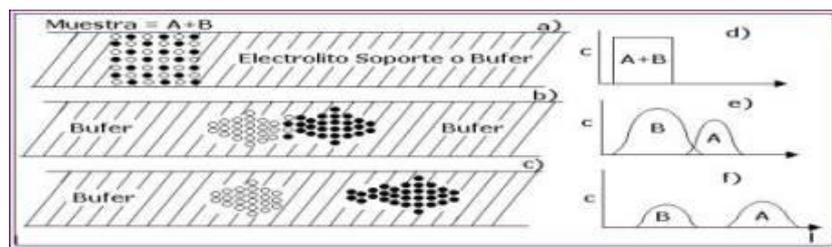


Figura 4. Electroforesis Capilar de Zona

En polaridad normal y con EOF, los cationes migran a través del capilar en la misma dirección del EOF, desde el ánodo hacia el cátodo, con una velocidad mayor que la del EOF. Los cationes eluyen de acuerdo a su relación carga-masa; las moléculas neutras se mueven a través del capilar bajo la influencia del EOF y no se separan entre sí; eluyen después de los cationes. Los aniones, los cuales son atraídos hacia el electrodo positivo, migran en dirección opuesta a la del EOF y eluyen al final. Por regla general, el EOF es mayor que las velocidades electrofóreticas de los aniones, así la mayoría de ellos son llevados hacia el cátodo, los aniones eluyen en orden inverso a su relación carga-masa [28-30].

3.2.2 CROMATOGRAFÍA CAPILAR ELECTROKINÉTICA MICELAR.

La Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar (CCEM) es el segundo modo más utilizado de EC, es un híbrido de ésta y de la cromatografía de líquidos, ya que combina el mecanismo de separación de la cromatografía con el de migración electroforética. Fue introducida por Terabe en 1984 y su desarrollo fue un avance en EC porque permite separar compuestos eléctricamente neutros [28-30]. La fase en CCEM que es análoga a la fase estacionaria en cromatografía de líquidos de fase reversa es una fase “pseudostacionaria”. Para ello un surfactante se adiciona al buffer formando una fase micelar, una micela es un agregado uniforme de moléculas de surfactante con una superficie polar o iónica (hidrofílica) y un interior hidrofóbico (no polar). Cuando un surfactante esta presente en solución en una concentración mayor que su concentración micelar crítica (CMC), forma micelas. Las micelas se forman en solución acuosa por un cierto numero de moléculas de surfactante (número de agregación) asociándose en una orientación en la que los grupos no polares se forman al interior de la micela, los grupos polares o iónicos constituyen la superficie de la micela y permiten que ésta permanezca soluble, las micelas son generalmente esféricas en su forma. Este modo de EC se basa en la distribución de los analitos entre las micelas y el electrolito soporte. Cuando se introduce una muestra en el sistema los componentes se distribuyen entre la fase acuosa y el interior hidrofobo de las micelas, la distribución de los analitos y los equilibrios que resultan dependen de la polaridad de los analitos (Figura 5).

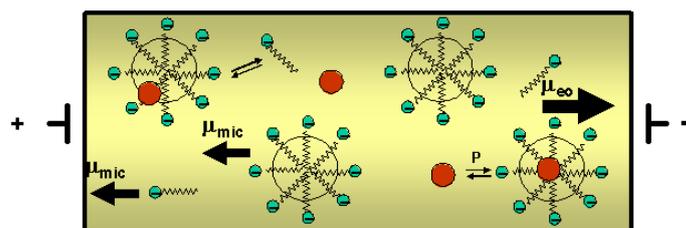


Figura 5. Cromatografía capilar electrocinética micelar

Tanto solutos neutros como ionizados pueden ser separados en CCEM. Los analitos ionizados se retienen debido a su migración electroforética, a interacciones iónicas entre ellos y las micelas y por su solubilización por las micelas. Para especies neutras, el equilibrio entre la micela y el electrolito soporte rige su movilidad electroforética y por tanto sus posibilidades de separación. Las micelas con carga pueden migrar también con el EOF o a través de él. La dirección dependerá de la carga de la micela y de la polaridad del sistema. Cuando un analito interacciona dentro de la micela éste migra junto con ella, cuando un analito neutro interacciona fuera de la micela, éste migra en la dirección y a la velocidad del EOF. Si los analitos están cargados migran en la dirección y a la velocidad de la suma neta de su movilidad electroforética y del EOF. La selectividad en CCEM puede manipularse, variando la naturaleza física de la micela (como tamaño, carga, geometría), usando diferentes surfactantes, adicionando otras sustancias al buffer de corrida, como los modificadores, los cuales pueden afectar la carga de las micelas o de los analitos y cambiar la solubilidad en las micelas. Los modificadores también pueden servir como una segunda pseudofase de tal forma que los analitos interaccionan entre la micela y la otra fase hidrofóbica. Los modificadores orgánicos causan cambios en el EOF ya que cambian el potencial zeta y la viscosidad del buffer, esto causa cambios en la selectividad porque cambia la distribución de los analitos entre el buffer y las micelas. El uso de iones metálicos también cambia la selectividad en CCEM. Existen otros aditivos que actúan de manera similar a los surfactantes, ya que de alguna manera interaccionan con el analito para ser

determinados, dentro de ellos tenemos: ciclodextrinas, sales biliares, éteres corona, antibióticos macrocíclicos y disolventes orgánicos [28-30].

3.3 INSTRUMENTACIÓN

El diseño de un equipo de Electroforesis Capilar consiste básicamente de las siguientes partes: un capilar, depósitos para el electrolito soporte (viales), un par de electrodos (situados junto a los extremos del capilar, en los depósitos), un sistema de enfriamiento, una fuente de alto poder, capaz de producir en general 30,000 volts (30kV), la fuente de poder debe tener la capacidad para cambiar de polaridad, esto se requiere porque la posición del detector esta predeterminada, un detector y un sistema de adquisición de datos (Figura 6) [28].

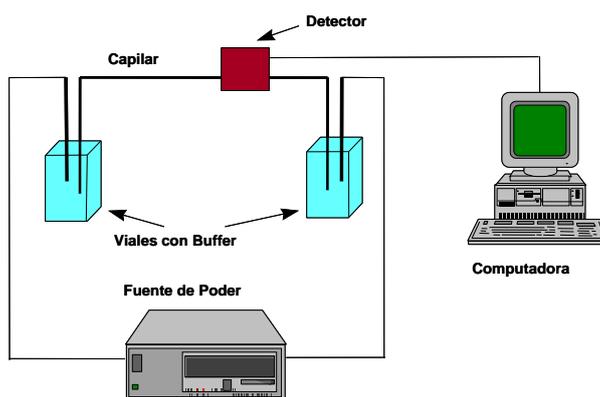


Figura 6. Equipo de Electroforesis Capilar

3.4 MODOS DE DETECCIÓN

Existen diversos sistemas de detección en EC, de los cuales muchos son similares a los utilizados en Cromatografía de Líquidos. Los detectores que se utilizan en EC son: Espectrofotométricos (UV-Vis, arreglo de diodos, fluorescencia), electroquímicos (conductimétricos, amperométricos, potenciométricos), espectrométricos (espectrómetro de masas), sistemas acoplados (plasma acoplado inductivamente-espectrómetro de masas, electro aspersion-espectrofotometría de absorción atómica) [28-29, 31].

4. POLIAMINAS

Las poliaminas son compuestos relacionados con el crecimiento y diferenciación celular, participan en la regulación de múltiples vías metabólicas, son sintetizadas por todos los seres vivos mediante diferentes procesos que dependen de cada sistema celular. Las poliaminas son compuestos de bajo peso molecular que se encuentran en todos los seres vivos, las más estudiadas son la putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm), ésta última sintetizada únicamente por organismos eucariontes. Son policationes que estabilizan ácidos nucleicos y estimulan su replicación, son esenciales para los procesos de crecimiento y también han sido asociadas con carcinogénesis [32-33]. La putrescina es una diamina, sin embargo, debido a su papel como precursor obligado de las otras, es considerada también una poliamina. Espermidina posee tres grupos amino, mientras que espermina posee cuatro. Las poliaminas cumplen una variedad de papeles específicos que las hacen esenciales para el crecimiento y proliferación celular, además pueden interactuar con estructuras celulares cargadas negativamente (proteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos), proporcionándoles estabilidad en su estructura. Putrescina, espermidina y espermina bajo condiciones fisiológicas muestran 2, 3 o 4 cargas positivas, espaciadas de manera regular interrumpidas por puentes hidrofóbicos de metileno [3, 5, 32-33] (Figura 7), en la tabla 1 se muestran los pKa's de los diferentes grupos amino de las poliaminas [33].

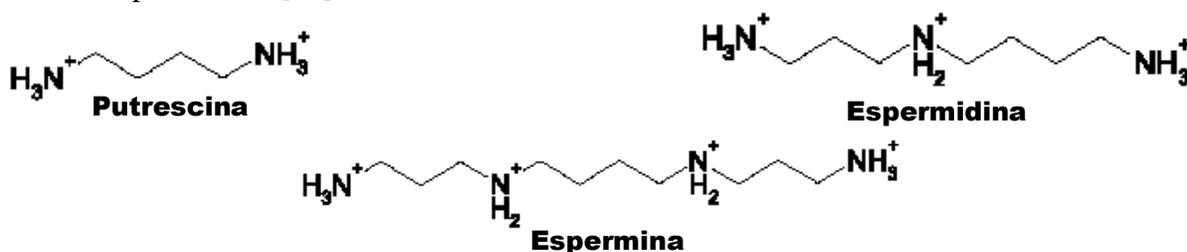


Figura 7. Estructura de las poliaminas

Tabla 1. pKa's de los grupos aminos primarios y secundarios de las poliaminas.

Poliamina	pK ₁	pK ₂	pK ₃	pK ₄
Putrescina	9.35	10.8	–	–
Espermidina	9.52	10.8	11.56	–
Espermina	8.90	9.79	10.95	11.50

4.1 POLIAMINAS Y LOS ALIMENTOS

Las poliaminas se encuentran en frutas, vegetales, en alimentos de origen animal y en alimentos fermentados. Su presencia en órganos de las plantas sugiere que cumplen una función importante en la regulación del crecimiento y desarrollo de las mismas. Están involucradas en una variedad de procesos, que van desde la desencadenación la organogénesis hasta la protección contra el estrés o daño [34]. Con los avances en biología molecular, se ha hecho un progreso considerable para entender la relación entre la producción de etileno y la maduración [35]. Se sabe que el etileno y las poliaminas ejercen efectos opuestos con respecto a la maduración del fruto y la senescencia, un gran número de investigaciones han mostrado que el balance de estos dos reguladores opuestos del crecimiento es crucial para retardar o para acelerar ambos procesos [36]. Se han reportado cambios remarcables en los niveles basales de los títulos de poliaminas en frutos en respuesta al tipo de estrés o daño, incluidos *daño por frío* y *daño mecánico* [34]. El *daño por frío* es un problema que presentan los frutos tropicales al ser almacenados a bajas temperaturas (debajo de su temperatura crítica), pero no de congelación durante su vida

postcosecha, afectando su vida de anaquel causando una variedad de síntomas que incluyen, maduración incompleta, manchas superficiales, decoloración, marcaje de hoyos en la superficie, pérdida de sabor entre otros. El incremento en los niveles de poliaminas al utilizar distintas tecnologías postcosecha en diversas investigaciones sugieren que las poliaminas podrían proteger a las plantas del daño por frío debido a su habilidad para preservar la integridad de la membrana, sin embargo, no está claro si éste incremento es un mecanismo protector contra el daño por frío o es una respuesta del tejido a este tipo de estrés [34].

4.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL MANGO.

El mango es el tercer fruto tropical en términos de producción e importación a nivel mundial. En lo que respecta al año 2003, México fue el cuarto productor de mango y el principal exportador a nivel mundial (FAO 2003). De los principales estados productores, sobresalen: Michoacán, Sinaloa, Nayarit y Chiapas, que juntos representan el 94.3 % del volumen de la exportación nacional [37]. El almacenamiento postcosecha de productos de origen tropical y subtropical a temperaturas frías pero no de congelación (daño por frío), ocasiona una mayor susceptibilidad al ataque por patógenos y una pérdida de calidad del producto [38]. Estas alteraciones son una de las causas de importantes pérdidas desde la cosecha hasta su comercialización y se ha calculado que el promedio de pérdidas es del orden de 25-40% de la producción total. Para extender la vida de anaquel y controlar los desórdenes fisiológicos presentes en mango, se han utilizado tratamientos térmicos, los cuales han mostrado su utilidad en la reducción de los daños por frío. Los mecanismos por los cuales, los tratamientos térmicos proporcionan protección contra los desórdenes de postcosecha no son bien conocidos, algunos de los efectos presentados por distintos investigadores comprenden el cambio en la composición de lípidos de la membrana [24], la inactivación de ciertos sistemas enzimáticos y la síntesis de metabolitos como las poliaminas que pueden ayudar a estabilizar y proteger a la membrana [25].

4.3 POLIAMINAS Y CANCER.

El rápido crecimiento tumoral ha sido asociado con una biosíntesis de poliaminas considerablemente alterada [3]. Se han observado niveles elevados de poliaminas en células y tejidos con una división celular rápida, como en células tumorales. Existen numerosos estudios que indican concentraciones elevadas de Put, Spd y Spm o de contenido de poliaminas totales (libres y acetiladas) en pacientes con cáncer y en tejidos cancerosos [39-40] en comparación con sujetos sanos, así mismo se han observado niveles promedio elevados de poliaminas en suero de pacientes con cáncer de útero, también se han reportado significativas diferencias de poliaminas urinarias en carcinoma gástrico avanzado, cáncer de ovario, cáncer de mama [41], leucemia leucítica aguda [3]. El incremento de las poliaminas celulares podría explicarse por su liberación de células muertas como respuesta del tumor a la quimioterapia [3] o por la activación de la ODC (la cual cataliza la formación de putrescina) durante la transformación maligna [33]. También se ha observado que los niveles de poliaminas en orina aumentan durante el rechazo a trasplantes, por lo que la medición de dichos niveles se perfila como una técnica adicional no invasiva de gran utilidad para el monitoreo de pacientes trasplantados [32]. Por lo tanto, la medición de las poliaminas en fluidos biológicos y tejidos podría tener relevancia clínica, especialmente en pacientes con cáncer [33, 40]. El monitoreo de las concentraciones de poliaminas en fluidos corporales puede ser utilizado para diagnóstico, predicción de hechos terapéuticos, para pronóstico, para evaluar la eficacia de medicamentos anticancerígenos o para indicar recaídas [3, 42]. Los estudios más recientes de las poliaminas se han enfocado en la identificación de la eficacia de la quimioterapia y ampliado a la predicción temprana de las recaídas [43].

5. DERIVATIZACIÓN

Debido a la falta de un cromóforo o fluoróforo fuerte, es decir, a que las poliaminas no exhiben alguna característica estructural que permita su detección directa con una sensibilidad adecuada por detección espectrofotométrica o por fluorescencia en EC, muchos de los procedimientos analíticos reportados para la determinación poliaminas incluyen un paso de derivatización y un paso de separación [3]. Existen dos formas de detectar sustancias que no poseen fluorescencia natural. La primera es a través del uso de métodos de *detección indirecta* y la segunda es por *derivatización*:

5.1 DETECCIÓN INDIRECTA: Se utiliza un buffer de corrida en el cual un cromóforo o fluoróforo muy absorbente está presente, de tal forma que cuando el analito llega al detector, hay una disminución de la absorbancia, lo que conduce a picos negativos. Esta disminución de la absorbancia está relacionada linealmente con la concentración del analito detectado. La detección indirecta está basada sobre el desplazamiento de la carga o por formación de pares entre el analito y las moléculas absorbentes o fluorescentes del buffer y no sobre alguna propiedad de absorción o emisión del analito. Este tipo de detección es poco utilizado porque la sensibilidad es menor a la obtenida por detección en forma directa.

5.2 DERIVATIZACIÓN: Significa un cambio en la estructura del analito con un reactivo derivatizante para tener un analito absorbente o fluorescente detectable. La derivatización esta asociada a la incorporación a los analitos de grupos absorbentes en el UV o de grupos fluorescentes para obtener una mayor sensibilidad y selectividad, este cambio en su estructura pretende dar al analito de interés características mas adecuadas para su detección [27]. La derivatización química en solución provee alta sensibilidad en la detección de estos compuestos por unión a un cromóforo o fluoróforo que resulta en productos con fuerte absorción en el UV o en emisión fluorescente. Para el análisis de las poliaminas; se han utilizado varios agentes derivatizantes en EC, por ejemplo: 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AccQ) [17], O-pftalaldehido (OPA) [18, 20], isotiocianato de fluoresceína isomero I (FITC) [21, 23, 44], cloruro de benzóilo [45]. La detección por fluorescencia inducida por láser (LIF), es el modo de detección más sensible disponible para ECZ y CCEM y es una excelente alternativa para una detección de bajas concentraciones de amino compuestos después de ser derivatizados [3, 46-47]. Es importante que al elegir un reactivo derivatizante tomemos en cuenta que la longitud de onda del láser debe coincidir con el pico de absorbancia del analito y el poder del láser debe estar arriba de 20 mW para tener una sensibilidad adecuada. Sin embargo, el principal inconveniente de los detectores por LIF es el limitado número de longitudes de láser disponibles [27]. Dentro de los agentes derivatizantes, el FITC, aunque no es muy popular debido al largo tiempo de reacción, ofrece la ventaja de una alta sensibilidad [21]. El FITC ha sido ampliamente utilizado como un reactivo derivatizante en el campo de la bioquímica [48], el FITC proporciona buena sensibilidad para aminos primarios y secundarios [48], forma derivados con buenas características fluorescentes, con buenas propiedades electroforéticas y con fuerte señal fluorescente inducida por una línea de un láser de ion Argón a 488 nm. [27]. El primer uso de este reactivo en Electroforesis Capilar fue reportado por Cheng y Dovichi en 1988 [48] cuando se demostró un análisis en niveles de subattomoles de algunos aminoácidos. El FITC ha sido también muy utilizado como un reactivo de derivatización precolumna para poliaminas en EC con detección por LIF y aminos biogénicos [48].

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 REACTIVOS

Tetraborato de Sodio Decahidratado, NaOH, Acetonitrilo grado HPLC, Etanol absoluto anhidro, Cloruro de Benzoilo (99%) (J.T. Baker), SDS, Putrescina (98%), Espermidina (99%), Espermina (99%) como sales hidrocioradas, β -ciclodextrina, FITC, Membranas de nitrocelulosa 0.45 μ m (Sigma-Aldrich), Cloroformo grado HPLC, Metanol, Acetona, Nitrógeno de 99.998% de pureza y Agua desionizada (Milli-Q Plus).

6.2 EQUIPO

Se utilizo un equipo de Electroforesis Capilar P/ACE™ MDQ CE System de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), equipado con un detector de Fluorescencia Inducida por Láser (LIF) con una longitud de onda de excitación de 488 nm (láser de ion argón) y una longitud de onda de emisión a 520 nm y equipado además con un modulo de detección UV. También se utilizo un capilar de sílice fundida de longitud total de 60.1 cm, con una longitud al detector de 49.6 cm y 75 μ m de diámetro interno. Todos los análisis se realizaron a 25 °C. La detección en UV se realizo a 200 nm y en Fluorescencia Inducida por Láser se monitoreo la intensidad de la emisión a una longitud de onda de 520nm.

6.3 DERIVATIZACIÓN CON CLORURO DE BENZOILO Y DETECCIÓN POR UV

6.3.1 FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN

Las aminas primarias y secundarias reaccionan con halogenuros de acilo para formar amidas. Esta reacción es un ejemplo de la sustitución nucleofílica del acilo, en donde un nucleófilo toma el lugar de un grupo saliente en el carbono del carbonilo (Figura 8).

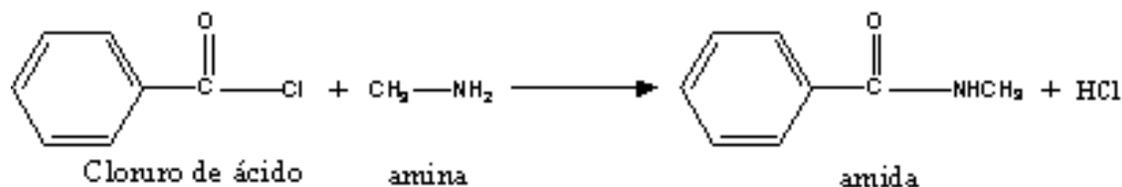


Figura 8. Reacción de derivatización de una amina con Cloruro de Benzoilo.

6.3.2. METODOLOGÍA DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN

Las soluciones stock de los estándares de las poliaminas se prepararon por separado en agua desionizada. La derivatización se realizo de acuerdo al procedimiento utilizado por G. Taibi et al [49]. Para ello, a 1 ml de una mezcla de estándares de poliaminas en una concentración de 50 nmol/ml se le adiciono 1 ml de NaOH 2 M y 10 μ L de Cloruro de benzoilo concentrado en metanol (1:1 v/v), ésta solución se mezcló durante un minuto en un vórtex y se dejó reposar por 20 min. Después de este tiempo se hizo una extracción con 2 ml de cloroformo; esta mezcla se agitó con un vortex dos veces durante un minuto y después se centrifugo a 4500 rpm por 5 min. Después de haber centrifugado, la fase acuosa fue separada y a la fase orgánica se le adicionaron 2 ml de NaOH 0.1 M, para posteriormente mezclar con un vortex durante 5 min, este procedimiento fue repetido dos veces donde al final se realizó una centrifugación durante 5 min a 4500 rpm. Después de este ultimo paso, la fase acuosa fue desechada y la fase orgánica fue evaporada utilizando Nitrógeno de alta pureza. El residuo seco fue resuspendido en 1 ml de un buffer 20 mM de boratos, pH 10 y 10 mM de SDS, se mezcló en un vortex durante 5 min, para finalmente analizar esta muestra en el equipo de electroforesis capilar. El blanco fue preparado

reemplazando los estándares de poliaminas por agua. Las muestras fueron introducidas al equipo por inyección hidrodinámica aplicando 0.5 psi de presión por 5 s.

6.4 DERIVATIZACIÓN CON FITC Y DETECCIÓN POR LIF

6.4.1 FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN

El FITC reacciona con aminas primarias y secundarias como fenilisotiocianato en condiciones alcalinas para formar fluorescein tiocarbamil amino derivados (Figura 9), los cuales exhiben fuerte fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 488 nm [48].

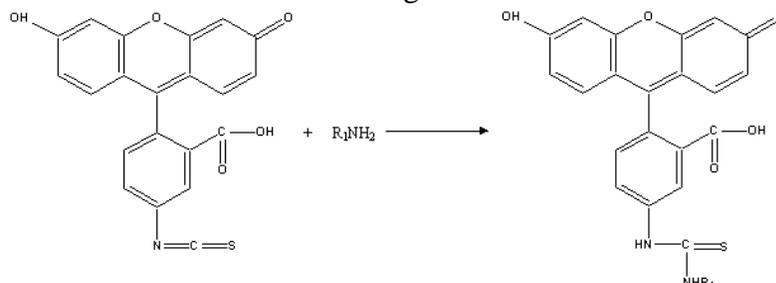


Figura 9. Reacción de una amina primaria con FITC.

6.4.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

6.4.2.1 Mangos: Se pesaron 300 mg de muestra (piel o pulpa de mango) y se molieron hasta obtener un polvo fino con ayuda de nitrógeno líquido; la muestra se transfirió a un tubo de microcentrífuga adicionándole 1 ml de ácido perclórico 0.2 N, agitando con la ayuda de un vortex por un tiempo de 2 min. Posteriormente, se dejaron en un baño de hielo durante 30 min para después se centrifugar por 30 min. a 13000 rpm. Finalmente se tomó el sobrenadante y se filtró a través de membranas de nitrocelulosa 0.45 μm . Tanto en piel como en pulpa de mango se tomaron 700 μL del extracto y se ajustó el pH a 10 con NaOH 2 M, se adicionaron 290 μL de buffer de boratos 20 mM (pH 10). Las poliaminas extraídas fueron derivatizadas con la adición de 10 μL de la solución de FITC (2.5×10^{-3} M).

6.4.2.2 Plasma: Se adicionó 1 mL de acetonitrilo a 1 mL de plasma, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 20 min., el sobrenadante fue separado y el solvente evaporado en una corriente de nitrógeno, las muestras se resuspendieron en 950 μL de buffer de boratos 20 mM (pH 10) y agitaron con ayuda de un vortex durante 1 min. Las muestras fueron derivatizadas con la adición de 10 μL de la solución de FITC. Las muestras se diluyeron con el búfer de boratos 20 mM (pH 10) antes de su inyección en el equipo. Se preparó una solución stock de FITC 2.10×10^{-4} M en acetona. Cada uno de los estándares de poliaminas se preparó de forma individual pesando 10 mg y llevándolos a un volumen de 10 ml con buffer de boratos 20 mM (pH 10).

6.4.3 PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES

Para la derivatización de los estándares se tomaron 100 μL de cada solución estándar, adicionando 450 μL de la solución de FITC para llevar a un volumen total de 1 ml con buffer de boratos 20 mM (pH 10). La solución anterior se guardó durante un periodo de 5 h protegiendo de la luz y a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla de estándares derivatizados fue diluida con buffer de boratos 20 mM (pH 10) antes de su inyección y fueron introducidas al equipo por inyección hidrodinámica aplicando 0.5 psi de presión durante 5 s.

7.1 DERIVATIZACIÓN CON CLORURO DE BENZOILO Y DETECCIÓN POR UV

7.1.1 DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

Los experimentos se realizaron utilizando inicialmente un buffer de boratos 20 mM a pH 8.5 con SDS 10 mM aplicando un voltaje de 25 kV, en estas condiciones se obtuvieron picos anchos (Figura 10).

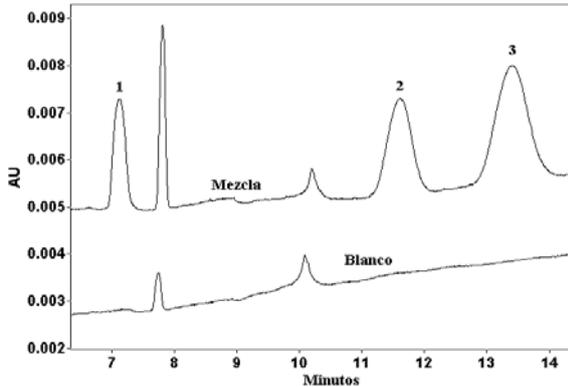


Figura 10. Mezcla de estándares de poliaminas benzoiladas y el blanco. Buffer de boratos 20 mM, SDS 10 mM a pH 8.5, 25 kV. 1= Put, 2= Spd y 3= Spm

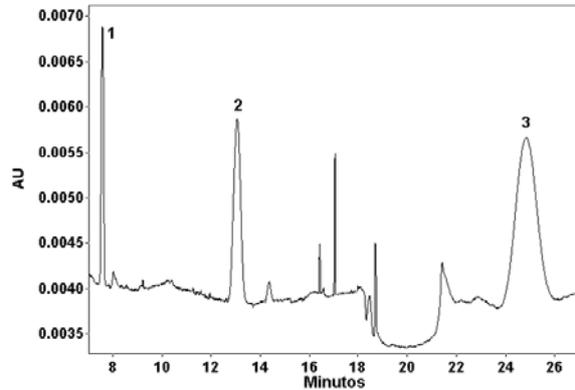


Figura 11. Mezcla de estándares de poliaminas benzoiladas. Buffer de boratos 20 mM, SDS 10 mM a pH 8.5 y etanol al 8%, 25 kV. 1= Put, 2= Spd y 3= Spm

El uso de disolventes orgánicos en el buffer de separación puede aumentar o disminuir la separación y la eficiencia de los picos, por lo que se utilizó un disolvente orgánico como el etanol con la intención de mejorar la eficiencia de los picos, probando inicialmente una concentración de etanol del 8% v/v. En el caso de las poliaminas putrescina y espermidina se obtuvieron picos mas eficientes, sin embargo, en el caso de espermina la eficiencia disminuyo; asimismo el tiempo de análisis aumento hasta 26 minutos (Figura 11).

7.1.2 INFLUENCIA DEL PH EN LA SEPARACIÓN

El pH del buffer es crucial para las separaciones por cromatografía capilar electrocinética micelar ya puede afectar no solo las interacciones soluto-micela, sino también al EOF, a las movilidades de las poliaminas derivatizadas y de la fase micelar.

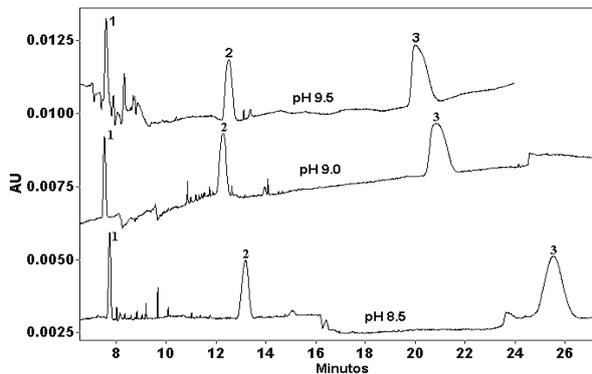


Figura 12. Influencia del pH en la separación. Boratos 20 mM, SDS 10 mM, etanol al 8%, 25 kV. 1=Put, 2=Spd y 3=Spm

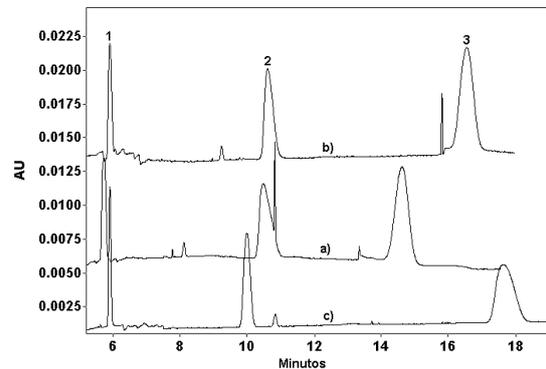


Figura 13. Variación de la cantidad de Etanol. Boratos 20 mM, SDS 10 mM, pH 9.0. a) = 3% de Etanol, b) = 5% de etanol y c) = 8% de Etanol. 1=Put, 2=Spd y 3=Spm., 25 kV.

Por lo que se investigó la influencia del pH en la separación, probandose valores de pH de 8.5, 9 y 9.5 con una composición del buffer de 20 mM de boratos, 10 mM de SDS y 8% etanol (Figura 12). Se decidió trabajar a un pH de 9, ya que en estas condiciones los picos obtenidos son los que muestran una mejor eficiencia, hay menos interferencias o ruido y además el tiempo de análisis es menor que a pH 8.5.

7.1.3 EFECTO DEL MODIFICADOR ORGÁNICO

Posteriormente se probaron diferentes concentraciones de etanol (3, 5 y 8%), adicionadas al buffer de corrida, con el fin de mejorar la forma de los picos de las poliaminas y ver el efecto en la separación de los compuestos. La Figura 13 muestra la influencia del contenido de etanol en el buffer sobre los tiempos de migración y la forma de los picos. El aumento en la concentración de etanol aumenta un poco la altura de las señales (muy probablemente debido a la mejora de la solubilidad de los analitos), pero a su vez aumenta el tiempo de análisis. La mejor señal se obtuvo utilizando 5% de etanol en el buffer de separación, ya que en estas condiciones se obtienen picos con una mejor respuesta al detector. Además, se cambió el voltaje de 25 kV a 30 kV, con el fin de disminuir el tiempo de análisis. En la Figura 14, se observa que al aumentar el voltaje aplicado de 25 a 30 kV, el tiempo de análisis disminuyó de 18 minutos a aproximadamente 16.

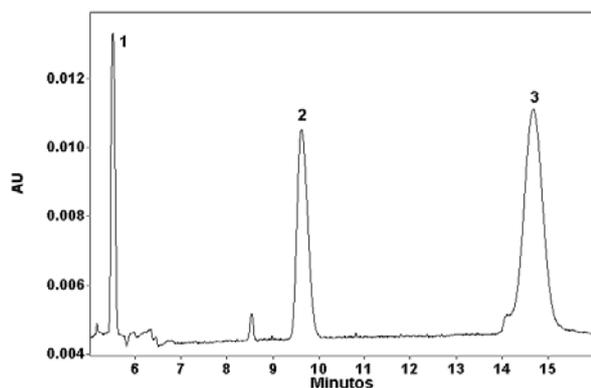


Figura 14. Estándares de poliaminas benzoilatadas (20 ppm). Boratos 20 mM, SDS 10 mM, pH 9.0 y 5% de Etanol, 30 kV y 25°C. 1=Put, 2=Spd y 3=Spm

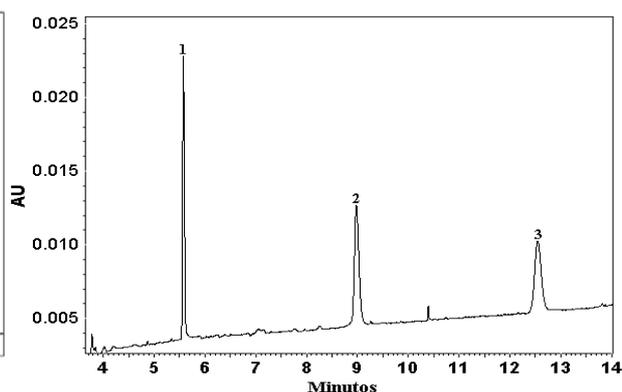


Figura 15. Mezcla de estándares de poliaminas benzoilatadas (20 ppm) sin la presencia de etanol. Buffer de boratos 20 mM, SDS 10 mM y pH 9.0, 30 kV y 25°C. 1=Put. 2=Spd y 3=Spm

Finalmente, las soluciones stock de las poliaminas se prepararon utilizando un buffer de boratos 20 mM a pH 10 y no en agua desionizada como se habían preparado inicialmente (sección 6.3.2) y se analizaron bajo las condiciones de la Figura 14, con una pequeña modificación, no se adicione etanol al 5%, el electroferograma obtenido se muestra en la Figura 15 en el que se observa que al preparar los estándares en el buffer de separación se tienen picos mas eficientes y con una mejor respuesta al detector y adicionalmente una disminución en el tiempo de análisis, por lo que el medio en donde estén preparadas las muestras afectan la resolución y eficiencia de los picos de las poliaminas separadas.

7.1.4 CONDICIONES ÓPTIMAS DE LA SEPARACIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, la mejor condición de separación de las poliaminas son: Buffer de boratos 20 mM a pH = 9, con la adición de SDS 10 mM aplicando un voltaje de 30 kV, a 25°C.

7.2 DERIVATIZACIÓN CON FITC Y DETECCIÓN POR LIF

7.2.1 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

Inicialmente se trabajo con un buffer de boratos 20 mM a pH 8.5, con SDS 30 mM, y 25 kV de voltaje, pero no se observo separación para el caso de espermidina y espermina, por lo que se aumento la concentración de SDS a 50, 80 y 100 mM (Figura 16). A 50 mM no se dio la separación de estos dos compuestos.

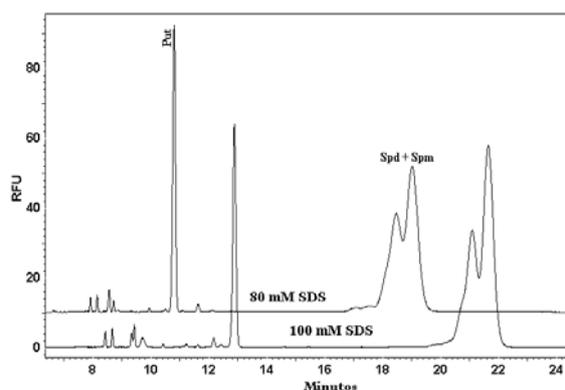


Figura 16. Efecto de la concentración de SDS. Boratos 20 mM pH 8.5, 25 kV. [put]= 1.24×10^{-5} M, [spd]= 7.85×10^{-6} M, [spm]= 5.74×10^{-6} M, [FITC]= 1.89×10^{-6} M

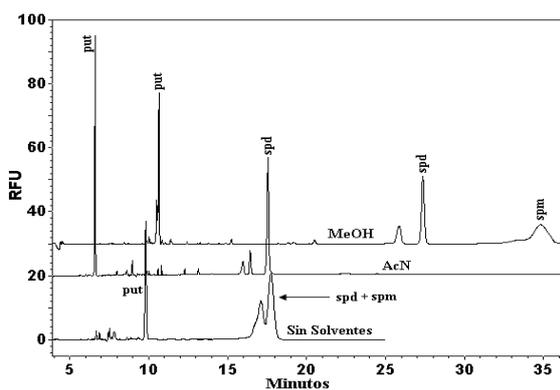


Figura 17. Efecto de la adición de solventes (metanol y acetonitrilo al 10% v/v). Boratos 20 mM pH 8.5, 25 kV, SDS 100 mM. [put]= 1.24×10^{-5} M, [spd]= 7.85×10^{-6} M, [spm]= 5.74×10^{-6} M, [FITC]= 1.89×10^{-6} M.

Se puede observar de la figura 16 que a una concentración de 80 y 100 mM de SDS, la putrescina esta resuelta, pero espermidina y espermina no.

7.2.2 EFECTO DE DISOLVENTES EN EL BUFFER DE SEPARACIÓN

Debido a que los disolventes orgánicos pueden aumentar o disminuir la separación, el efecto de dos disolventes (metanol y acetonitrilo al 10% v/v) en el buffer de separación fue investigada (Figura 17). A pesar de que con la adición de metanol al 10% se dio la separación de los compuestos, el tiempo de análisis aumentó hasta 37 min y el pico de espermina es ancho; en el caso de la adición de acetonitrilo, a pesar de obtener picos muy eficientes para el caso de putrescina y espermidina, el tiempo de análisis aumentó de forma considerable y hasta los 40 min no se observó ningún pico que correspondiera a espermina. Debido al aumento en el tiempo de análisis con la adición de disolventes, se decidió evaluar el efecto del pH en la separación.

7.2.3 EFECTO DEL PH DEL BUFFER DE SEPARACIÓN

Como se menciono anteriormente el pH del buffer es crucial para las separaciones por CCEM. Por ello se hizo un estudio del efecto del pH en la separación, el rango de pH del buffer de corrida examinado fue de 8.5-9.5, los resultados se muestran en la Figura 18.

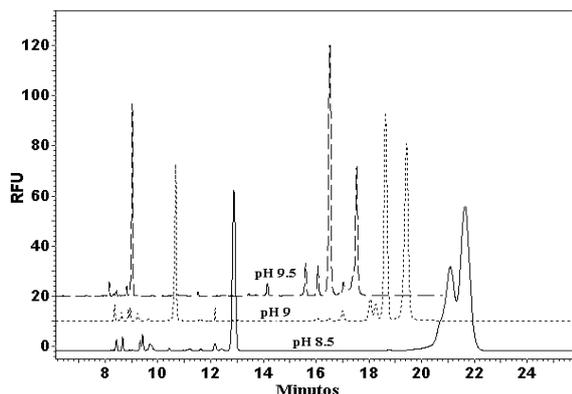


Figura 18. Influencia del pH en la separación. Boratos 20 mM, SDS 100 mM, 30 kV. [put]= 6.2×10^{-6} M, [spd]= 3.92×10^{-6} M, [spm]= 2.87×10^{-6} M, FITC= 9.49×10^{-4} M

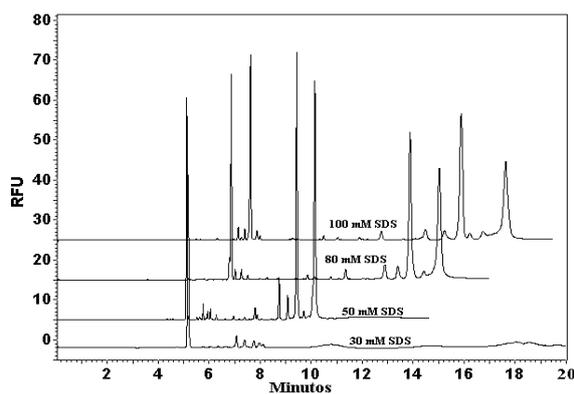


Figura 19. Variación de la concentración de SDS. Boratos 20 mM, pH 9.5, 30 kV, [put] = 1×10^{-6} M, [spd] = 1.96×10^{-6} M, [spm] = 1.43×10^{-6} M, [FITC]= 4.73×10^{-7} M

A pH 8.5 la eficiencia y resolución de los picos fueron pobres, pero a pH 9.0 y pH 9.5 la eficiencia y la resolución de los picos mejoraron. Se decidió utilizar un pH de 9.5, ya que a este valor de pH además de tener una buena separación de los compuestos de interés, el tiempo de análisis es menor, se tienen picos eficientes y la sensibilidad al detector fue mayor para putrescina y espermidina.

7.2.4 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SDS

Una vez seleccionado el pH de trabajo, se estudio nuevamente el efecto de la concentración de SDS sobre la separación (Figura 19), se utilizó un rango de concentración de 30 a 100 mM de SDS manteniendo el pH en 9.5 y la concentración del buffer de boratos en 20 mM. En la Figura 19 se observa que la adición de SDS influyó significativamente en la resolución de las poliaminas derivatizadas; los tiempos de retención de las poliaminas incrementaron a medida que se aumentó la concentración de SDS. La concentración óptima de SDS adicionada fue de 50 mM, en donde la eficiencia y resolución de los picos es buena y además el tiempo de análisis es menor en comparación con las concentraciones de SDS de 80 y 100 mM. De esta figura se observa que la selectividad para espermidina y espermina es baja a una concentración de SDS 30 mM, por lo que probablemente espermidina y espermina se separan debido a la ganancia de hidrofobicidad, por lo tanto, la solubilización y las interacciones hidrofóbicas con las micelas son probablemente el mecanismo principal para la separación de estas dos poliaminas.

7.2.5 DERIVATIZACIÓN

Debido a que la concentración de FITC se encuentra en menor proporción que las poliaminas, se aumentó la concentración del FITC, para asegurar que se tienen cantidades similares de FITC y de cada una de las poliaminas al llevarse a cabo la reacción, para ello se preparó una solución de FITC 2.5×10^{-3} M en acetona y los estándares de las poliaminas se prepararon en una concentración de 1×10^{-4} M en buffer de boratos 20 mM pH 10. La derivatización de los estándares se realizó tomando 100 μ L de cada solución estándar, adicionando 10 μ L de la solución de FITC y se llevó a un volumen total de 1 ml con buffer de boratos 20 mM (pH 10). Un electroferograma a estas condiciones se muestra en la Figura 20, en la cual observamos que putrescina tiene

un solo pico, en el caso de espermidina y espermina se tienen 3 y 4 respectivamente, estos picos corresponden a diferentes grados de derivatización. Debido a que en su estructura espermidina tiene tres grupos amino disponibles y espermina cuatro se observan este numero de picos ya que spd y spm pueden reaccionar con una, dos, tres o cuatro moléculas de FITC. En este electroferograma se tiene también un exceso de FITC, ya que se observan picos que corresponden a este compuesto.

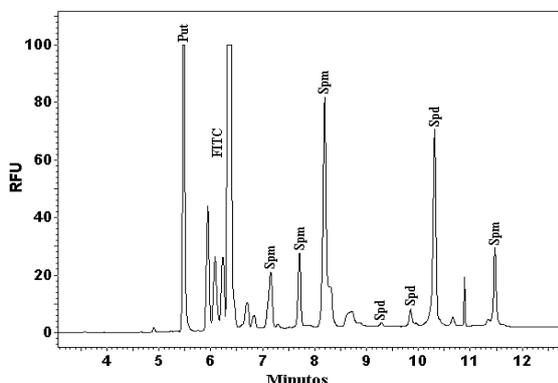


Figura 20. Electroferograma de estándares de poliaminas derivatizadas. Boratos 20 mM, pH 9.5, SDS 50 mM, 30 kV. [put]= [spd]= [spm]= 5×10^{-7} M, [FITC] = 1.25×10^{-6} M.

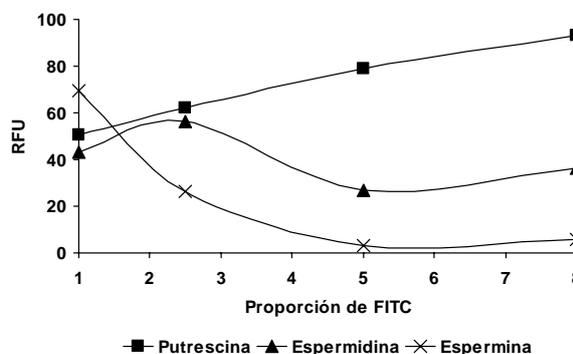


Figura 21. Variación de la cantidad de FITC. Buffer de boratos 20 mM, pH 9.5, SDS 50 mM, 30 kV.

7.2.6 CONDICIONES DE LA DERIVATIZACIÓN

La intensidad de la señal o respuesta al detector depende de la concentración de FITC, la derivatización de las poliaminas se realizó utilizando 4 diferentes proporciones de Poliaminas:FITC (1:1, 1:2.5, 1:5, 1:8), se utilizó la solución stock de FITC de 2.5×10^{-3} M preparada en acetona y se mantuvo constante la concentración de las poliaminas en 1×10^{-4} M, preparadas en un buffer de boratos 20 mM a pH 10 (Figura 21).

Los resultados muestran que la sensibilidad máxima en la detección de putrescina se da utilizando una proporción 1:8 (Poliaminas: FITC), para el caso de espermidina se observa un máximo en la proporción 1:2.5 y para el caso de espermina, la proporción 1:1 es la adecuada. Se decidió utilizar una proporción 1:2.5, ya que en esta proporción tenemos buena respuesta al detector para los tres compuestos y también tenemos un exceso de FITC; estudios previos indican que, generalmente, excesos del reactivo derivatizante deben ser aplicados para un análisis cuantitativo de las poliaminas, especialmente para las poliaminas que contienen dos o más grupos amino, aunque, los picos debidos al exceso del reactivo fluorescente pueden interferir en la identificación, separación y determinación de los analitos; se ha encontrado también que las aminas derivatizadas son menos estables cuando se utilizan concentraciones altas del reactivo derivatizante [55]. Estos estudios mostraron también un incremento en la respuesta al detector (límites de detección bajos) con un incremento en la concentración del reactivo fluorescente, estos estudios no son coherentes con los encontrados en este estudio, para el caso de spm y spd aunque sí coinciden para el caso de put. Sin embargo, esos estudios se hicieron tomando un solo aminoácido y en nuestro caso se tomaron las tres poliaminas juntas.

7.2.7 CINÉTICA DE LA REACCIÓN

Posteriormente se hizo un estudio del efecto del tiempo de reacción entre las poliaminas y el FITC (Figura 22).

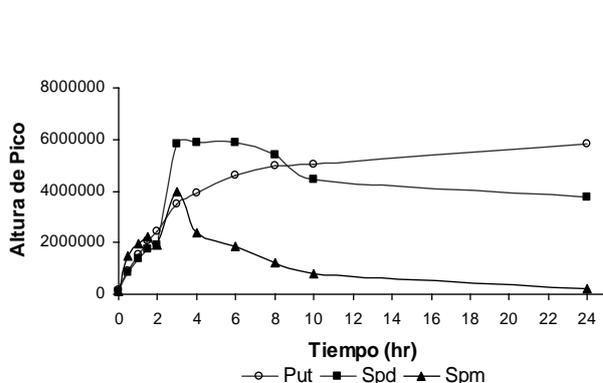


Figura 22. Efecto del tiempo de reacción sobre la formación de los derivados. Boratos 20 mM, pH 9.5, SDS 50 mM, 30 kV.

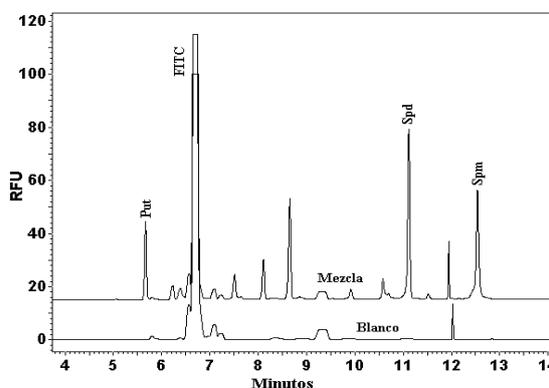


Figura 23. Electroferograma en las condiciones óptimas. Boratos 20 mM, pH 9.5, SDS 50 mM, 30 kV, 25 °C. Concentración de cada poliamina 2.5×10^{-7} M

En la Figura 22 se observa que se la eficiencia de la derivatización de las poliaminas incrementa con el tiempo para el caso de putrescina y espermidina, alcanzando un máximo para a las 3 horas después de haber realizado la reacción; para el caso de putrescina el máximo se da a partir de las 10 horas. Se decidió trabajar con un tiempo de derivatización de 3 horas antes de introducir las muestras al equipo de electroforesis capilar, pues es cuando se maximiza la señal para los tres analitos de interés.

7.2.8 CONDICIONES ÓPTIMAS DE LA DERIVATIZACIÓN.

Una vez realizado la variación de FITC y la cinética de la reacción se establecieron las condiciones óptimas de la derivatización, las cuales son: tomar 100 μ L de cada solución estándar (en una concentración de 1×10^{-4} M preparadas en un buffer de boratos 20 mM pH 10), adicionando 30 μ L de la solución de FITC (2.5×10^{-3} M) para llevar a un volumen total de 1 ml con búfer de boratos 20 mM (pH 10). La solución anterior se guardó durante un periodo de 3 h protegiendo de la luz y a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla de estándares derivatizados se diluye con buffer de boratos 20 mM (pH 10) antes de su inyección y son introducidas al equipo por inyección hidrodinámica aplicando 0.5 psi de presión durante 5 s (Figura 23). Para la cuantificación se tomaran en cuenta los picos que presentan una mejor respuesta al detector, los cuales se indican en dicha figura.

7.3 LÍMITES DE DETECCIÓN.

Los límites de detección en los dos métodos desarrollados fueron calculados basándose en una relación señal/ruido igual a 3 y estos se muestran en la **Tabla II**.

Tabla II. Límites de detección de las poliaminas.

Compuesto	Cloruro de benzoilo L.D. (ppm)	FITC L.D. (ppb)
Putrescina	0.5189	12.682
Espermidina	11.469	0.9367
Espermina	18.640	19.817

7.4 APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

Una vez determinados los parámetros de separación se procedió a la aplicación a muestras reales. De los dos métodos desarrollados se eligió el segundo debido a que presenta mejores límites de detección. Sin embargo, la aplicación a muestras tanto de mango (pulpa y piel) como de plasma presenta dificultades debido a la interferencia de señales de compuestos que contienen grupos amino en su estructura, los cuales reaccionan con el FITC o de otras impurezas que migran cerca de los tiempos de migración de los analitos de interés (Figura 24).

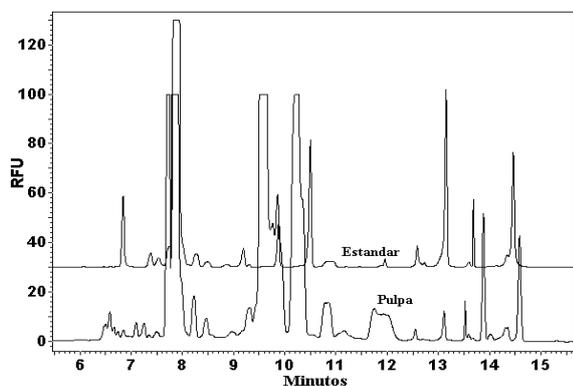


Figura 24. Electroferograma de pulpa de mango y estándar. Boratos 20 mM, pH 9.5, SDS 50 mM, 30 kV, 25 °C.

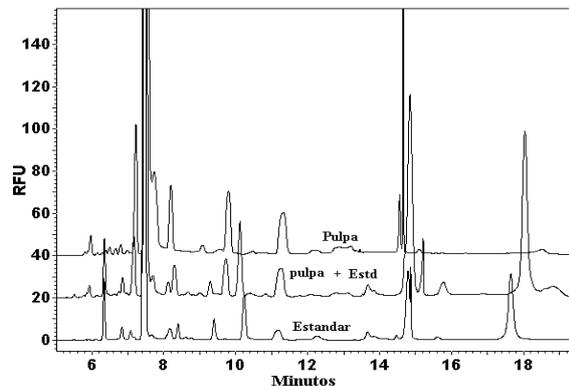


Figura 25. Electroferograma de pulpa de mango. Boratos 20 mM, pH 9.5, SDS 70 mM, 30 kV, 25 °C.

Se hicieron algunas modificaciones para tratar de eliminar o disminuir estas interferencias. Para el caso de las muestras de mango, inicialmente se cambió la concentración del buffer de boratos de 20 mM, a concentraciones de 30, 40 y 60 mM, pero la putrescina no se logró resolver, además de que tanto el tiempo de análisis como la corriente se incrementaron a medida que aumentó la concentración de boratos. Se probó también cambiar el buffer de boratos por un buffer orgánico, de esta forma se pretendía disminuir la corriente generada y así poder utilizar concentraciones mayores de SDS para ver si se tenía una mejor separación, se utilizó CHES en una concentración constante de 60 mM (pH 9.5), 30 kV, la concentración de SDS inicialmente se utilizó en una concentración de 50 mM, en estas condiciones ni siquiera se logró una buena separación para los estándares; se aumentó la concentración de SDS a 100 mM, después se cambió la concentración de CHES a 80 mM, manteniendo la concentración de SDS en 100 mM, pero tampoco se logró una buena separación de los compuestos de interés. Posteriormente se decidió hacer extracciones líquido-líquido utilizando cloroformo y acetona, a diferentes valores de pH (3, 5, 7, 10 y 11), utilizando para la separación un Buffer de Boratos 20 mM, a pH 9.5 con SDS 50 mM, pero tampoco se obtuvieron resultados favorables, por lo que se decidió realizar una extracción pares de iones,

utilizando ácido dodecil bencen sulfónico como reactivo par ion [46]. Para ello, la muestra fue diluida 5 veces en un buffer de acetatos y el pH fue ajustado a 5, la muestra se paso a través de un cartucho C₁₈ (previamente acondicionado), 5 ml del eluato se mezclaron con 100 µL de la solución par-ion (100 mM) y ésta solución se paso por otro cartucho de C₁₈, este cartucho fue lavado con 3 mL del buffer de acetatos (pH 5) y secado en una corriente de N₂. Las aminos fueron eluidas con 3 mL de acetona, el solvente fue evaporado en la corriente de N₂ y la muestra fue disuelta en 1 mL de un buffer de boratos (pH 10). El extracto fue derivatizado con 10 µL de la solución de FITC [2.5×10^{-3} M] (Figura 25).

De la figura 25 puede observarse que no se obtuvieron los resultados esperados con la extracción en fase sólida y además de que el realizarse este procedimiento aumenta el tiempo de análisis, por lo que se decidió buscar otra alternativa para disminuir o evitar las interferencias mostradas en las muestras. En el caso de las muestras de plasma, la precipitación de proteínas se realizó utilizando acetona y acetonitrilo en proporciones 1:1, se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se separó y evaporó en una corriente de N₂, se resuspendieron en buffer de boratos 20 mM y se derivatizaron con la solución de FITC 2.5×10^{-3} M. Se obtuvieron mejores resultados precipitando las proteínas en acetonitrilo, aunque hubo interferencias utilizando el buffer de Boratos 20 mM, pH 9.5 con SDS 50 mM; se adicionaron disolventes en concentración del 5% v/v (acetonitrilo y metanol), pero no se logró una separación adecuada por lo que se cambió la concentración de SDS a 60, 70 y 80 mM, se obtuvieron mejores resultados con la adición de SDS 70 mM (datos no mostrados).

7.4.1 CONDICIONES ÓPTIMAS DE LA SEPARACIÓN

Finalmente se decidió añadir una ciclodextrina al buffer de separacion, se utilizo β-ciclodextrina en concentración 5 mM, con la que finalmente se logro una buena separacion de los compuestos de interés en muestras de mango. Las condiciones óptimas de la separacion para este método son: Buffer de boratos 20 mM a pH 9.5, con la adición de SDS 70 mM y con 5 mM de β-ciclodextrina, aplicando un voltaje de 30 kV (Figura 26).

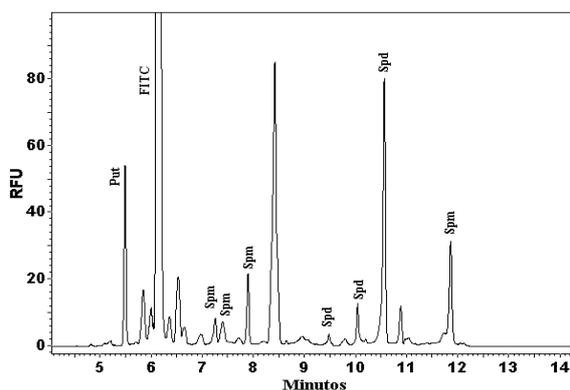


Figura 26. Condiciones óptimas de separación. Estándares de poliaminas [3×10^{-7} M]. Boratos 20 mM, pH 9.5, SDS 70 mM, β-CD 5 mM. 30 kV, 25 °C.

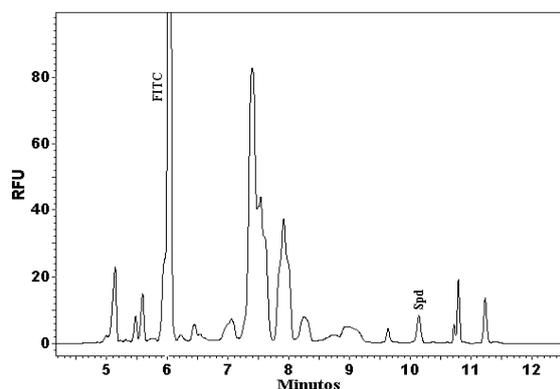


Figura 27. Electroferograma de poliaminas derivatizadas en pulpa de mango. Condiciones de la separación iguales a las de la Figura 26

7. Resultados y discusión

Para demostrar la utilidad del método en muestras reales, este método se aplicó a muestras de mango y a muestras de plasma, el tratamiento de las muestras se indicó en la *sección 6.4.2* y la *sección 6.4.3*, las poliaminas presentes en las muestras fueron identificadas por adición de estándares y electroferogramas representativos para ambos tipos de muestras se muestran en las Figuras 27, 28 y 29.

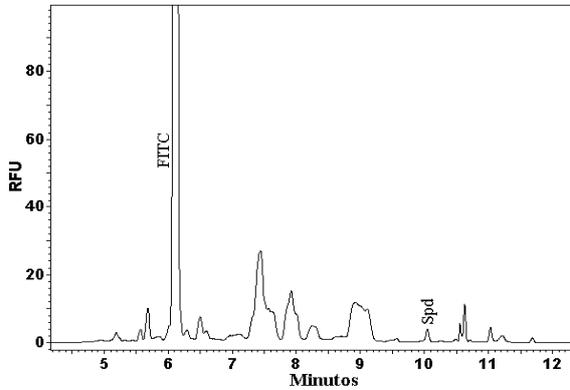


Figura 28. Electroferograma de poliaminas derivatizadas en piel de mango. Condiciones de la separación iguales a las de la Figura 26.

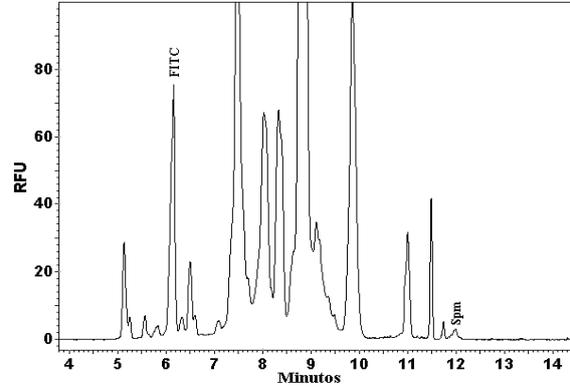


Figura 29. Electroferograma de poliaminas derivatizadas en plasma de una persona sana. Condiciones de la separación iguales a las de la figura 26.

8. CONCLUSIONES

- Los métodos propuestos ofrecen una excelente resolución de la mezcla de las tres poliaminas derivatizadas tanto con Cloruro de Benzoilo como las derivatizadas con FITC.
- Los métodos son sencillos y el paso de la derivatización es muy simple.
- Las condiciones óptimas para el primer método fueron: Buffer de boratos 20 mM a pH 9 con la adición de SDS 10 mM, aplicando un voltaje de 30 kV y a 25°C. y para el segundo se dieron utilizando un buffer de boratos 20 mM a pH 9.5, SDS 70 mM, 5 mM de β -ciclodextrina, aplicando un voltaje de 30 kV y a 25°C.
- Los límites de detección determinados se encuentran alrededor de 1 ppm para el en el que se utilizo cloruro de benzoilo como reactivo derivatizante y de 1 a 2 ppb para el método en donde se utilizo FITC, por lo que este ultimo ofrece una mayor sensibilidad.
- La derivatización utilizando FITC como reactivo fluorescente tiene la limitación de que reacciona con compuestos que tienen grupos amino en las muestras (i.e. aminoácidos), esto ocasiona que aparezcan señales adicionales que pueden interferir en el análisis de los compuestos de interés, sin embargo, con ligeras modificaciones al método se logro identificar tanto en plasma de pacientes sanos, como en muestras de mango los compuestos de interés.
- El método desarrollado en éste trabajo será aplicado en un futuro cercano en el monitoreo del posible aumento en la concentración de poliaminas en muestras de plasma de pacientes con cáncer, con el fin de evaluar su utilidad como marcadores del avance o control de esta enfermedad.
- De la misma forma la variación en los niveles de poliaminas serán evaluados en mangos sometidos a tratamientos con calor en un trabajo posterior, esto con la finalidad de estudiar si existe una relación del cambio en los niveles de estos compuestos y el estrés por frío al cual son sometidos estos frutos.

9. PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS

- En próximos experimentos deberán hacerse estudios de recobro del procedimiento de extracción de las muestras, además de continuar con el estudio de algún método de limpieza y/o preconcentración que permita eliminar o disminuir los excesos de FITC y otros compuestos interferentes.
- Se debe completar la evaluación de los métodos realizando su Validación.
- Los métodos desarrollados serán aplicados en un futuro inmediato a la determinación de poliaminas en Mangos ya que ayudaran a seleccionar el tratamiento térmico mas adecuado para disminuir los daños por frío y con ello alargar la vida de anaquel de este producto, manteniendo su calidad.
- Los métodos desarrollados también podrán ser aplicados a muestras de pacientes con algún tipo de cáncer y con ello se evaluara la eficiencia de los diversos tratamientos terapéuticos en dichos pacientes.
- El contar con una metodología que permita evaluar el tratamiento adecuado para disminuir los daños por frío producidos en Mangos al ser almacenados, permitirá alargar la vida de anaquel de este producto, por lo que resulta de una gran importancia económica para nuestro país, ya que con ello se disminuirían las pérdidas ocasionadas por los tratamientos postcosecha, permitiendo con ello elevar el número de exportaciones y así mismo llegar a otro tipo de mercados.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Paproski, R. E., Roy, K. I., Lucy, C. A. Lucy. 2002. Selective fluorometric detection of polyamines using micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, **946**, 265–273.
2. Eliassen, K. A., Reistad, R., Risøen, U., Rønning, H. F. 2002. Dietary polyamines. *Food Chemistry*, **78**, 273–280.
3. Khuhawar, M.Y., Qureshi, G.A. 2001. Review: Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. *Journal of Chromatography B*, **764**, 385–407.
4. Lester, G.E. 2000. Polyamines and their cellular anti-senescence properties in honey dew muskmelon fruit. *Plant Science*, **160**, 105–112.
5. Kalač, P., Krausová, P. 2005. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods, *Food Chemistry*, **90**, 219-230.
6. Shalaby, A. R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, **29**, 675–690.
7. Liu, G., Chen, J., Ma, Y. 2004. Simultaneous determination of catecholamines and polyamines in PC-12 cell extracts by micellar electrokinetic capillary chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography B*, **805**, 281–288.
8. Muskiet, F.A.J., Dorhout, B., Van de Berg, G.A., Hesels, J. 1995. *Journal of Chromatography B*, **667**, 89.
9. Khuhawar, M.Y., Memon, A.A., Bhangar, M.I. 1999. *Journal of Chromatography B*, **723**, 17.
10. Romero, R., Gazquez, D., Bagur, M.G., Sanchez-Vinas, M. 2000. *Chromatographia*, **51**, 404.
11. Romero, R., Gazquez, D., Bagur, M.G., Sanchez-Vinas, M. 2000. Optimization of chromatographic parameters for the determination of biogenic amines in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **871**, 75-83.
12. Busto, O., Guasch, J., Borrull, F. 1996. Determination of biogenic amines in wine after precolumn derivatization with 6-aminoquinolyll-N-hydroxysuccinimidyl carbamate J. Chromatogr. A **737**, 205-213.
13. Bilic, N. 1996. Rapid identification of biogenic amine-producing bacterial cultures using isocratic high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **719**, 321.

14. Shimada, K., Oe, T., Tanaka, M., Nambara, T. 1989. *Journal of Chromatography*, **487**, 247.
15. Seiler, N., Knodgen, B. 1980. *Journal of Chromatography*, **221**, 227.
16. Kovacs, A., Simon-Sarkadi, L., Ganzler, K. 1999. Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **836**, 305-313.
17. Oguri, S., Watanabe, S., Abe, A. 1997. Determination of histamine and some othersamines by HPCE with on-line mode in-capillary derivatization. *Journal of Chromatography A*, **790**, 177-183.
18. Male, K. B., Luong, J.H.T. 2001. Derivatization, stabilization and detection of biogenines by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, **926**, 309-317.
19. Lange, J., Thomas, K., Wittmann, C. 2002. Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *Journal of Chromatography B*, **779**, 229-239.
20. Rodriguez, I., Lee, H.K., Li, S.F.Y. 1996. Separation of biogenic amines by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, **745**, 255-262.
21. Liu, X., Yang, L.-X., Lu, Y. T. 2003. Determination of biogenic amines by 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, **998**, 213-219.
22. Nouadje, G., Nertz, N., Verdeguer, P., Couderc, F. 1995. Ball-lens laser-induced fluorescente detector as an easy-to-use highly sensitive detector for capillary electrophoresis application to the identification of biogenic amines in dairy products. *Journal of Chromatography A*, **717**, 335-343.
23. Waterval, Joop C.M, Lingeman H, Bult A, Underberg, Willy J.M. 2000. Derivatization trends in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **21**, 4029-4045.
24. Lurie, S., Laamim, M., Lapsker, Z., Fallik, E. 1997. Heat treatments to decrease chilling injury in tomato fruit. Effects on lipids, pericarp lesions and fungal growth. *Physiologia Plantarum*, **100**, 297-302.
25. Wang, C. Y. 1993. Relation of chilling stress to polyamines in zucchini squash. *Acta Horticulturae*, **343**, 288-289.
26. Oguri, S. 2000. Review: Electromigration methods for amino acids, biogenic amines and aromatic amines. *Journal of Chromatography B*, **747**, 1-19.

27. Páez, X., Hernández, L. 2001. Review: Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, **22**, 273–289.
28. Castillo R., M. A. Desarrollo de un programa en ambiente multimedia sobre electroforesis capilar. Tesis de licenciatura, FES-Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, Edo. De Méx. 2001. 128p.
29. Weston, A., Brown, P. R. 1997. HPLC and CE principles and practice. Academic press. USA. Pp. 193-202
30. Blanc, T., Schaufelberger, D. E., Guzman, N. A. 1997. Capillary Electrophoresis. Analytical Instrumentation Handbook. Galen Wood Ewing. Pp. 1351-1431.
31. Chankvetadze, B. 1997. Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis. John Wiley and Sons. England. Pp 30-40, 40-46.
32. Ochoa Rojas, M. C., Leal Guadarrama, L. I., Méndez, J. D. 2002. Papel de las poliaminas en la inmunosupresión. *Rev Med IMSS*, **40** (1), 77-83
33. Gugliucci, A. 2004. Review. Polyamines as clinical laboratory tools. *Clinica Chimica Acta*, **344**, 23–35.
34. Valero, D., Martínez-Romero, D., Serrano, M. 2002. The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit. *Trends in Food Science & Technology*, **13**, 228–234.
35. Giovannoni, J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, **52**, 725–749.
36. Pandey, S., Ranade, S. A., Nagar, P. K., Kumar, N. 2000. Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *Journal of Bioscience*, **25**, 291–299.
37. Calvo Guillen, R., Gonzalez Aguilar, S. 2004. Plan rector del sistema producto Mango. Fomento economico de Chiapas A.C. pp 78.
38. McCollum, T. G., McDonald, R. E. 1993. Tolerance of cucumber fruit to immersion in heated water and subsequent effects on chilling tolerance. *Acta Horticulturae*, **343**, 233-237.
39. Medina, M. A., Rodríguez Quesada, A. Nuñez de Castro, I., Sanchez Jiménez, F. 1999. Histamine, Polyamines, and Cancer. *Biochemical Pharmacology*, **57**, pp. 1341–1344.
40. Cipolla B. G., Ziade, J., Bansard, J. Y., Moulinoux, J. P., Staerman, F., Quemener, V. 1996. Pretherapeutic erythrocyte polyamine spermine levels discriminate high risk relapsing patients with M1 prostate carcinoma. *Cancer*, **78** (5), 1055–1065.

41. El-Salahy, E. M. 2002. Correlation between polyamines and apoptosis among Egyptian breast cancer patients. *Clinical Biochemistry*, **35**, 550–560.
42. Bergeron, C., Bansard, J.Y., Le-Moine, P., Bouet, F., Goasguen, J.E., Moulinoux, J.P., Le-Gall, E., Catros-Quemener, V. 1997. Erythrocyte spermine levels: a prognostic parameter in childhood common acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*, **11**, 31-36.
43. Suh, J. W., Lee, S. H., Chung, B. C., Park, J. 1997. Urinary polyamine evaluation for effective diagnosis of various cancers. *Journal of Chromatography B*, **688**, 179-186.
44. Kryzek, M., Pelikanova, T. 1998. Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, **815**, 243-250.
45. Taibi, G., Schiavo, M.R., Calanni P., Muratore, Rindina, R., Nicotra, C.M.A.. 2001. Micellar Electrokinetic chromatography of polyamines and monoacetylpolyamines. *Journal of Chromatography A*, **921**, 323-329.
46. McWhorter, S., Soper, S. A., 2000. *Electrophoresis*, **21**, 1267–1280.
47. Dabek-Zlotorzynska, E., Maruszak, W. 1998. Determination of dimethylamine and other low-molecular-mass amines using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, **714**, 77-85.
48. Rodriguez, I., Lee, Hian Kee., F.Y.Li., Sam 1999. ion-pair solid-phase extraction of biogenic amines before micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescent detection of their fluorescein thiocarbamyl derivatives. *Electrophoresis*, **20**, 1862-1868
49. Molina, Manuel., Silva, Manuel. 2002. In-capillary derivatization and analysis of amino acids, amino phosphonic acid-herbicides and biogenic amines by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, **23**, 2333–2340.
50. Nouadje, G., Simeon, N., Dedieu, F., Nertz, M., Puig, Ph., Couderc, F. 1997. Determination of twenty eight biogenic amines and amino acids during wine aging by micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, **765**, 337-343.