



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**COMPARACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS DE
WESTERN BLOT Y HPLC**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

Fátima Isabel Vázquez Mayo

ASESORA:

Dra. Jazmín Flores Monroy

COASESORA:

M. en C. Diana Ramírez Hernández

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**



**UNAM
CUAUTITLÁN**

DEPARTAMENTO

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDEPECUÑA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

Comparación entre las técnicas de Western Blot y HPLC.

Que presenta la pasante: **Fátima Isabel Vázquez mayo**

Con número de cuenta: **315101407** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Febrero de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Enrique Ramos López	
VOCAL	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
SECRETARIO	Dra. Jazmín Flores Monroy	
1er. SUPLENTE	Q. Karla Paola Hernández Pérez	
2do. SUPLENTE	Dr. Diego Lezama Martínez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga*

Dedicatoria

A todas aquellas personas que creyeron en mí, que estuvieron al pendiente tanto de mi vida personal como académica (¡ya concluí la licenciatura, sí se pudo!), que me alentaron a seguir adelante y me enseñaron a nunca darme por vencida por más difícil que fuera el camino, y que siempre, siempre me dieron su apoyo y cariño incondicional. Hoy por hoy, estoy aquí gracias a ustedes.

Agradecimientos

A Dios, Principio Supremo de todas las cosas, por darme la vida, por ser mi consuelo y fortaleza en los momentos en los que pensaba que no podía seguir avanzando. Gracias por todos y cada uno de los talentos y virtudes otorgadas que me han ayudado a lo largo de mi trayectoria.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por haberme dado los mejores años de mi vida, lugar en el que cultivé amistades increíbles y aprendizajes que no solo serán útiles en la vida laboral sino también en la personal.

A los proyectos CI2211 FES Cuautitlán, PAPIIT IN2022, PAPIIT IN217122 y CONACYT A1-S8958.

A mis padres, Mónica y Gilberto, por siempre cuidarnos y velar por nuestro bienestar aún a costa del suyo, por cada sacrificio que han hecho por darnos a Dani y a mí una buena educación, casa, comida y sustento; nos han dado lo necesario y suficiente para empezar a volar por nosotros mismos. Gracias por ser mis guías y mi “red” cuando sentía que había saltado al vacío, por enseñarme a expresar mis pensamientos, dudas y emociones pues compartiéndolas y pidiendo opinión y consejos es como realmente he crecido como persona. Y muchas gracias por abrazarme, recordarme lo valiosa que soy y por quedarse a mi lado cuando me siento estancada. ¡Los amo con cada célula de mi ser! Papá, tú fuiste la persona principal que me motivó a realizar una tesis, y Mamá, tú fuiste quien me motivó a terminar lo que empecé, aquí está la huella que dejó en mi Universidad.

A mi hermano Daniel, mi compañero de aventuras y cómplice de travesuras, gracias por siempre estar para mí dándome ánimos a través de abrazos y consejos; cada plática que hemos tenido me demuestra la enorme confianza que tenemos entre los dos y no sabes lo mucho que atesoro esto, te quiero un montón Chompi.

A mis abuelitos, tíos y primos que en cada oportunidad que tuvieron se interesaron por mi carrera y nunca se aburririeron de escucharme hablar sobre todo lo que hacía y aprendía, gracias por alentarme a seguir estudiando, a conseguir mis objetivos y, sobre todo, por encomendarme a Dios en cada una de sus oraciones, ¡sin duda alguna son mi motor y felicidad!

A Rafa, mi mejor amigo desde que nos conocimos en primer semestre y quien poco a poco se volvió alguien importante en mi vida ♡. Gracias por todos estos años juntos, por explicarme pacientemente cuando no entendía alguna cosa, por acompañarme en mis alegrías, mis tristezas y mis frustraciones, por compartirme de tu optimismo y enseñarme a ver mis problemas como un reto a vencer; sin ti no hubiera disfrutado tanto la carrera, te amo.

A Chucho, un amigo único y muy especial que atesoro con todo el corazón, siempre tan risueño, servicial y amable, hiciste de mis días de universidad los más divertidos y gratificantes, disfruté mucho poder aprender a tu lado cada que coincidimos en las clases, sé que puedo seguir contando contigo en todo momento.

A Rosa Areli, mi mejor amiga que siempre me apoyó, hoy más que nunca sé que a pesar del tiempo y la distancia podemos contar la una con la otra, te quiero muchísimo.

A la doctora Jazmín, una persona increíble, amable y atenta que me guió y apoyó durante la realización de este trabajo. Nunca olvidaré aquel día en el laboratorio en el que me alentó a no tener miedo de intentar cosas nuevas, “aventarme” y fallar una, dos, tres veces, pues de los errores aprendemos; gracias por depositar su confianza en mí.

A la M. en C. Diana Ramírez, por abrirme las puertas del Laboratorio de Farmacología del Miocardio.

Al M. en C. Enrique Ramos, Dr. Salvador Fonseca, Q. Karla Hernández y Dr. Diego Lezama que me ayudaron a mejorar y enriquecer la tesis.

Índice

Índice de figuras.....	9
Índice de tablas	10
Abreviaturas	11
Introducción	14
Objetivo.....	16
Metodología.....	16
Marco Teórico.....	17
Capítulo 1. Western Blot.....	17
1.1 Historia.....	17
1.2 Concepto y características del Western Blot	23
1.3 Preparación de la muestra.....	25
1.3.1 Extracción de proteínas	25
1.3.2 Cuantificación de proteínas por Bradford.....	26
1.3.3 Desnaturalización de las proteínas	28
1.4 PAGE-SDS	29
1.5 Blotting.....	32
1.5.1 Tipos de membranas para la transferencia.....	34
1.5.2 Sistemas de transferencia a la membrana	36
1.5.2.1 Transferencia húmeda.....	36
1.5.2.2 Transferencia semiseca	36
1.6 Inmunodetección.....	37
1.6.1 Bloqueo de la membrana.....	37
1.6.1.1 Agentes de bloqueo	37
1.6.2 Anticuerpo Primario (Ac 1°)	38
1.6.3 Anticuerpo Secundario (Ac 2°)	39
1.6.4 Sondeo de la membrana con anticuerpos	40
1.6.5 Consideraciones de los antisueros	42

1.6.5.1 Optimización de las condiciones de trabajo.....	42
1.6.5.2 Policlonal vs monoclonal.....	43
1.6.5.3 Selección de antisueros.....	44
1.6.6 Detección por Quimioluminiscencia Indirecta.....	46
1.6.6.1 Fundamento.....	46
1.6.6.2 Métodos de detección.....	46
1.7 Presente y futuro del Western Blot.....	48
Capítulo 2. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).....	49
2.1 Historia.....	49
2.2 Breve introducción a la cromatografía.....	53
2.3 Generalidades.....	54
2.4 Principios.....	54
2.5.1. Bombas.....	55
2.5.2 Inyector.....	56
2.5.3 Columna.....	57
2.5.4 Detectores.....	57
2.5.5 Procesador de datos.....	59
2.6 Desarrollo y optimización de la técnica.....	60
2.6.1 Establecimiento de los objetivos.....	60
2.6.2 Recopilación de información relacionada con el analito.....	61
2.6.3 Preparación de la muestra.....	61
2.6.3.1 Disolución.....	62
2.6.3.2 Precipitación.....	62
2.6.3.3 Filtración.....	63
2.6.3.4 Extracción líquido-líquido.....	63
2.6.3.5 Extracción en fase sólida.....	64
2.6.3.6 Derivatización.....	65
2.6.4 Selección del tipo de HPLC y modalidad de trabajo.....	66
2.6.5 Selección de la fase móvil y fase estacionaria.....	69

2.6.6 Selección del sistema de detección cromatográfico.....	71
2.6.7 Relevancia de soluciones adicionales que participan en el análisis	73
2.7 HPLC acoplada a otras técnicas	74
2.7.1 HPLC acoplada a Espectrometría de Masas.....	74
2.7.2 Principios.....	74
2.7.3 Instrumentación.....	75
2.7.3.1 Interfaz / Fuente de ionización	77
2.7.3.1.1 Ionización por Electropulverización (ESI)	78
2.7.3.1.2 Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI)	80
2.7.3.1.3 Fotoionización a Presión Atmosférica (APPI).....	82
2.7.3.2 Analizador de masas	85
2.7.3.2.1 Analizador de Cuadrupolo (Q)	85
2.7.3.2.2 Analizador de Trampa de Iones (IT)	86
2.7.3.3 Detector	88
2.7.3.3.1 Caja de Faraday.....	89
2.7.3.3.2 Multiplicador de electrones.....	90
2.7.4 Aplicaciones	90
2.7.5 Espectrometría de masas en tándem, ¿qué es y por qué se volvió tan popular?	91
2.8 Presente y futuro de la HPLC	95
Capítulo 3. Comparación entre las técnicas Western Blot y HPLC	96
Conclusiones.....	100
Referencias.....	101

Índice de figuras

Figura 1. Aparato de Tiselius	17
Figura 2. Electroforesis de disco.....	18
Figura 3. Similitudes y diferencias entre Southern, Northern y Western Blot	21
Figura 4. Procedimiento del Western Blot.....	24
Figura 5. Ensayo de Bradford	27
Figura 6. Sistema de PAGE-SDS	31
Figura 7. Sistema de transferencia en Western	33
Figura 8. Bloqueo de la membrana.....	38
Figura 9. Reconocimiento del epítipo de la proteína diana por parte del anticuerpo primario ..	39
Figura 10. Unión del anticuerpo secundario al fragmento cristalizable (Fc) del anticuerpo primario	40
Figura 11. Incubación de anticuerpo primario y secundario	41
Figura 12. Ejemplo de ficha de datos de un anticuerpo	45
Figura 13. Procedimiento de Quimioluminiscencia Indirecta.....	47
Figura 14. Componentes básicos que constituyen un equipo de HPLC.....	55
Figura 15. Proceso de preparación de muestras para HPLC.....	62
Figura 16. Tipos de cromatografía líquida en función del peso molecular y polaridad del analito de estudio.....	68
Figura 17. Ionización y especies ionizadas que se pueden detectar en MS.....	75
Figura 18. Partes que conforman un sistema LC-MS	76
Figura 19. Métodos de ionización	77
Figura 20. Esquema de ESI.....	79
Figura 21. Mecanismo de ionización en ESI	79
Figura 22. Esquema de APCI	81
Figura 23. Ejemplo de reacción ión-molécula que ocurre en APCI	81
Figura 24. Esquema de APPI	83

Figura 25. Ionización directa y con agentes dopantes en APPI	83
Figura 26. Métodos de Ionización a Presión Atmosférica (API) y su rango de aplicación	84
Figura 27. Esquema de un analizador de Cuadrupolo	86
Figura 28. Esquema de analizador de Trampa de Iones.....	87
Figura 29. Esquema de un espectrómetro de masas en tándem	92

Índice de tablas

Tabla 1. Componentes comunes empleados en el buffer de lisis para Western Blot.....	26
Tabla 2. Composición del tampón de carga para Western Blot	29
Tabla 3. Electroforesis en condiciones no reductoras o no desnaturizantes	32
Tabla 4. Membranas comúnmente utilizadas para la transferencia Western.....	35
Tabla 5. Anticuerpos policlonales vs monoclonales	44
Tabla 6. Métodos de detección quimioluminiscentes usados en Western Blot	47
Tabla 7. Propiedades de los detectores de HPLC.....	59
Tabla 8. Rango de dimensiones de partículas separadas por presión mecánica	63
Tabla 9. Principales empacamientos químicos, tipo de cromatografía y modalidad de trabajo que suelen utilizarse en HPLC	71
Tabla 10. Resumen de los procesos de ionización y propiedades de los analitos requeridos en los métodos de Ionización a Presión Atmosférica (API).....	84
Tabla 11. Comparación entre Western Blot y HPLC	96

Abreviaturas

2D: Segunda dimensión	CI: Ionización química
3D: Tercera dimensión	Cl: Cloruro
A: Amperes	CID: Disociación inducida por colisión
Å: Armstrong	cm: Centímetros
aa: Aminoácidos	CN: Ciano
Ac: Anticuerpo	CONH₂: Amida
APCI: Ionización química a presión atmosférica	COOH: Ácido carboxílico
API: Ionización a presión atmosférica	CsSb: Antimonio de cesio
APPI: Fotoionización a presión atmosférica	Cu: Cobre
Be: Berilio	DNA: Ácido desoxirribonucleico
BE: Sector magnético	DTT: Ditioneitol
BeO: Óxido de berilio	e⁻: Electrón
BSA: Albúmina de suero bovino	ECL: Quimioluminiscencia mejorada
C₁: Trimetilsililo	EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
C₄: Butilo	EE⁺: Ion con número par de electrones
C₆: Hexilo	EGTA: Ácido egtazico
C₈: Octilo	EI: Impacto de electrones
C₁₈: Octadecilsilano	ESI: Ionización por electropulverización
CBB: Azul de Coomassie brillante	eV: electroVolt
CC: Corriente continua	FA: Fosfatasa alcalina
CCD: Dispositivos de carga acoplada	FAB: Bombardeo con átomos rápidos
CH₃NH₂: Metilamina	Fc: Fragmento cristalizabile
	FD: Desorción por campo

fg: Femtogramos

FI: Ionización por campo

FTIR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

GaP: Fósforo de Galio

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HCl: Ácido clorhídrico

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución

hr: Hora

HRP: Peroxidasa de rábano picante

hv: energía de onda

IF⁺: Ion fragmentado

IP⁺: Ion precursor

IR: Infrarrojo

IT: Trampa de iones

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

kDa: kiloDaltons

kHz: kiloHertz

Kr-DC: Descarga de corriente continua de kriptón

Kr-RF: Radiofrecuencia de kriptón

kV: kiloVolt

LC-MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

LC-MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

LD: Desorción por láser

M: Molar

M: Molécula

M^{+•}: Cation radical

MALDI: Desorción láser asistida por matriz

mbar: milibar

MCE: Electroforesis capilar y de microchip

mg: Miligramos

MHz: MegaHertz

mL: Mililitros

mM: Milimolar

mm: Milímetros

MS: Espectrómetro de masas

m/z: masa/carga

N₂: Nitrógeno molecular

N: Nueva molécula

NaCl: Cloruro de sodio

NAF: Mesilato de nafamostat

NC: Nitrocelulosa

NICI: Ionización química de iones negativos

nm: Nanómetros

NMR: Resonancia magnética nuclear

ng: Nanogramos

NH₂: Amino

NH(CH₃)₂: Dimetilamina

NR₄: Amina cuaternaria

OE^{••}: Nuevo catión radical

(OH)₂: Diol

Pa: Pascal

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS: Tampón fosfato salino

PD: Desorción por plasma

PEEK: Polietereetercetona

PFP: Pentafluorofenilo

pg: picogramos

PPI: Inhibidores de proteasas y fosfatasa

PT: Proteínas totales

PVDF: Difluoruro de polivilideno

Q: Cuadrupolo

Q₁: Primer cuadrupolo

Q₂: Segundo cuadrupolo

Q₃: Tercer cuadrupolo

QqIT: Cuadrupolo – trampa de iones

QqQ: Triple cuadrupolo

RF: Radiofrecuencia

RIBA: Ensayo de inmunotransferencia recombinante

RNA: Ácido ribonucleico

SDS: Dodecil sulfato de sodio

Ser: Serina

SO₃: Ácido sulfónico

TBST: Tampón tris salino con Tween-20

TDCS: Recubrimiento directo de película delgada con succión

Thr: Treonina

TOF: Tiempo de vuelo

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

Tris-HCL: Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano

Tritón: Polioxietilen octil fenil éter

UHPLC: Cromatografía líquida de ultra alta resolución

UV: Ultravioleta

V: Volt

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

vs: Versus

WB: Western blot

Introducción

A mediados del siglo pasado, el campo de la investigación científica se vio obstaculizado en la generación de nuevos conocimientos, pues se necesitaban nuevas tecnologías y metodologías que permitieran la obtención de resultados muchos más exactos optimizando, al mismo tiempo, los recursos y tiempos invertidos. Es así como en la década de 1960 y 1970 surgieron dos técnicas que marcarían una diferencia en los métodos de separación y análisis de muestras de interés: el Western Blot y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución o *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Por una parte, el Western Blot es una técnica para el estudio selectivo de la expresión de proteínas, fundamentada en los principios de carga uniforme, separación por peso molecular, transferencia electroforética a una membrana adecuada y sondeo con anticuerpos (Gavini & Parameshwaran, 2020), siendo útil cuando se quiere conocer si la proteína de estudio se encuentra presente en un tejido o si su presencia se asocia o no a una patología, por dar algunos ejemplos (Veiga, 2013).

Por otra parte, la HPLC es un principio de medida que permite separar los componentes de una muestra (analitos) en función de su distribución en dos fases inmiscibles entre sí: una fase estacionaria (un sólido o un líquido adsorbido sobre un soporte sólido) y una fase móvil (un líquido), permitiendo la purificación, identificación y cuantificación del analito deseado, el cual puede estar contenido en compuestos químicos orgánicos e inorgánicos, o inclusive en muestras provenientes de un organismo (Rigo, et al., 2018; Reuhs & Rounds, 2009). Para este último tipo de muestras, los avances en HPLC han favorecido al área de las ciencias biológicas gracias a su acoplamiento con la espectrometría de masas que han logrado análisis cualitativos y cuantitativos mucho más precisos y selectivos.

Tanto fue el impacto y la gran aceptación de ambas técnicas que se siguen implementando hasta el día de hoy y de forma esencial en lugares que van desde laboratorios de docencia, investigación y diagnóstico hasta industrias químicas, farmacéuticas, alimenticias, entre otras. (Moldoveanu & David, 2013).

En el caso particular del Laboratorio de Farmacología del Miocardio perteneciente a la FES Cuautitlán, el Western Blot es una herramienta útil para el estudio de proteínas procedentes de muestras como plasma, aorta, corazón o riñón, sin embargo, con la limitante de obtener resultados semicuantitativos, en ocasiones se busca complementar los datos de los trabajos realizados a través del uso de un equipo de HPLC, pero para tomar la decisión de si es necesario

Llevar a cabo estas dos técnicas es de vital importancia tener en claro los objetivos que persigue el estudio así como la infraestructura o financiación con que cuenta el laboratorio ya que puede ser más que suficiente ejecutar sola una de las dos técnicas. Es por ello que en el presente trabajo se abordan las diferencias intrínsecas, características, ventajas, desventajas, condiciones de trabajo y aplicaciones que poseen tanto el Western Blot como la HPLC, con el objetivo de realizar una comparación de información entre ambos procedimientos para su puesta en práctica en el Laboratorio de Farmacología del Miocardio, de tal manera que sirva como guía para futuras decisiones que ayuden en la optimización de la(s) técnica(s) elegida(s) para trabajos de investigación, servicio social o tesis que se realicen en este lugar.

Objetivo

Recopilar información teórica de las técnicas de Western Blot y HPLC mediante una investigación bibliohemerográfica con la finalidad de realizar una comparación entre las principales características y consideraciones metodológicas entre ambas técnicas para su aplicación en el Laboratorio de Farmacología del Miocardio de la FES Cuautitlán.

Metodología

Se realizó una búsqueda bibliohemerográfica principalmente a través de las bases de datos PubMed, ScienceDirect y la Biblioteca digital UNAM. Como palabras clave se utilizaron “*Western Blot*”, “*Western Blotting*”, “Análisis de proteínas”, “*History of Western Blot*”, “*Liquid chromatography*”, “HPLC”, “Antecedentes históricos de HPLC”, “*Mass spectrometry*”, “Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas”, “*Liquid chromatography tandem mass spectrometry*” y “Química analítica”. Se seleccionaron aquellos artículos de revisión y libros publicados en inglés y español que abordaron las características más importantes de cada técnica (fundamento, procedimiento, materiales, equipo requerido, campo de aplicación). Para complementar la investigación también se recurrió a la consulta de guías y manuales de usuario de casas comerciales como BioRad, SHIMADZU y ThermoFisher que brindaron información sobre las consideraciones que se deben tomar en cuenta para la realización de cada técnica.

La temporalidad de los datos obtenidos va de los años de 1964 a 2022, aclarando que las fechas más antiguas corresponden a los artículos que sirvieron de base para poder describir los apartados de historia tanto del Western Blot como HPLC.

Marco Teórico

Capítulo 1. Western Blot

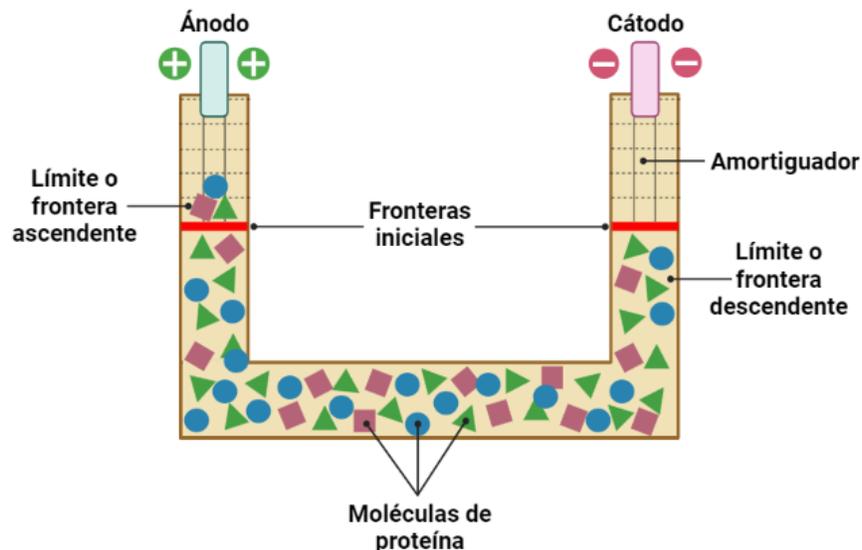
1.1 Historia

A pesar de que el surgimiento de la técnica para el análisis de proteínas fue en 1979, vale la pena mencionar algunas fechas anteriores y posteriores a este año que de una u otra forma ayudaron al desarrollo y optimización de lo que hoy en día se conoce como Western Blot.

1930-1937: En 1930 e impulsado por Svedberg a trabajar en electroforesis, Arne Tiselius publicó su tesis doctoral titulada “Método de frente móvil en el estudio de la electroforesis de proteínas”, en la que se seguía la migración electroforética de proteínas en dos límites formados por un tubo en U que contenía la solución proteica junto con un tampón que se encontraba encima de los dos brazos verticales (Figura 1). En los años siguientes, se mejoró el sistema hasta que finalmente en 1937 se convirtió en el primer aparato sofisticado de electroforesis que, once años más tarde, lo hizo merecedor del Premio Nobel de Química (Smithies, 2019; Vesterberg, 1993).

Figura 1.

Aparato de Tiselius



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2021.

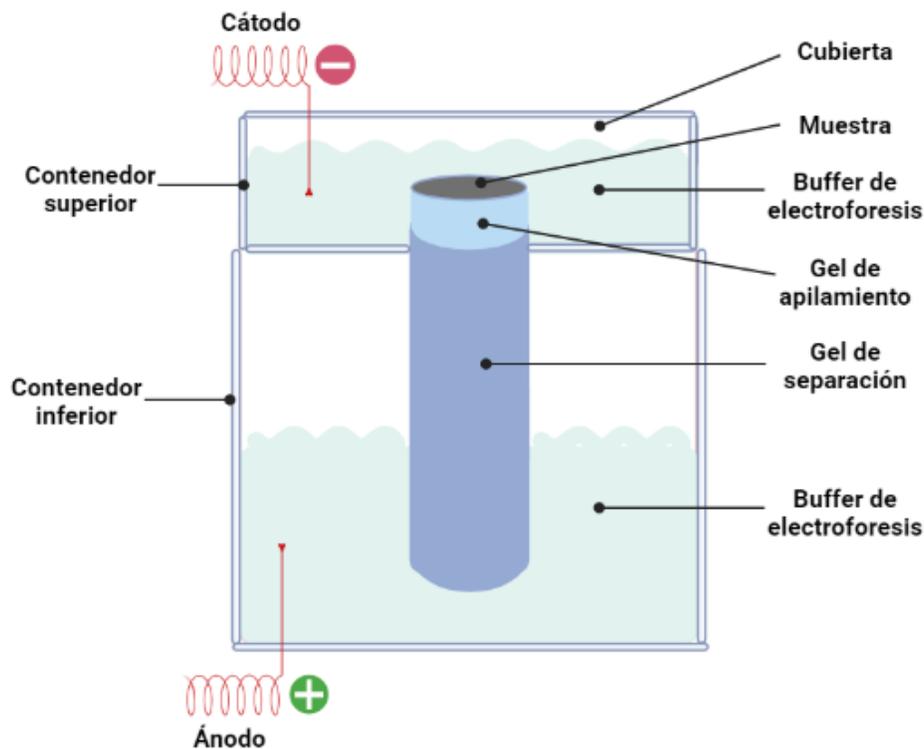
1940-1960: Con la difusión del uso del método de frente móvil, muchos científicos comenzaron a desarrollar modificaciones a la electroforesis, aplicándose a diversas moléculas

como iones inorgánicos, aminoácidos y proteínas, y sobre diferentes matrices hechas a base de geles de polímeros, capilares y papel (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, s.f.).

1964: Leonard Ornstein y Baruch J. Davis introdujeron la “Electroforesis de Disco” (Figura 2) denominada así por el uso de un gel discontinuo (Vesterberg, 1993) dividido en dos partes, una región superior o de apilamiento y una región inferior o de resolución, diferenciadas por el valor de pH al que se tamponan, la concentración de poliacrilamida y el tamaño del poro. Cabe mencionar que, para ese entonces se sabía que la poliacrilamida era termoestable, fuerte, químicamente inerte (relativamente), no iónica y que se podía preparar con una amplia gama de tamaños de poro (Ornstein, 1964), por lo que todas estas ventajas ayudaron a la selección de este polímero como medio estabilizador y para tamizado molecular (Vesterberg, 1993).

Figura 2.

Electroforesis de Disco



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2021.

En sí, el sistema se desarrolló para la separación de proteínas séricas de tal manera que se preservara la conformación plegada de la biomolécula, las interacciones de las subunidades

y la actividad biológica, de modo que la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) era nativa, es decir, en ausencia de agentes reductores y desnaturizantes. Debido a esto, una de las principales desventajas fue la difícil y laboriosa interpretación de datos ya que 1) se podían dar interacciones proteína-proteína que se retuvieran durante la separación y 2) la proteína podía migrar hacia cualquiera de los electrodos, dependiendo de su carga nativa, y complicar la determinación del peso molecular. Sin embargo, eso no evitaba que esta nueva técnica produjera una resolución extremadamente alta de proteínas y permitiera la separación de éstas en su estado activo (Bio-Rad, s.f.). Por otro lado, al término de la electroforesis era necesario visualizar la separación de bandas; en primera instancia se eligió teñir el gel con Amido Black, pero pronto fue reemplazado por el Azul de Coomassie Brillante puesto que este último ofrecía límites de detección mucho más bajos (Vesterberg, 1993).

1970: Para superar las limitaciones de los sistemas PAGE nativos, Laemmli (1970) incorporó el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) al sistema de electroforesis discontinua, gel y buffers, con la finalidad de caracterizar las proteínas de la cabeza del Fago T4, creando lo que se ha convertido en la forma más popular de electroforesis de proteínas SDS-PAGE.

Cuando las proteínas se separan en presencia de SDS se desnaturalizan por completo. Además, como es un potente detergente aniónico, recubre las proteínas desnaturalizadas con una porción igual de anión de masa, lo cual enmascara las características nativas de carga y forma de las proteínas (Gavini & Parameshwaran, 2020). Como resultado, la migración en el gel depende principalmente del tamaño de la biomolécula, lo que permite la determinación del peso molecular.

1975: Edwin Southern creó una nueva técnica, nombrada como Southern Blot en su honor, para la detección de fragmentos de DNA separados por tamaño mediante electroforesis en gel. De manera general, esta invención combinó la separación electroforética del DNA con su transferencia a un soporte sólido o “filtro” (nylon o nitrocelulosa) para su posterior hibridación a una sonda de DNA radiomarcada y detección, contribuyendo así de forma notable a aumentar la potencialidad de la hibridación como herramienta analítica (Luque & Herráez, 2001).

1977: James Alwine, David Kemp y George Stark inventaron una técnica que era muy similar a la transferencia Southern, pero el ácido nucleico analizado era RNA. A diferencia del caso anterior, su nombre Northern Blot no corresponde al de ningún investigador, sino a un simple juego de palabras (*Southern*= del sur, *Northern*= del norte). Pronto, esta técnica de hibridación

resultó útil para obtener información sobre el tamaño de RNAs y el modelo de expresión de genes específicos (Luque & Herráez, 2001; Sawyer, 2018).

1979: Se creó la técnica para el análisis selectivo de proteínas gracias a los trabajos publicados por Harry Towbin y Neal Burnette.

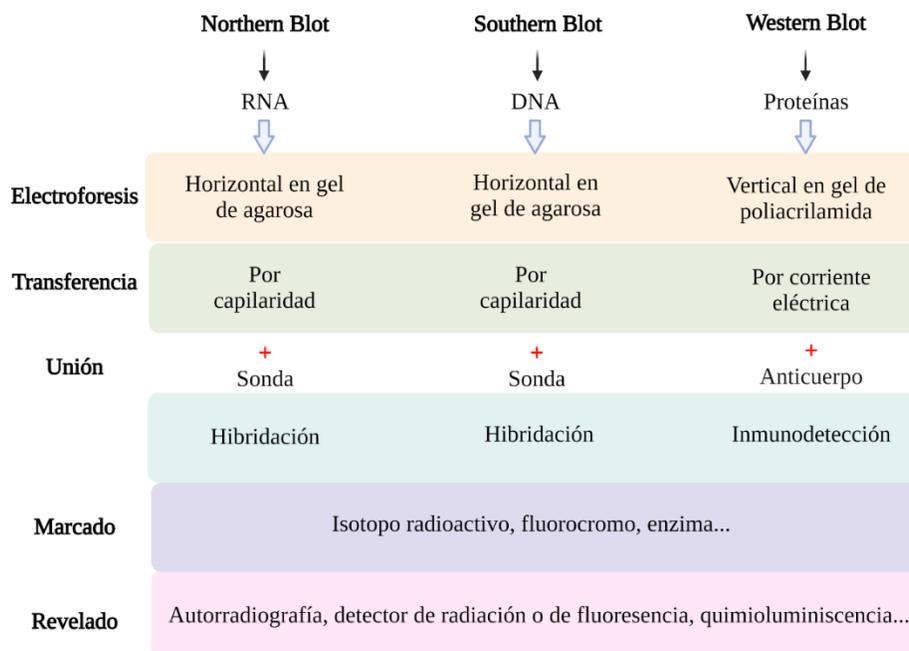
Por una parte, uno de los eventos que impulsaron a Harry Towbin a desarrollar la inmunotransferencia fue la desconfianza a los anticuerpos (Eisenstein, 2005); Köhler y Milstein (1975) habían logrado generar grandes cantidades de anticuerpos monoclonales mediante fusión de hibridomas. Sin embargo, a pesar de esta innovación, la eficacia de un monoclonal seguía siendo un problema puesto que no todas las fusiones producían anticuerpos funcionales o útiles. En este contexto, Towbin ingresó al Instituto Friedrich-Miescher en Suiza con la finalidad de expandir sus habilidades en inmunoquímica mediante la aplicación de dichos anticuerpos monoclonales. Trabajando con Theophil Staehelin y Julian Gordon logró generar anticuerpos contra una mezcla de proteínas ribosomales, solo para encontrarse sin saber cómo caracterizarlas. Uno de sus primeros intentos fue aislar las proteínas del gel a través de una elución, pero como la preparación no era 100% pura pronto dejaron de optar por ello. En un segundo intento querían que los anticuerpos reaccionaran directamente con el gel, no obstante, éstos no eran capaces de penetrar el material debido a la alta densidad de la poliacrilamida. Finalmente, en el tercer intento se optó por crear un copia de las proteínas del gel en una membrana; sabiendo que la nitrocelulosa tiene una afinidad natural por las proteínas, Towbin y Staehelin construyeron el ahora conocido “sándwich de inmunotransferencia” (que incluía esponjas, papel filtro, el gel y la membrana) y realizaron la transferencia de las proteínas en una cámara de decoloración electroforética y en presencia de un buffer que contenía Tris, glicina y metanol, ahora también conocido como buffer de Towbin. Una vez sondeada la membrana con los anticuerpos monoclonales, se recurrió al uso de anticuerpos secundarios marcados con yodo-125, fluoresceína y peroxidasa de rábano picante para su posterior detección por autorradiografía, luz UV y por producto de reacción de la enzima, respectivamente (Towbin, Staehelin & Gordon, 1979; Eisenstein, 2005).

Por otra parte, W. Neal Burnette del Centro de Investigación de Cáncer Fred Hutchinson, empezó a concebir una idea similar a la desarrollada por Towbin cuando se involucró en la creación de nuevas y optimizadas técnicas que facilitaban el cribado de los hibridomas en busca de especificidad antigénica. Como tenía conocimiento sobre radioinmunoensayos, inmunoprecipitación y SDS-PAGE, intentó crear formas en las que estos métodos podían combinarse hasta que, después de prueba y error, aportó 1) la proteína A estafilocócica

radiomarcada con yodo-125 para la detección de complejos antígeno-anticuerpo en vez de utilizar un segundo anticuerpo; 2) la separación 2D de las proteínas mediante SDS-PAGE para facilitar su transferencia a una membrana; y 3) el uso de nitrocelulosa sin modificar como mejor opción para la transferencia electroforética (Burnette, 2015). Sin embargo, es discutible que la contribución más significativa de este investigador se produjo cuando bautizó a la técnica como Western Blot, en homenaje a las técnicas que la precedieron (Southern y Northern) y a la ubicación geográfica de su institución que se encontraba en el Oeste (Eisenstein, 2005). Para ese entonces, el escrito de Towbin había sido publicado, pero Burnette (2015) creía que su técnica era más universal y tenía aspectos simplificadores por lo que también él hacía aportes lo suficientemente importantes como para justificar la presentación de su manuscrito. Así pues, se envió a *Analytical Biochemistry* en 1979 donde fue lamentablemente rechazado no porque tuviera similitudes con el de Towbin sino más bien por el nombre que le había dado. Pese a esto, Burnette mandó su artículo a sus colegas quienes posteriormente lo habían proporcionado a otros, recibiendo una buena aceptación. Dos años después, como la inmunotransferencia se había vuelto conocida, se publicó su manuscrito.

Figura 3.

Similitudes y diferencias entre Southern, Northern y Western Blot



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2021.

1985: MilliporeSigma (s.f.) inventó las membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) Inmobilon específicamente para su uso en Western Blot, como una alternativa más eficiente y duradera a la nitrocelulosa (Eisenstein, 2005).

1986: Surgen los primeros geles prefabricados disponibles comercialmente para SDS-PAGE (MilliporeSigma, s.f.), es decir, para procedimientos que requirieran condiciones de trabajo desnaturalizantes.

1990: Amersham International, ahora parte de GE Healthcare, fue la primera compañía en introducir reactivos de detección de Western Blot potenciados con quimioluminiscencia, volviendo a este método uno de los más utilizados durante los años posteriores debido a su alta sensibilidad y fácil procedimiento. Sin embargo, como la emisión de luz no es constante, sino que disminuye conforme el sustrato se oxida, la metodología no resultó adecuada para la producción de datos verdaderamente cuantitativos (Cushing, 2015).

Por otra parte, durante toda la década de 1990 las cámaras de Dispositivo de Carga Acoplada (CCD) se convirtieron en el detector preferido para estudios quimioluminiscentes y fluorescentes ya que permitían el registro de medidas muy sensibles de muestras tenues y sin movimiento. A pesar de esto, vale la pena mencionar que las cámaras CCD se inventaron veintidós años atrás, en 1969, por Willard Boyle y George E. Smith en los laboratorios Bell de AT&T impulsados por el deseo de reducir el tamaño físico de las cámaras de video utilizadas en las estaciones de televisión y no fue hasta 1982 que se empezaron a describir en el ámbito científico (Stuurman & Vale, 2016).

1994: Se publicó uno de los primeros artículos sobre la quimioluminiscencia mejorada (ECL) aplicada en el Western Blot, donde Niet, Bansal, Zhang, Kenneth y Curtis (1994) hicieron énfasis en que los indicadores de quimioluminiscencia se emplearon con éxito para aumentar la sensibilidad de los ensayos en anticuerpos de VIH. De esta manera, los resultados mostraron que la transferencia Western ECL fue mucho más sensible (hasta diez veces más para el análisis de sueros reactivos diluidos) que las transferencias Western cromogénicas, siendo éstas reemplazadas y pasando a segundo plano.

1999: Para satisfacer la necesidad de análisis de expresión de proteínas más cuantitativos y precisos, surgió un método conocido como Western Blot fluorescente cuya premisa básica es que el nivel de expresión de la proteína está directamente relacionado con el nivel de fluorescencia emitido por un fluoróforo conjugado con el anticuerpo de detección (Choudhary, Acharya & Miller, 2017).

Como la señal generada por la excitación del tinte es estable durante varios meses, es posible obtener resultados consistentes, razón por la cual la detección fluorescente se convirtió en una excelente opción para la verdadera cuantificación de proteínas a finales de la década de 1990 (Cushing, 2015).

1.2 Concepto y características del Western Blot

El Western Blot (WB), también llamado Western Blotting o Inmunoblot, es un inmunoensayo eficaz y ampliamente utilizado que confiere un análisis selectivo de la expresión de proteínas (Gavini & Parameshwaran, 2020), es decir, mediante esta técnica es posible separar, identificar, semicuantificar y determinar el tamaño de una o más proteínas específicas (Jensen, 2012) a partir de un pool de proteínas que se encuentran contenidas dentro de una muestra biológica como lo son tejidos animales, tejidos vegetales, cultivos celulares, bacterias, levaduras, entre otros (Martínez, Salazar, Fernández, Pineda, Aguilar & López, 2017).

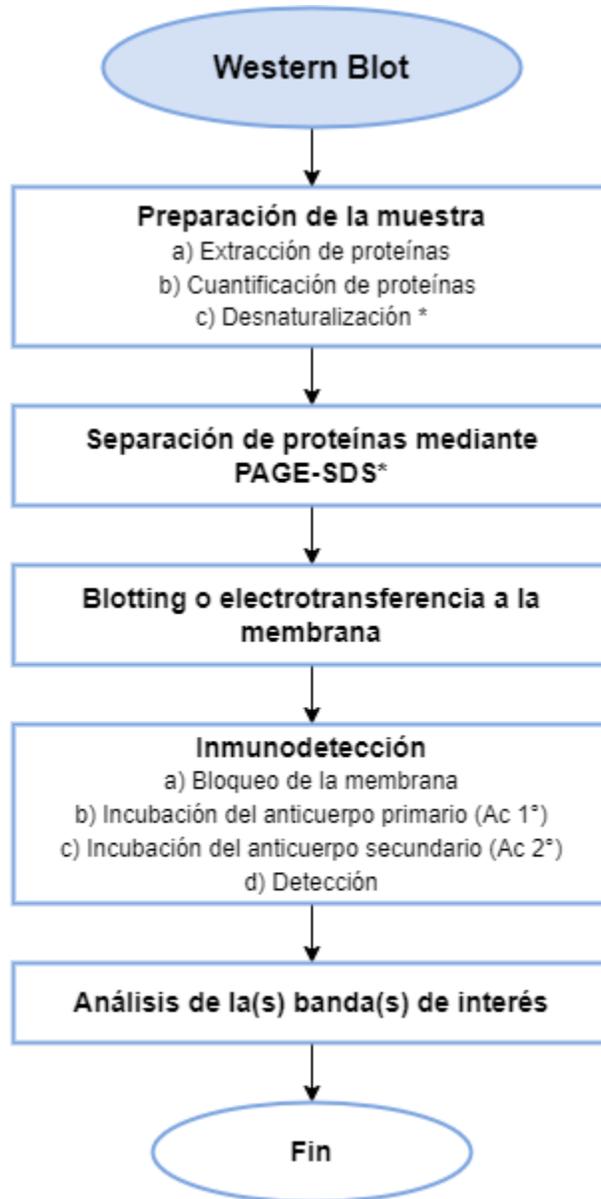
La aplicación de esta técnica resulta útil cuando se quiere conocer si:

- ✓ La proteína de interés está presente en la muestra;
- ✓ El tratamiento con un determinado agente aumenta o reduce el nivel de expresión de la proteína;
- ✓ Existen cambios en el peso molecular de una proteína debido a fosforilaciones u otras modificaciones postraduccionales;
- ✓ El nivel de expresión de la proteína varía en distintos tejidos o líneas celulares y;
- ✓ La muestra es sana o patológica (Veiga, 2013).

El procedimiento que comprende al Western Blot tiene una cantidad considerable de pasos que pueden apreciarse en la Figura 4 y que posteriormente se describen a mayor profundidad.

Figura 4.

Procedimiento del Western Blot



* Si el estudio requiere que proteína esté en condiciones nativas, se evita la desnaturalización y uso de SDS.

Modificado de "An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research" por Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., & Atherton, P., 2016, *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 27, p.5.

1.3 Preparación de la muestra

1.3.1 Extracción de proteínas

Para obtener resultados fiables y sólidos se requiere de una buena extracción de proteínas (Martínez, et al., 2017). En la mayoría de los ensayos, las proteínas se extraen mediante procesos mecánicos y químicos, pero la elección del método adecuado depende de tres puntos importantes: a) tipo de muestra de partida, b) localización celular de la proteína diana y c) condiciones óptimas que requiere el anticuerpo primario para reconocer al epítipo proteico (Advansta, 2011). De esta manera, se asegura la liberación eficaz del contenido intracelular a partir de la rotura de las membranas celulares (Bass, Wilkinson, Rankin, Phillips, Szewczyk, Smith & Atherton, 2016).

A menudo, en muestras tisulares es necesario el uso de un proceso mecánico, como maceración o sonicación, para la disrupción de la compleja matriz celular (Advansta, 2011). A su vez, se requiere de un proceso químico con la ayuda de tampones de lisis celular especializados e inhibidores de proteasas y fosfatasa (PPI). Por una parte, el uso de un determinado tampón de lisis debe alinearse con la localización de la proteína diana, ser capaz de romper de manera eficiente las membranas y solubilizar a las proteínas (Gavini & Parameshwaran, 2020), de ahí que se opte por usar detergentes no iónicos, sales, agentes reductores, entre otros (Jensen, 2012), los cuales pueden visualizarse en la Tabla 1. Por otra parte, los PPI se utilizan para mantener la estructura y el estado de fosforilación de la proteína diana (Gavini & Parameshwaran, 2020) puesto que la alteración de las membranas celulares durante la extracción ocasiona también la liberación de proteasas, cinasas y fosfatasa endógenas que pueden presentar actividad enzimática sobre las biomoléculas a pesar de las temperaturas de trabajo a 4°C para conservar la muestra (Bass, et al., 2016). Muchos de estos inhibidores vienen en forma de tabletas y pueden simplemente disolverse en agua destilada o directamente en el tampón de lisis antes de su uso (Jensen, 2012) y un claro ejemplo son las tabletas *Complete Mini de Sigma* que muestran efectividad contra serina proteasas, cisteína proteasas, metaloproteasas y en menor medida, calpaínas.

Tabla 1.*Componentes comunes empleados en el buffer de lisis para Western Blot*

Reactivo	Concentración típica	Propósito
Tritón x100	0.1-1%	Aumenta la solubilidad de proteínas no polares
Urea	6-8 M	Interrumpe o interfiere enlaces de hidrógeno de las proteínas para incrementar su solubilidad
NaCl	1-100 mM	Ruptura de membranas y solubilización de proteínas
SDS	0.1-1%	Ruptura de membrana
Tris-HCl	50 mM	Mantiene el pH del sistema en un rango 7 a 9
HEPES	50 mM	Mantiene el pH del sistema en un rango de 6.8 a 8.2
EGTA/EDTA	1 mM	Inhibición de metaloproteasas y prevención de cambios de fosforilación de proteínas
NAF	50 mM	Inhibición de Ser/Thr fosfatasas
β -glicerofosfato	10 mM	Inhibición de Ser/Thr fosfatasas
DTT	1-10 mM	Escisión de puentes disulfuro y desnaturalización de proteínas

Adaptado de "An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research" por Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., & Atherton, P., 2016, *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 27, p.7.

1.3.2 Cuantificación de proteínas por Bradford

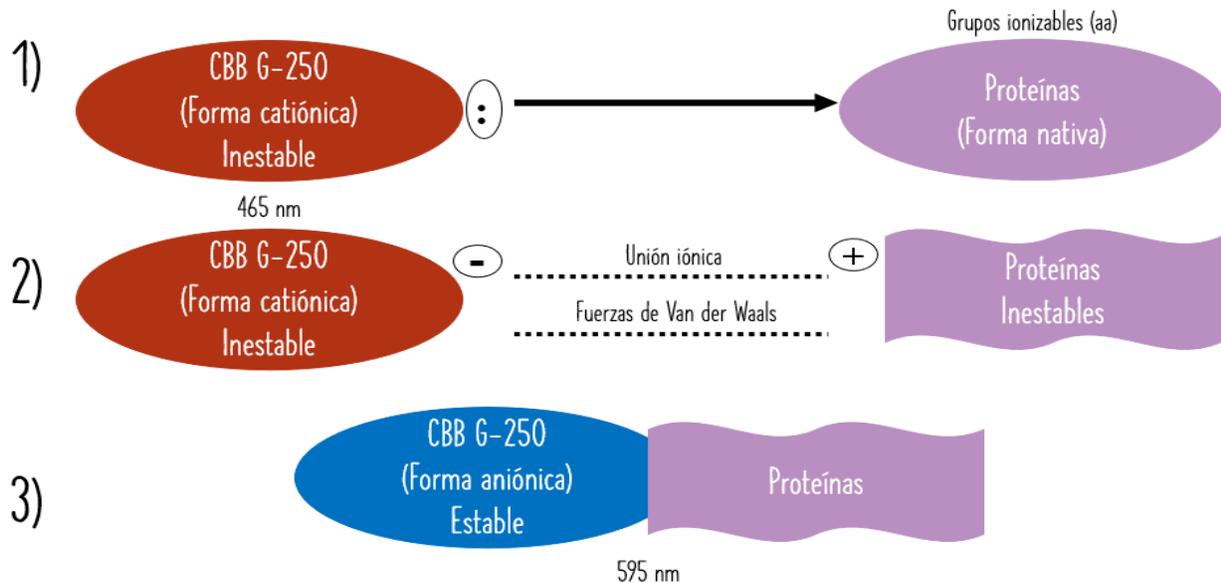
Previamente a la electroforesis, es muy importante determinar la concentración de proteínas totales (PT) porque permite al investigador a) asegurarse de que todas las muestras se comparen sobre una base equivalente, b) realizar WB semicuantitativos y cuantitativos y c) asegurar la carga óptima e igual de las proteínas en los pocillos del gel ya que de lo contrario se podría llegar a sesgar el análisis, provocar ruidos de fondo u ocasionar la unión no específica de los anticuerpos, por lo que el ensayo perdería validez (Advansta, 2011; Mahmoody & Yang, 2012).

La cuantificación de proteínas se puede realizar mediante métodos colorimétricos o de absorbancia UV a 280 nm. En este caso, el ensayo de Bradford utiliza un cambio colorimétrico del Azul de Coomassie Brillante G-250 (CBB G-250): de un color marrón-rojizo cuya absorbancia se lee a 465 nm pasa a un color azul detectado a 595 nm, pues de estar en su forma libre pasa

a formar un complejo con las proteínas presentes en la muestra, respectivamente. (Bass, et al., 2016). El mecanismo por el cual se lleva a cabo este cambio de coloración puede explicarse en tres pasos:

Figura 5.

Ensayo de Bradford



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2021.

- 1) En condiciones ácidas, debido a la presencia de ácido fosfórico que contiene el reactivo de Bradford, el CBB-G250 se encuentra en su forma catiónica y libre, además es inestable, sin embargo, en presencia de proteínas éste es capaz de donar su par de electrones libres a cualquiera de los grupos ionizables de los aminoácidos.
- 2) Las proteínas que, en un principio, estaban en su forma nativa pasan a exponer algunos de sus grupos hidrofóbicos, lo que hace que su estructura se vea modificada. En este punto, tanto el colorante como las proteínas son inestables, pero acomplejándose se vuelven estables y esto se logra mediante una unión iónica: los residuos de aminoácidos básicos, arginina, lisina e histidina, se asocian a los grupos no conjugados del CBB-G250. Así mismo, esta interacción se vuelve más estable por la presencia de fuerzas de Van der Waals y el CBB pasa a su forma aniónica.
- 3) La unión de proteínas con el CBB da como resultado un cambio de color y un cambio espectral; la tonalidad azul del complejo CBB-proteína se mide a 595 nm donde la

absorbancia registrada es directamente proporcional a la concentración de la muestra. (Biomedical and Biological Science, 2016; Lu, Yiao, Lim, Jensen & Hsiao, 2010).

Una vez que se conoce la absorbancia del tubo problema, el dato se asocia a una curva estándar de concentraciones conocidas a la que se le ajusta a una regresión lineal para así poder determinar las concentraciones de proteínas totales presentes en la muestra (Gavini & Parameshwaran, 2020). Cabe mencionar que el estándar utilizado con mayor frecuencia es la albúmina de suero bovino (BSA) con concentraciones que suelen oscilar entre 2-10 mg/mL. Desafortunadamente, existe un gran grado de curvatura en un amplio rango de concentraciones de proteínas, razón por la cual se opta por usar un rango estrecho pero lineal como el que se mencionó (Ernst & Zor, 2010).

Entre las ventajas que ofrece el ensayo de Bradford se encuentran el ser un procedimiento sencillo de realizar, barato, rápido (la reacción se lleva a cabo en dos minutos), sensible (detecta de 1-15 μ L de muestra) y con un producto estable por una hora a temperatura ambiente (Bass, et al., 2016).

1.3.3 Desnaturalización de las proteínas

El paso final en el procesamiento de muestras requiere la pérdida de las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias de las proteínas (Bass, et al., 2016) que se logra mediante el uso de un tampón de carga o también conocido como tampón de Laemmli cuya composición es específica para la posterior electroforesis (Tabla 2).

Todas las muestras de WB tienen tres cosas en común: extracto de proteína, tampón de lisis celular y tampón de carga. El extracto de proteína se normaliza con buffer de lisis a una concentración previamente determinada y se le agrega un volumen igual de tampón de carga. Una vez que las muestras están preparadas, se calientan antes de cargarlas en los pocillos del gel durante un corto periodo de tiempo de 5-10 minutos a temperaturas de 95-100°C para desnaturalizar aún más a las proteínas y garantizar que se encuentren en su estructura primaria (Gavini & Parameshwaran, 2020).

Tabla 2.*Composición del tampón de carga para Western Blot*

Reactivo	Concentración típica	Función
Tris-HCl	60 mM	Ajusta la solución a un pH de 6.8
Glicerol	20%	Agrega densidad a las muestras haciendo que se desplacen hacia el fondo del pocillo y evitando que se corran a pocillos adyacentes, por lo que concentra e impide la pérdida de muestra.
SDS	2%	Potente detergente aniónico que desnaturaliza y recubre a las proteínas desnaturalizadas con cargas negativas.
β -mercaptoetanol	4%	Agente reductor que escinde los enlaces disulfuro, desnaturalizando la estructura proteica.
Azul de bromofenol	0.01%	Colorante no reactivo que sirve como tinte frontal para la electroforesis; hace posible visualizar la migración y separación de las proteínas.

Adaptado de "Western Blot" por Gavini, K. & Parameshwaran, K., 2020, StatPearls.

1.4 PAGE-SDS

Las proteínas pueden separarse por punto isoeléctrico, peso molecular, carga eléctrica o una combinación de estos. El tipo más común de electroforesis en un WB utiliza geles de poli(acrilamida) (PAGE) cargados con dodecil sulfato de sodio (SDS). Por un lado, el SDS se agrega para asegurar que todas las proteínas estén desnaturalizadas y tengan la misma carga eléctrica negativa, lo que da como resultado que la separación de estas biomoléculas sea principalmente con base al tamaño de la proteína; como hay uniformidad en la carga, todas las proteínas migran hacia el ánodo (Jensen, 2012). Por otro lado, la poli(acrilamida) forma la matriz del gel a partir de la polimerización de monómeros de acrilamida y la reticulación de monómeros de N,N'-metileno-bisacrilamida, componentes que crean los poros a través de donde se mueven las proteínas cuando se le aplica corriente eléctrica al sistema (Bass, et al., 2016). Cabe recalcar que el tamaño de los poros se puede modificar ajustando el porcentaje de N,N'-metileno-bisacrilamida ya que son inversamente proporcionales (Gavini & Parameshwaran, 2020).

En PAGE se pueden diferenciar dos regiones (Figura 6): un gel de apilamiento y un gel de resolución. El gel de apilamiento se encuentra en la parte superior, es ligeramente ácido (pH 6.8) y tiene una concentración de metilenbisacrilamida baja, por lo que el tamaño del poro es relativamente grande. Como su nombre sugiere, en esta primera parte las proteínas se apilan o forman en una banda para que posteriormente ingresen al mismo tiempo y con la misma velocidad en el gel inferior o de resolución que es básico (pH 8.8) y tiene un contenido mayor de metilenbisacrilamida lo que hace que los poros sean más estrechos y permitan que se dé en esta región la separación de proteínas en base a su tamaño; las proteínas más pequeñas migran más fácilmente y por tanto, más rápidamente que las proteínas de mayor tamaño pues estas últimas tienen dificultades para atravesar los poros, haciendo que su avance en el gel sea lento (Mahmoody & Yang, 2012). Cabe resaltar que, dentro de la preparación de cada gel, se incluye el Tris-HCl como el componente responsable de amortiguar el pH al valor previamente descrito.

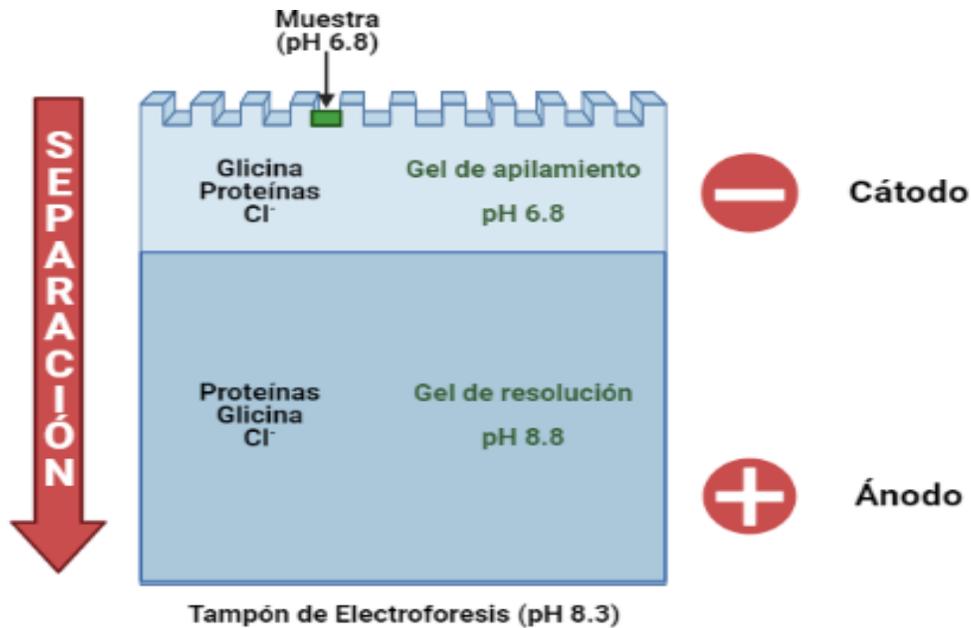
Una vez que los geles se encuentren solidificados, se introducen en la cámara de electroforesis que a continuación se llena con el denominado buffer de electroforesis (pH 8.3) que contiene Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0.1%. Hasta este punto, se puede notar que todo el sistema usa deliberadamente pH variados con el propósito de aprovechar las propiedades de carga de la glicina: en un ambiente ácido, la glicina tiende a estar en su forma de ion híbrido, pero en un ambiente alcalino, es un anión glicinato (Gavini & Parameshwaran, 2020).

Cuando comienza la electroforesis, los iones cloruro provenientes de Tris-HCl se disocian de su contraión presentando una mayor movilidad en el gel y por lo tanto, una migración más rápida que las proteínas desnaturalizadas, lo que establece un límite anterior. Por su parte, la corriente atrae rápidamente a la glicina que se protona y se vuelve un zwitterion, lo cual impide gravemente su movilidad haciendo que se forme un límite posterior justo detrás de las proteínas. En última instancia, las proteínas que migran entre dos frentes se apilan en bandas estrechamente enfocadas que llegan al mismo tiempo al gel de resolución (Bass, et al., 2016). La basicidad del gel de resolución hace que la glicina esté en su forma de anión glicinato, lo que trae como consecuencia que migre más allá del frente de las proteínas, junto con los iones cloruro, rompiendo así la “barrera” que las contenían para dar paso a un movimiento y a una separación más lenta (Gavini & Parameshwaran, 2020).

Se debe mencionar que además de las muestras, también se carga un carril con un marcador de peso molecular y otro más con un control positivo con la finalidad de determinar el peso molecular relativo de la proteína diana y detectar si el anticuerpo primario es efectivo, respectivamente (Jensen, 2012).

Figura 6.

Sistema de PAGE-SDS



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2021.

Existen ocasiones en las que el anticuerpo primario reconoce al epítipo de la proteína diana cuando se encuentra en su forma nativa, y en estos casos se aconseja que la preparación de la muestra, así como la electroforesis se lleven a cabo en condiciones no reductoras o no desnaturalizantes.

Tabla 3.*Electroforesis en condiciones no reductoras o no desnaturizantes*

Forma requerida de la proteína	Condiciones para la electroforesis	Tampón de carga	Tampón de electroforesis
Reducida y desnaturizada*	Reductor y desnaturizante	Con β -mercaptoetanol y con SDS	Con SDS
Reducida y nativa	Reductor no desnaturizante	Con β -mercaptoetanol y sin SDS	Sin SDS
Oxidada y desnaturizada	No reductor y desnaturizante	Sin β -mercaptoetanol y con SDS	Con SDS
Oxidada y nativa	No reductor y nativo	Sin β -mercaptoetanol y sin SDS	Sin SDS

*Forma requerida de la proteína con la que usualmente se trabaja en laboratorios. Adaptada de "Western Blot Introducción y Optimización" de Veiga, A., 2013, Abcam.

Aunque el sistema original de Laemmli incorporó SDS en el gel y los buffers, en la actualidad no se requiere de este detergente aniónico en el gel, basta con que esté presente en el buffer de carga para saturar a las proteínas y en el buffer de migración para mantener la saturación durante la electroforesis (Bio-Rad, s.f.).

1.5 Blotting

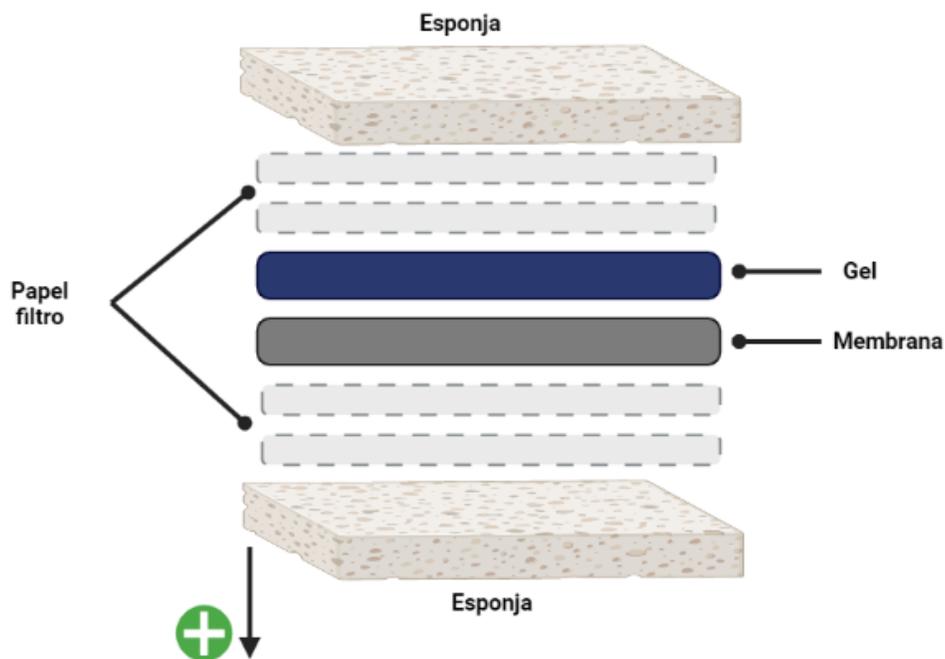
El blotting es la transferencia electroforética del contenido del gel a una membrana adecuada; en el caso de una transferencia de Western, el contenido son proteínas (Gavini & Parameshwaran, 2020). El objetivo de realizar este paso es inmovilizar a las proteínas separadas para permitir el sondeo posterior con anticuerpos (Towbin, et al., 1975 en Bass, et al., 2016). Otro rasgo de este procedimiento es el ser una herramienta útil para detectar y caracterizar una multitud de proteínas, especialmente aquellas que son de baja expresión, ofreciendo, al mismo tiempo, más ventajas como lo son a) una durabilidad adicional en comparación con los geles; b)

la facilidad de manipular la membrana; c) el fácil acceso de las proteínas inmóviles en la membrana a diferentes ligandos; d) la pequeña cantidad de reactivos empleados; e) la posibilidad de crear múltiples réplicas de un gel y f) la capacidad de que en la misma transferencia de proteína se lleven a cabo múltiples análisis sucesivos (Kurien & Scofield, 2015).

El principio de transferencia es similar al de electroforesis en gel de poliacrilamida, es decir, las proteínas cargadas negativamente migran hacia el electrodo positivo bajo la influencia de un campo eléctrico (Martínez, et al., 2017) orientado perpendicularmente a la superficie del gel, que hace que las proteínas se muevan fuera del gel hacia la membrana. Por otra parte, la membrana se coloca entre la superficie del gel y el electrodo positivo en un “sándwich” que consiste, de cátodo a ánodo, en una almohadilla de fibra (esponja), papel filtro, gel, membrana, papel filtro y esponja (Mahmoody & Yang, 2012).

Figura 7.

Sistema de transferencia en Western



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2021.

Asimismo, todo el sistema se encuentra en presencia de un tampón de transferencia, conocido también como tampón de Towbin, fijado a pH 8.3 y compuesto por Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%. El metanol aumenta la hidrofobicidad de las proteínas y facilita la

liberación de SDS excedente, incrementando así la adsorción de las proteínas en la membrana (Gavini & Parameshwaran, 2020), además, previene que el gel pierda su geometría; los geles PAGE tienden a hincharse en tampones de baja fuerza iónica en ausencia de metanol lo que puede dar como resultado que las bandas se distorsionen durante la transferencia. Sin embargo, se ha demostrado que un pretratamiento del gel incubándolo en tampón de Towbin durante 30-60 minutos antes de la transferencia evita este problema (Kurien & Scofield, 2015).

Desde otro punto de vista, McPhee (2010) menciona que la inclusión de metanol dentro del buffer puede disminuir la transferencia de proteínas de mayor peso molecular (>100 kDa) ya que reduce el tamaño de los poros dentro de los geles, por lo que podría ser aconsejable excluir este componente al sondear proteínas más grandes o bien, disminuir la concentración de metanol en la solución hasta un 10% o menos. De igual manera, se recomienda la transferencia sin metanol cuando sea necesario preservar la actividad enzimática, así como cuando se transfieren anticuerpos sensibles a la conformación (Kurien & Scofield, 2015).

1.5.1 Tipos de membranas para la transferencia

La membrana, que es el soporte sólido, puede ser, generalmente, de nitrocelulosa (NC) o de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Mahmoody & Yang, 2012), materiales que se describen con detalle en la Tabla 4.

Tabla 4.

Membranas comúnmente utilizadas para la transferencia Western

	Nitrocelulosa	PVDF
Mecanismo de inmovilización proteína-membrana	Desconocido, pero se sugiere una interacción no covalente e hidrofóbica	Interacciones dipolares e hidrofobas
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> ▪Alta afinidad por proteínas ▪Capacidad de retención ▪Puede teñirse con negro amido, CBB, negro azul anilina, entre otros 	<ul style="list-style-type: none"> ▪Alta capacidad de unión a proteínas ▪Químicamente inerte ▪Es posible realizar múltiples sondeos y análisis ▪Puede teñirse con negro amido, tinta china, CBB y nitrato de plata ▪Mayor resistencia y eficiencia de transferencia
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> ▪Naturaleza frágil y quebradiza cuando se seca ▪No pueden realizarse múltiples sondeos y estudios ▪Proteínas pequeñas tienden a moverse 	<ul style="list-style-type: none"> ▪Alta hidrofobicidad ▪Es más probable que ocurran interacciones membrana-anticuerpo, generando falsos positivos
Observaciones	Altas concentraciones de sal y bajas concentraciones de metanol aumentan la eficiencia de inmovilización	Requiere pretratamiento con metanol o etanol debido a su alta hidrofobicidad. El metanol puede retirarse completamente del tampón, pero sigue siendo necesario para el pretratamiento.

Adaptado de "Western Blotting: An introduction" por Kurien, B. T., & Scofield, R. H., 2015, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1312, p. 3-5.

1.5.2 Sistemas de transferencia a la membrana

Existen varios sistemas de transferencia, pero los dos más comúnmente utilizados son el húmedo y el semiseco, cuyas principales diferencias radican en el volumen de tampón requerido y el tiempo de transferencia (Gavini & Parameshwaran, 2020).

1.5.2.1 *Transferencia húmeda*

En este procedimiento, el sándwich se sumerge completamente en un tanque de compensación con electrodos de alambre de platino o de acero inoxidable que están en presencia de un gran volumen de buffer. En este caso, para que se lleve a cabo la transferencia es necesario que el sistema permanezca a un bajo voltaje durante toda la noche (Gavini & Parameshwaran, 2020; Kurien & Scofield, 2015).

1.5.2.2 *Transferencia semiseca*

En la transferencia semiseca, el sándwich se coloca entre electrodos de placa de carbón/grafito o de acero inoxidable, y se utiliza como tampón de Towbin solo el líquido que se alcanza a contener en los papeles filtro y esponjas por lo que el procedimiento es rápido y el secado generalmente termina en una hora. Entre las ventajas de este procedimiento destacan a) la capacidad de emparedar hasta seis conjuntos de gel/membrana/papel filtro, b) los electrodos pueden ser bloques de carbono baratos y c) se requiere menos energía y buffer para la transferencia (Gavini & Parameshwaran, 2020; Kurien & Scofield, 2015).

Teniendo en cuenta lo anterior, el sistema semiseco parece ser la mejor opción pues ahorra tiempo y material, sin embargo, tiene sus limitaciones puesto que, si se trabaja con proteínas grandes, la transferencia es incompleta y por tanto, poco eficiente. Caso contrario ocurre si se trabaja con el sistema húmedo ya que destaca por su capacidad de producir una alta eficiencia en una amplia gama de tamaños de proteínas, ofreciendo así una mayor flexibilidad (Gavini & Parameshwaran, 2020).

Hasta este momento, vale la pena destacar que la eficacia de la transferencia de proteínas depende del tipo de gel utilizado, el peso molecular de la proteína, el tipo de membrana de inmovilización (Jensen, 2012), el aparato de transferencia utilizado, la composición del tampón de transferencia, así como la misma proteína (Bass, et al., 2016; Kurien & Scofield, 2015).

1.6 Inmunodetección

1.6.1 Bloqueo de la membrana

Una vez que las proteínas son retenidas en una fase sólida y resistente, el siguiente paso es bloquear la membrana (Martínez, et al., 2017). El bloqueo tiene dos importantes propósitos. El primero y el más conocido, es el de ayudar a enmascarar cualquier sitio de unión no específico en la membrana (Towbin & Gordon, 1984 en McPhee, 2010); como las membranas tienen una alta afinidad por las proteínas de unión y por ende a los anticuerpos, el bloqueo reduce el ruido de fondo en los pasos posteriores (Bass, et al., 2016) haciendo que los anticuerpos añadidos se unan únicamente a los sitios específicos de la proteína diana (Martínez, et al., 2017), lo cual conduce a la eliminación de falsos positivos y a la obtención de resultados claros (Jensen, 2012). El segundo propósito es el menos conocido y quizá el menos entendido, pero bloquear la membrana puede promover la renaturalización del sitio antigénico (Towbin & Gordon, 1984 en McPhee, 2010).

1.6.1.1 Agentes de bloqueo

Los agentes bloqueantes están hechos, principalmente, a base de proteínas, y entre los más ampliamente usados se encuentran la leche descremada en polvo y la albumina de suero bovino (BSA) (Martínez, et al., 2017). Para la preparación de leche y BSA, se utiliza con mayor frecuencia una solución de 2.5-5% peso/volumen, en un tampón fosfato salino (PBS) o en un tampón Tris salino que contiene Tween-20 al 0.1% (TBST), Tween-20 es un detergente no iónico que ayuda a eliminar las proteínas unidas periféricamente en la membrana. Vale la pena señalar que cuando la mezcla se termina de realizar, es recomendable filtrarla para evitar que los grumos que no se disolvieron contaminen la membrana durante el procedimiento (Bass, et al., 2016).

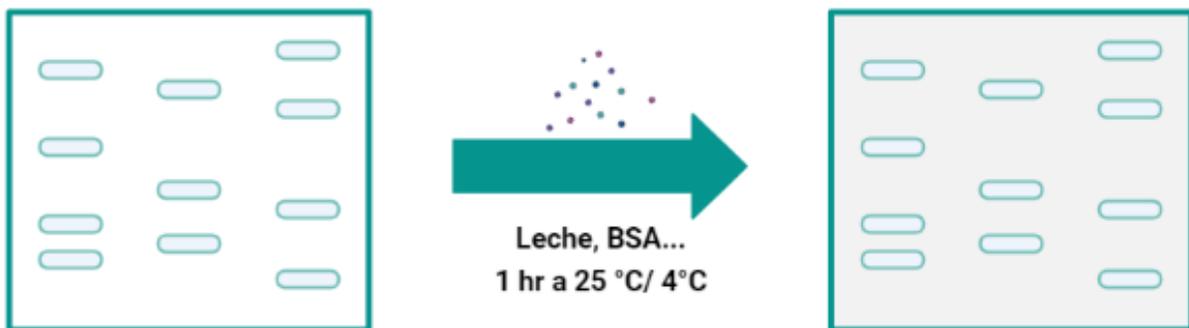
A menudo se prefiere el uso de leche en polvo descremada puesto que es económica y de fácil acceso, sin embargo, no es compatible con todas las proteínas de la muestra (Mahmoody & Yang, 2012), en especial con aquellas que están fosforiladas porque, como la leche contiene caseína, una fosfoproteína, ésta puede llegar a competir por el Ac 1°, es decir, se puede dar una reactividad cruzada entre la caseína y el anticuerpo anti-fosfoproteína, lo que llevaría a detectar más a adelante una señal inespecífica. Por esto, la BSA o inclusive agentes bloqueantes no proteicos, se consideran una mejor opción cuando la proteína diana está fosforilada (Gavini & Parameshwaran, 2020; Martínez, et al., 2017). No obstante, se sugiere verificar la hoja de datos o ficha técnica de los antisueros seleccionados, ya que algunos establecen específicamente el uso de BSA en lugar de leche en polvo, así como ciertos soportes de membrana que funcionan

mejor con una solución de bloqueo determinada (McPhee, 2010). De modo que, al investigador le corresponde asegurarse que el agente y tampón de bloqueo sea apropiado tanto para los antisueros primario y secundario como para el tipo de membrana (Jensen, 2012).

Ahora bien, no es solo la elección del agente y tampón de bloqueo lo que puede afectar los resultados del WB; la concentración de la solución de bloqueo y el periodo de incubación también son factores importantes (Gershoni y Palade, 1983 en Bass, et al., 2017). Una concentración baja o un periodo de incubación demasiado corto aumenta la posibilidad de unión no específica del Ac 1°. Por el contrario, una concentración excesiva o un periodo de incubación demasiado largo puede interrumpir las interacciones antígeno-anticuerpo (Mahmood & Yang, 2012), de hecho, se sabe que tiempos prolongados de bloqueo (>24 horas) pueden remover los antígenos de la membrana (DenHollander & Befus, 1989 en McPhee, 2010). Por consiguiente, las concentraciones utilizadas suelen ser de 5% para leche descremada y 2-3% para BSA, mientras que el tiempo de incubación es de 1 hora a temperatura ambiente o a 4°C (Advansta, 2011; Hirano, 2012).

Figura 8.

Bloqueo de la membrana



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2021.

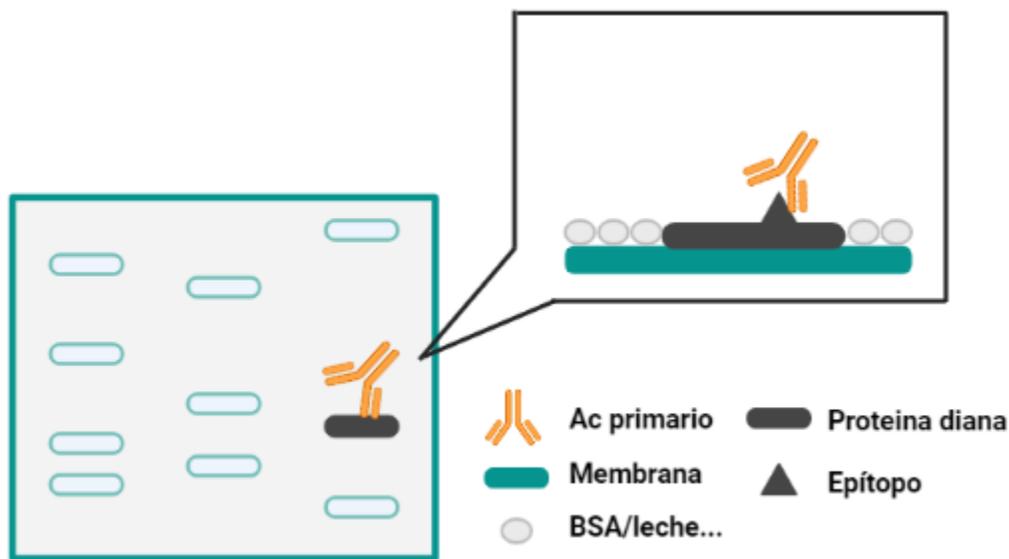
1.6.2 Anticuerpo Primario (Ac 1°)

La identificación y detección de la proteína diana se lleva a cabo por Inmunodetección indirecta, en otras palabras, mediante el uso de dos anticuerpos diferentes denominados anticuerpo primario y anticuerpo secundario, siendo el anticuerpo primario el responsable de unirse con la biomolécula de interés.

El punto real de interacción ocurre entre una porción del antígeno (un epítipo) y los sitios de reconocimiento que se encuentran en la región Fab de la inmunoglobulina (un paratopo). Normalmente, el anticuerpo primario reconoce un segmento lineal corto de aminoácidos que se encuentran en la proteína blanco y que queda expuesto en condiciones desnaturalizantes y reductoras. A pesar de esto, existen anticuerpos que reconocen epítipos conformacionales por lo que, las regiones que forman una configuración estructural tridimensional de aminoácidos pierden su capacidad de unión tras la desnaturalización, pero como los protocolos de WB son flexibles, esto se soluciona al cambiar las condiciones de trabajo de la electroforesis e inclusive de la preparación de la muestra (Kurien, et al., 2011).

Figura 9.

Reconocimiento del epítipo de la proteína diana por parte del anticuerpo primario



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2021.

1.6.3 Anticuerpo Secundario (Ac 2°)

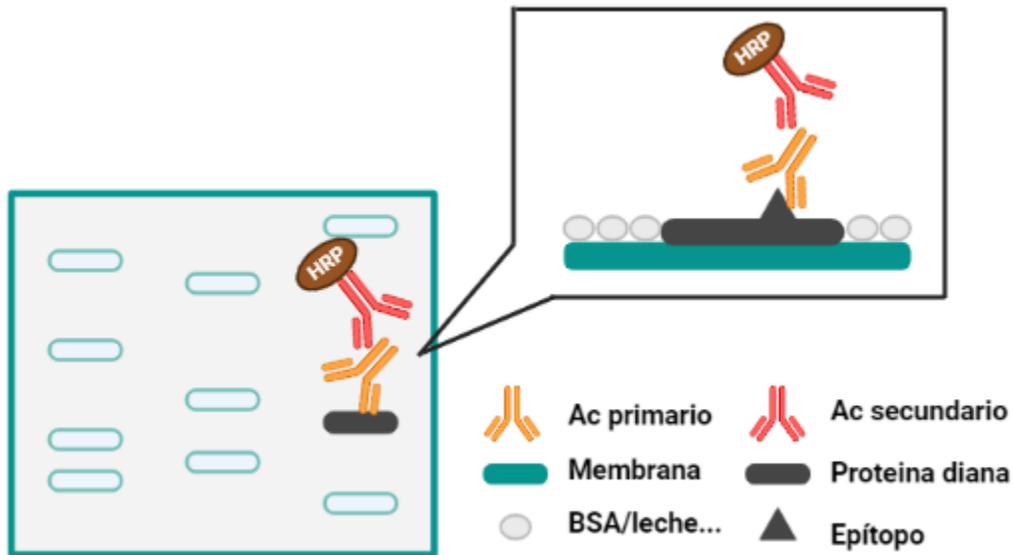
Por lo general, un anticuerpo primario no está marcado para su detección, lo que resulta en la necesidad de un segundo anticuerpo que sí esté conjugado con un componente indicador, como la peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (FA) o fluoruros, por mencionar algunos ejemplos (Bass, et al., 2017). Dicho de otra forma, mientras que el primer anticuerpo interacciona con una región específica de la proteína diana para únicamente detectar su presencia en la membrana, el segundo anticuerpo se conjuga y se une a las regiones constantes

del primero para evidenciar la unión antígeno-Ac 1° (Gavini & Parameshwaran, 2020). Aquí, el tipo de anticuerpo secundario a usar está dictado por la especie del primer anticuerpo; si el primero es de ratón, el segundo debe ser anti-ratón, en otras palabras, debe ser producido por otra especie distinta al ratón (Advansta, 2011).

Cabe mencionar que uno de los aspectos cruciales de utilizar un Ac 2° es la capacidad que tiene para amplificar la señal detectable, pues múltiples Ac 2° pueden unirse a un solo Ac 1°, lo cual representa una clara ventaja en muestras de proteínas que son poco abundantes (Bass, et al., 2017).

Figura 10.

Unión del anticuerpo secundario al fragmento cristalizante (Fc) del anticuerpo primario



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2021.

1.6.4 Sondeo de la membrana con anticuerpos

Ya que la membrana ha sido bloqueada, el siguiente paso en el procedimiento compete a la incubación del anticuerpo primario y secundario, que son diluidos en un tampón de bloqueo, TBST o en un tampón de disolución de anticuerpo comercial, cada uno por separado y a las concentraciones previamente determinadas (Advansta, 2011).

Usualmente, la membrana se incuba con solución de sondeo primario durante la noche a 4°C y se lava con TBST por 5 minutos y por triplicado. Posterior a esto, se vuelve a incubar la

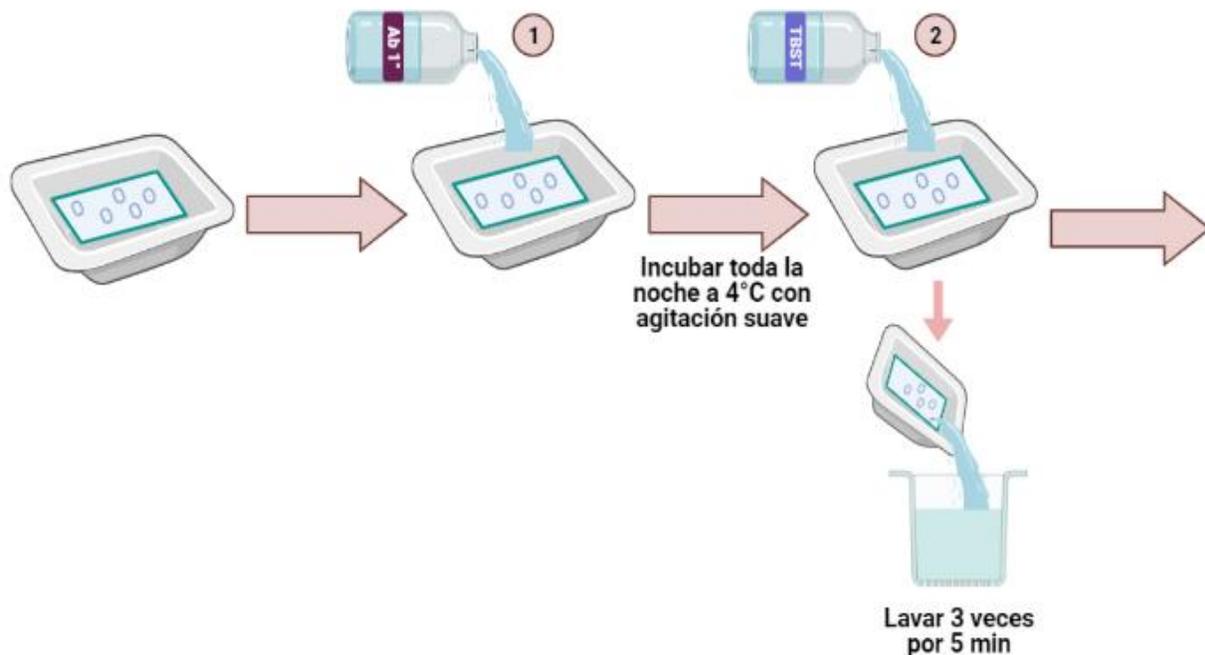
membrana con solución de sondeo secundario por 1 hora a temperatura ambiente, seguido de la eliminación del excedente con tampón de lavado de igual manera, durante 5 minutos y por triplicado. Tanto los pasos de incubación como de lavado se hacen bajo condiciones de agitación suave (Mahmoody & Yang, 2012).

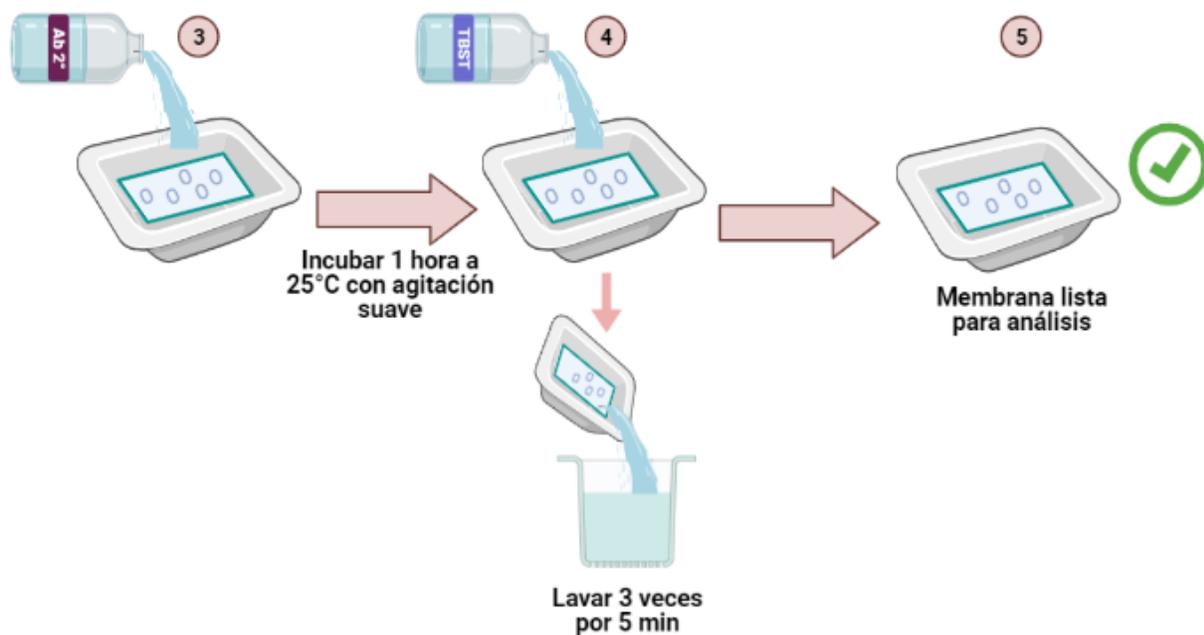
Un lavado ineficaz suele ser la razón principal de altos ruidos de fondo. Para evitarlo, además de realizarlo tres veces, es aconsejable reducir la concentración del detergente no iónico en el tampón de dilución de anticuerpos (0.005-0.02%) y aumentarla en el tampón de lavado (0.5%). Otra opción efectiva es ejecutar lavados rápidos con agua destilada o desionizada, probablemente debido a que su fuerza iónica más baja promueve la eliminación de las uniones no específicas, sin dañar la membrana (Wu, Stockley & Martin, 2002 en McPhee, 2010).

Al término de las dos incubaciones y los dos lavados, la membrana queda lista para ser leída.

Figura 11.

Incubación de anticuerpo primario y secundario





Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2021.

1.6.5 Consideraciones de los antisueros

1.6.5.1 Optimización de las condiciones de trabajo

A pesar de los avances y las nuevas metodologías que surgen para la detección de señales en el WB, los antisueros siguen siendo una parte fundamental del procedimiento ya que son un determinante principal en la sensibilidad del ensayo. (Burnette, 1981 en McPhee, 2010).

De acuerdo con McPhee (2010), dependiendo del método de detección utilizado, por ejemplo, quimioluminiscencia, la dilución de los antisueros debe optimizarse empíricamente para que se genere la mejor relación señal/ruido, aún si el fabricante recomienda una concentración inicial. Una forma rápida y sencilla de optimizar las concentraciones de antígenos y anticuerpos antes del análisis de transferencia Western real, es realizar un análisis de transferencia puntual en el que es posible efectuar un blotting con diferentes concentraciones de proteínas en tiras de membrana que se dejan secar para un análisis posterior con diferentes concentraciones de antisueros primarios y secundarios. Simultáneamente, este procedimiento ofrece la oportunidad de probar diferentes soluciones y concentraciones de bloqueo, y de aproximar los tiempos de exposición, dando como resultado la determinación de las condiciones óptimas de trabajo, que más adelante ayudarán a prevenir la generación de datos de investigación de baja calidad, la producción de señales débiles o breves, así como la presencia de un fondo moteado.

1.6.5.2 Policlonal vs monoclonal

Tanto los anticuerpos monoclonales como los policlonales pueden ser utilizados para el análisis del WB (Advansta, 2011). Por una parte, los anticuerpos policlonales normalmente son sintetizados en animales experimentales como ratones, conejos, ovejas, cabras y burros, mediante inmunización con una proteína o péptido específico. Estos anticuerpos contienen un pool de moléculas de inmunoglobulinas capaces de unirse a diferentes epítopos que se encuentran en una sola proteína. Los anticuerpos monoclonales, por otra parte, se unen solo a un epítipo único dentro de un antígeno. Estos contienen inmunoglobulinas homogéneas clonadas que se obtienen fusionando células B productoras de anticuerpos del bazo del animal inmunizado (rata o ratón) con una línea celular inmortalizada. (Kurien, Dorri, Dsouza & Scofield, 2011).

Así pues, la elección del antisuero más adecuado se basa en función de la aplicación posterior y en las ventajas y desventajas que presentan cada uno (Tabla 5).

Tabla 5.

Anticuerpos policlonales vs monoclonales

	Ac monoclonales	Ac policlonales
Sensibilidad	Menor sensibilidad debido a la unión de un único epítopo	Mayor sensibilidad debido a la unión de múltiples epítomos en una proteína; amplifica la señal de detección
Reactividad cruzada	Menos probable	Más probable; posibilidad de reconocimiento de múltiples epítomos que sean ajenos a la proteína diana
Tiempo requerido para su producción	Largo	Corto
Coste de preparación	Mayor coste Requiere personal capacitado y equipo especializado	Menor coste
Variabilidad	Los lotes de un mismo hibridoma son muy estables	Propenso a cierta variabilidad entre lotes
Tolerancia a condiciones variables	Poco tolerante, puede dejar de reconocer el antígeno debido condiciones desnaturizantes/ reductoras, modificaciones postraduccionales, cambios en la secuencia o presencia de polimorfismos	Más tolerante a condiciones variables

Adaptado de "Análisis de Proteínas. Electroforesis, Transferencia e Inmunodetección" por Advansta, 2011, p. 14.

1.6.5.3 Selección de antisueros

Antes de invertir una cantidad considerable de dinero en la compra de un antisuero, es recomendable que el investigador lea la ficha de datos del fabricante para conocer sus características y propiedades; en especial hay que asegurarse de que el Ac haya sido testado

con la técnica que se desea realizar, en este caso, Western Blot (Figura 12). A la par, es necesario comprobar que el anticuerpo sea específico frente a la proteína diana nativa o desnaturalizada, porque, como se ha visto, el tratamiento desnaturalizante antes de PAGE-SDS puede alterar la exposición y disponibilidad del epítipo y por ende, la afinidad de unión del anticuerpo. Para esto, se sugiere probarse frente a un control positivo (muestra que contiene la proteína purificada) y un control negativo (muestra que no expresa la proteína), que dan como resultado una banda detectable con el peso molecular correcto y una banda no detectable, respectivamente (Bass, et al., 2017).

Figura 12.

Ejemplo de ficha de datos de un anticuerpo

Overview	
Product name	Anti-GAPDH antibody - Loading Control
Description	Rabbit polyclonal to GAPDH - Loading Control
Host species	Rabbit
Tested applications	Suitable for: IHC-P, WB, ICC/IF
Species reactivity	<p>Reacts with: Mouse, Human</p> <p>Predicted to work with: Rat, Chicken, Dog, Saccharomyces cerevisiae, Xenopus laevis, Schizosaccharomyces pombe, African green monkey ▲</p>
Immunogen	Full length native protein (purified) corresponding to Human GAPDH.
Properties	
Form	Liquid
Storage instructions	Shipped at 4°C. Store at +4°C short term (1-2 weeks). Upon delivery aliquot. Store at -20°C or -80°C. Avoid freeze / thaw cycle.
Storage buffer	<p>Preservative: 0.01% Sodium azide</p> <p>Constituents: PBS, 40% Glycerol (glycerin, glycerine), 0.05% BSA</p> <p>Batches of this product that have a concentration < 1mg/ml may have BSA added as a stabilising agent. If you would like information about the formulation of a specific lot, please contact our scientific support team who will be happy to help.</p>
Purity	Protein A purified
Clonality	Polyclonal
Isotype	IgG

Adaptado de “Anti-GAPDH antibody – Loading Control ab9485” por Abcam, s.f. <https://www.abcam.com/gapdh-antibody-loading-control-ab9485.html>

1.6.6 Detección por Quimioluminiscencia Indirecta

La quimioluminiscencia se define como una reacción química que produce energía liberada en forma de luz (ThermoFisher, 2018). En la actualidad, se ha vuelto uno de los métodos de detección más populares en el Western Blot debido a su sensibilidad y la capacidad para cuantificar la abundancia relativa de la proteína de interés (McPhee, 2010).

1.6.6.1 Fundamento

La detección indirecta utiliza comúnmente anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP) que cataliza la oxidación de luminol a 3-aminofalato en presencia de peróxido de hidrogeno. Inmediatamente después de la oxidación del luminol, la molécula se encuentra en un estado excitado del que pasa a uno basal, reducido y más estable, a través de la emisión de luz a 425 nm, con un máximo de emisión después de 15-20 minutos de iniciada la reacción (Bass, et al., 2017; Universidad Nacional de Quilmes, 2008). Como el luminol es el reactivo limitante, la producción de luz finaliza a medida que se oxida (McPhee, 2010).

1.6.6.2 Métodos de detección

En la mayoría de los casos, para hacer la solución de trabajo, es decir, la que contiene los sustratos quimioluminiscentes de HRP, se mezclan volúmenes iguales de una solución de peróxido y una solución de sustrato que posteriormente se vierte en la membrana ya sondeada y lavada (0.1 mL/cm²) para incubarla por 1-2 minutos a temperatura ambiente. Después, a la membrana se le retira el excedente de sustrato y se le coloca en un protector de plástico, libre de burbujas de aire, y lista para el análisis mediante una película de rayos X o por cámaras CCD enfriadas (ThermoFisher, 2018), pudiendo observar sus ventajas y desventajas en la Tabla 6.

Tabla 6.

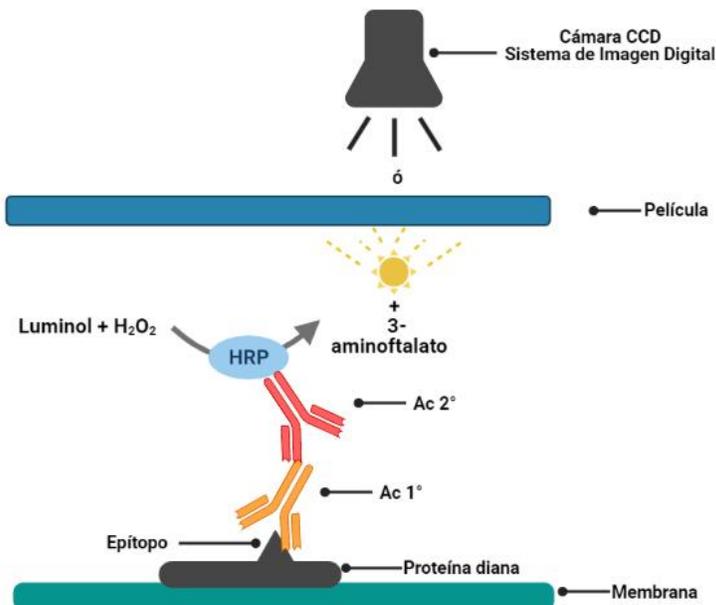
Métodos de detección quimioluminiscentes usados en Western Blot

	Película de rayos X	Cámara de Dispositivo de Carga Acoplada (CCD)
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> ▪Alta sensibilidad ▪Tiempos de exposición flexibles para detectar señales débiles 	<ul style="list-style-type: none"> ▪Mayor rango de detección ▪Alta sensibilidad ▪Proporción de imágenes semicuantitativas ▪Imagen digital producida
Limitaciones y Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> ▪Rango de detección estrecho ▪Requiere una habitación oscura ▪Mayor número de pasos para su preparación 	<ul style="list-style-type: none"> ▪CCD requiere medidas de enfriamiento ▪Necesita de software analítico

Adaptado de "Chemiluminescent Western Blotting Detection" por SinoBiological, s.f, <https://www.sinobiological.com/category/chemiluminescence-wb>

Figura 13.

Procedimiento de Quimioluminiscencia Indirecta



Adaptado de "Methodological considerations for improving Western blot analysis" por McPhee, D., 2010, p. 175.

La visualización de bandas puede tener diferentes propósitos analíticos; la presencia de éstas puede bastar para verificar la expresión de una proteína o bien, se puede examinar la densidad de bandas provenientes de diferentes muestras para demostrar una expresión relativa comparativa (Gavini & Parameshwaran, 2020), por lo que este último paso depende de los objetivos del estudio planteados. Al finalizar el análisis, las muestras de transferencia se lavan en un tampón como TBST, para eliminar cualquier reactivo de detección restante. Después de esto, es posible su almacenamiento a -20 o -70°C para su futuro uso, si se considera necesario (McPhee, 2010).

1.7 Presente y futuro del Western Blot

Las evoluciones en la metodología del Western Blot recaen principalmente en dos aspectos puntuales: 1) su flujo de trabajo lento y manual que puede tardar más de un día en producir resultados, siendo susceptible a errores en cualquiera de sus pasos, llegando a ser una técnica irreproducible incluso para un mismo analista; y 2) su capacidad meramente semicuantitativa. Para el primer caso se ha optado por agilizar la técnica a través de modificaciones en el protocolo original, creando técnicas únicas como, por ejemplo, el Ensayo de Inmunotransferencia Recombinante (RIBA) utilizado actualmente en el diagnóstico de la hepatitis C, el cual elimina la necesidad de separar proteínas y transferirlas a una membrana (Balmer, 2015); mientras que el paso del análisis semicuantitativo al cuantitativo se ha favorecido por la implementación de compuestos fluorescentes, películas de imágenes digitales o incluso anticuerpos primarios marcados directamente bajo protocolos de inmunotinción (Easthope, 2019).

No obstante, también se han implementado mejoras en prácticamente todo el ensayo con: electroforesis capilar y de microchip (MCE), reduciendo tamaño de muestra, con mayor sensibilidad e incluso evaluar varias proteínas a la vez; recubrimiento directo con película delgada con succión (TDCS), favoreciendo las reacciones antígeno-anticuerpo y, por tanto, acortando el tiempo de análisis; procesadores de transferencia automatizados que mitigan los riesgos de reacciones cruzadas a tiempos reducidos al eliminarse la preparación manual; y cambios en tampones y geles por casas comerciales que aumentan la reproducibilidad y fiabilidad del Western Blot, llegando incluso a ser implementado en la cuantificación de proteínas intracelulares sin lisar a la célula en cuestión, incrementando drásticamente el rendimiento (Singh, Gupta, Bharti & Sharma, 2021; Azure biosystems, 2017).

Capítulo 2. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

2.1 Historia

Aunque la mayoría de los expertos en HPLC sitúan los inicios de la técnica instrumental en la década de 1960, lo cierto es que su desarrollo y posterior aceptación y aplicación dentro de las ramas biomédicas e industriales partió desde el nacimiento de la cromatografía, recorriendo una serie de sucesos históricos que atraviesan poco más de 100 años de antigüedad hasta llegar a la actualidad.

1903-1906: Interesado por los pigmentos vegetales, en 1903 Mikhail Tsvet, un botánico ruso, hizo fluir un extracto de hojas junto con una combinación de éter de petróleo y etanol a través de una columna vertical estrecha de vidrio llena de carbonato de calcio finamente molido, logrando que la mezcla, a medida que pasaba por la columna, se fuera separando en bandas de colores individuales, eluyendo del sistema con relativa pureza. (Chromatography Today, 2014; Altova & Hargittai, 2021). Como dato adicional, en esa época únicamente se conocía a la clorofila y a la xantofila como responsables de la pigmentación en plantas, pero con el experimento de Tsvet se consiguió separar dos bandas verdes adjudicadas a los dos tipos de clorofilas vegetales existentes y ocho bandas más de colores anaranjados y amarillos, dados por los carotenoides y las xantofilas, respectivamente (Sack, 2016).

Posteriormente, en 1906 con la publicación de dos de sus artículos en una revista alemana, Tsvet utilizó por primera vez el término “cromatografía”, partiendo de las raíces griegas *chroma* (color) y *graphein* (escribir), para hacer alusión a su colorido experimento, en el cual se sentaron las bases de lo que luego se conocería como cromatografía líquida de absorción, además de introducir la utilización de columnas para la separación de mezclas (Hodson, 2020). Desafortunadamente, sus aportes pasaron desapercibidos a los ojos de la comunidad científica por distintas razones: las limitaciones y dificultades de los químicos de aquel entonces al trabajar con artículos escritos originalmente en idioma ruso, la desconfianza hacia la técnica por la replicación errónea de varios contemporáneos que conllevaba a malos resultados y el repudio hacia las poblaciones de Europa del Este ocasionadas por las tensiones geopolíticas de principios del siglo XX. Sin embargo, con el paso del tiempo fueron otorgados premios Nobel por descubrimientos apoyados en derivados de la cromatografía, pero por mucho que resulte irónico ninguno de ellos fue entregado al padre de la técnica a pesar de haber vivido más de una década después de su invento (Altova & Hargittai, 2021).

1941: el redescubrimiento de la técnica cromatográfica llegaría décadas más tarde cuando, en 1941, los químicos británicos Archer Martin y Richard Laurence Millington Synge publicaron su artículo “A new form of Chromatography employing two liquid phases”, donde se detalló la separación de acetaminoácidos empleando agua sobre columnas de sílice de fase estacionaria y cloroformo inmisible de fase móvil. Lo trascendente de su experimento se denota en dos puntos clave: 1) la utilización de fórmulas matemáticas que explican la eficacia de la resolución, siendo pioneros en considerar factores instrumentales que influyen en la separación cromatográfica como la longitud de columna, el uso de partículas de tamaño pequeño empaquetadas en la fase sólida y la aplicación de caudales de alta presión que empujen la fase móvil a través del sistema; y 2) la comprensión teórica y experimental de la distribución de los analitos entre ambas fases en función de su afinidad relativa hacia cada una, lo cual permitió la separación y recolección individual de los acetaminoácidos, sentando así uno de los fundamentos más importantes en el desarrollo posterior de la HPLC: la *cromatografía de partición*. Tanto fue el impacto de este trabajo que Martin y Synge fueron galardonados con el Premio Nobel de Química en 1952 (Majors, 2018; Robards & Ryan, 2022; Chromatography Today, 2015).

1965: en el artículo “Accelerated Microparticulate Bed Liquid Chromatography”, Elmar Piel documentó que había sometido a varios tipos de columnas empaquetadas a una exitosa extracción de tintes, reafirmando que las columnas de partículas porosas pequeñas, de tamaños oscilantes de 1 a 0.012 mm, proporcionan una resolución mayor cuando la fase móvil es empujada a altas presiones, siendo en este caso de 3500 psi impulsados por centrifugación, demostrando además que los ensayos cromatográficos demoraban únicamente algunos minutos en separar eficientemente a los analitos, siempre y cuando se cumplieran con dichas especificaciones. Cabe señalar que Piel fue de los primeros analíticos en utilizar a la alúmina dentro de las fases estacionarias, ya que antes se utilizaba casi exclusivamente a la sílice y al carbonato de calcio (Grinias & Majors, 2021).

1966: con el objetivo de analizar las propiedades iónicas de los aminoácidos, Paul Hamilton utilizó una bomba para impulsar una mezcla de disolventes a modo de gradiente y aplicando interacciones de intercambio iónico con resinas esféricas de 10 µm, logrando separaciones aún más rápidas a la par de indagar los efectos del tamaño de partícula y la química detrás de las fuerzas selectivas existentes entre las dos fases en estudios cromatográficos (Majors, 2018).

1967: al unificar todos los hallazgos previos y después de un par de intentos fallidos, la firma Waters Associates, una empresa que ofrece herramientas y sistemas analíticos a científicos,

lanzó a la venta el primer HPLC comercialmente exitoso bajo un sistema versátil equipado con una bomba de más de 500 psi y con detectores UV de 254 nm e índice refractario, el ALC100 HPLC. Si bien las ganancias financieras no fueron inmediatas, Waters poco tiempo después dominó ampliamente su mercado cuando, en una estrategia publicitaria, convencieron a Robert B. Woodward, un profesor en Harvard y posterior premio Nobel de Química, a utilizar el ALC100 en un trabajo relacionado con la separación de isómeros intermediarios en la síntesis de la vitamina B12, obteniendo resultados favorables y colocando a la HPLC como un instrumento imprescindible en el campo de la química orgánica (Majors & Baltrus, 2020; Arnaud, 2016).

1968: en la universidad alemana de Saarbrücken, Csaba Horváth desarrolló el concepto de partícula pelicular refiriéndose a perlas impermeables de vidrio de 45 a 60 μm recubiertas con una capa porosa delgada (de 1 a 2 μm) de un material adsorbente o de resina de intercambio iónico y, aunque la idea se planteó en sus inicios para ser aplicada dentro de la cromatografía de gases, se convirtió en el primer material de relleno en una columna de cromatografía líquida capaz de ser empaquetada en seco dentro de columnas de acero inoxidable de hasta 1 o 2 metros de longitud, otorgando una eficacia y velocidad significativamente mayor con respecto a las columnas abiertas rellenas anteriormente con grandes partículas porosas de sílice y alúmina, caracterizándose también por ser amigable con el medio ambiente (Majors, 2018; Arnaud, 2016).

Mientras tanto, la marca estadounidense Valco creó el sistema de inyección de 6 puertos al construir la válvula rotativa del mismo nombre, convirtiéndose en uno de los primeros avances en materia de reproducibilidad y automatización en los sistemas HPLC al eliminar técnicas de inyecciones manuales que involucraran la detención de la fase móvil, mejorando los tiempos de retención y la calidad en las cuantificaciones, perdurando dicha implementación hasta el día de hoy (Majors & Baltrus, 2020).

1969: la automatización de la técnica creció exponencialmente por Autolab, empresa también estadounidense que acopló el integrador de computación Autolab System IV con la idea de reemplazar los complejos planímetros y registradores con mecánica incorporada, primero en los equipos de cromatografía de gases y posteriormente en HPLC. Las mejoras en el registro de los datos incluyeron la detección de picos tangentes, corrección de la línea base y picos normalizados, posibilitando el empleo de factores de respuesta y estándares internos, lo que a su vez influyó en expandir y estandarizar su uso en el área clínica por brindar mayor cantidad de información sobre perfiles bioquímicos, desarrollar nuevas metodologías analíticas para ciertos compuestos y alentar a pruebas múltiples en simultáneo a grandes velocidades (Naka, 2021; Majors & Baltrus, 2020).

1971: la cromatografía de intercambio iónico es beneficiada a nivel comercial por Dionex Corp que lanzó columnas especializadas en la separación de iones y moléculas polares en función de su carga, reduciendo la conductividad de fondo y ampliando el uso de los detectores conductimétricos. Además, en ese mismo año, Cecil Tarbet presentó el primer monitor de longitud de onda variable acoplado a HPLC (Brown, 2021; Majors & Baltrus, 2020).

1974: el siguiente suceso en la automatización del instrumento ocurrió cuando la empresa Micromeritics diseñó el primer dispositivo de muestreo automatizado o *automuestreador*, siendo capaz de operarse a volúmenes y número de viales preestablecidos sin la necesidad de líquidos o jeringas adicionales, incrementando el rendimiento neto final y la capacidad de cuantificación, fungiendo adicionalmente como línea inicial en la fabricación posterior de productos automatizados (EVISA, 2010; Majors & Baltrus, 2020).

1977: se crea el primer detector de arreglo de diodos, el HP 8450A por la empresa Hewlett-Packard, trazado bajo un diseño multihaz y utilizado para incrementar el rango de longitudes de onda, así como para permitir el escaneo en todo el rango UV-Vis, contando con un excelente rendimiento al disminuir la señal de ruido. Tiempo después otras compañías producirían sus propios diseños, aunque todos tomando como base el HP 8450A (Majors & Baltrus, 2020).

1979: hacia finales de la década de los 70's el desarrollo de la HPLC tuvo uno de sus vuelcos más trascendentales en toda su historia con la llegada de las fases ligadas estacionarias, que constan de moléculas unidas covalentemente a partículas de sílice, donde el octadecilsilano, popularmente conocido como C18, fue y sigue siendo la molécula más conocida empleada en la naciente *cromatografía en fase reversa*, lo cual permitió una mejor separación entre compuestos muy similares debido a los múltiples subtipos de columnas C18 en función a la sílice subyacente, el área superficial o el tamaño de los poros, creando así una vasta gama de posibles interacciones con los compuestos que se desean separar (Buie, 2010; Arnaud, 2016).

1980's-1990's: la invención de las técnicas cromatográficas sin duda alguna robó protagonismo frente a otros métodos de separación, no obstante, los detectores empleados dejaban que desear pues constantemente existía la duda de que si la señal captada pertenecía únicamente al analito de interés o si se había dado la elución de más de una analito, aparte del hecho de que no siempre se percibían muestras que se encontraban en cantidades mínimas. Por esta razón, en la década de 1980 surgieron las llamadas "técnicas híbridadas", las cuales representan el acoplamiento de dos técnicas instrumentales, una de separación y otra

espectroscópica, siendo esta última la que daría la sensibilidad y especificidad a todos los ensayos realizados (Hirschfeld, 1980 en García de Marina & Yusá, 2016).

Por esto, gracias a un desarrollo gradual, más por evolución que por revolución, la HPLC ya era usada comúnmente en la separación de compuestos químicos al contar con nuevas y mejoradas técnicas de identificación, purificación y cuantificación, aunado a que los sistemas digitalizados y la automatización proporcionaron una comodidad sin precedentes. Algunos otros ejemplos de mejoras fueron el uso de partículas empaquetadas de 3 μm y presiones superiores a los 6000 psi que facilitaron la reducción en el tamaño de las columnas, ofreciendo más velocidad de separación sin la necesidad de aplicar los límites superiores de presión y con resultados fácilmente reproducibles al desarrollarse también un sistema de calidad que garantizase el correcto desempeño de los equipos (Arnaud, 2016; Buie, 2010).

2002-2004: la búsqueda de separaciones con eficiencias aún superiores originó que el tamaño de partículas empaquetadas fuera de tan solo 2 μm necesitando presiones de hasta 12,000 psi para hacer fluir la fase móvil a través del sistema, premisa que conllevó a la creación de la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) por Waters Associates. Aunque el sistema terminó siendo un éxito en todo sentido con aplicaciones industriales y biomédicas, lo cierto es que tuvieron que ser desarrolladas bombas que otorgaran tales presiones e instrumentos compatibles a las extremas condiciones de trabajo, rediseñando cada parte del sistema incluyendo la disminución de los volúmenes en el inyector, el refuerzo de todas las conexiones, el acortamiento de las columnas, el uso de detectores más pequeños y un análisis de datos de mayor velocidad (Majors, 2018; Arnaud, 2016).

2.2 Breve introducción a la cromatografía

La cromatografía es un método físico que permite la separación, identificación y determinación de diferentes especies moleculares a partir de una mezcla compleja. El término en realidad designa a varias técnicas y sistemas similares por lo que ha resultado un tanto difícil el definirlo rigurosamente (Skoog, West, Holler & Crouch, 2008). No obstante, en la definición dada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) se indica la característica primordial que está presente en todos los tipos de técnicas y sistemas cromatográficos: la distribución de los componentes a separar está entre dos fases, una que se encuentra en reposo conocida como **fase estacionaria** y otra que se mueve en una dirección definida, llamada **fase móvil** (Christian, 2009).

2.3 Generalidades

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución o HPLC por sus siglas en inglés (*High Performance Liquid Chromatography*) es una de las técnicas cromatográficas más utilizadas en la actualidad debido a su capacidad para separar analitos de distinta naturaleza que están presentes en una mezcla (Ospina & Hernández, 2018), siendo idónea para sustancias no volátiles o termolábiles.

Resulta útil como técnica preparativa o analítica pues permite al mismo tiempo la purificación, identificación y cuantificación del analito deseado que puede estar contenido en compuestos químicos orgánicos e inorgánicos, o inclusive en muestras biológicas (Reuhs & Rounds, 2009), de ahí que su campo de aplicación abarque áreas como la farmacéutica, bioquímica, alimentos, monitoreo ambiental, química forense, medicina clínica, productos de la industria química, entre otras (Zaldívar, 2022).

2.4 Principios

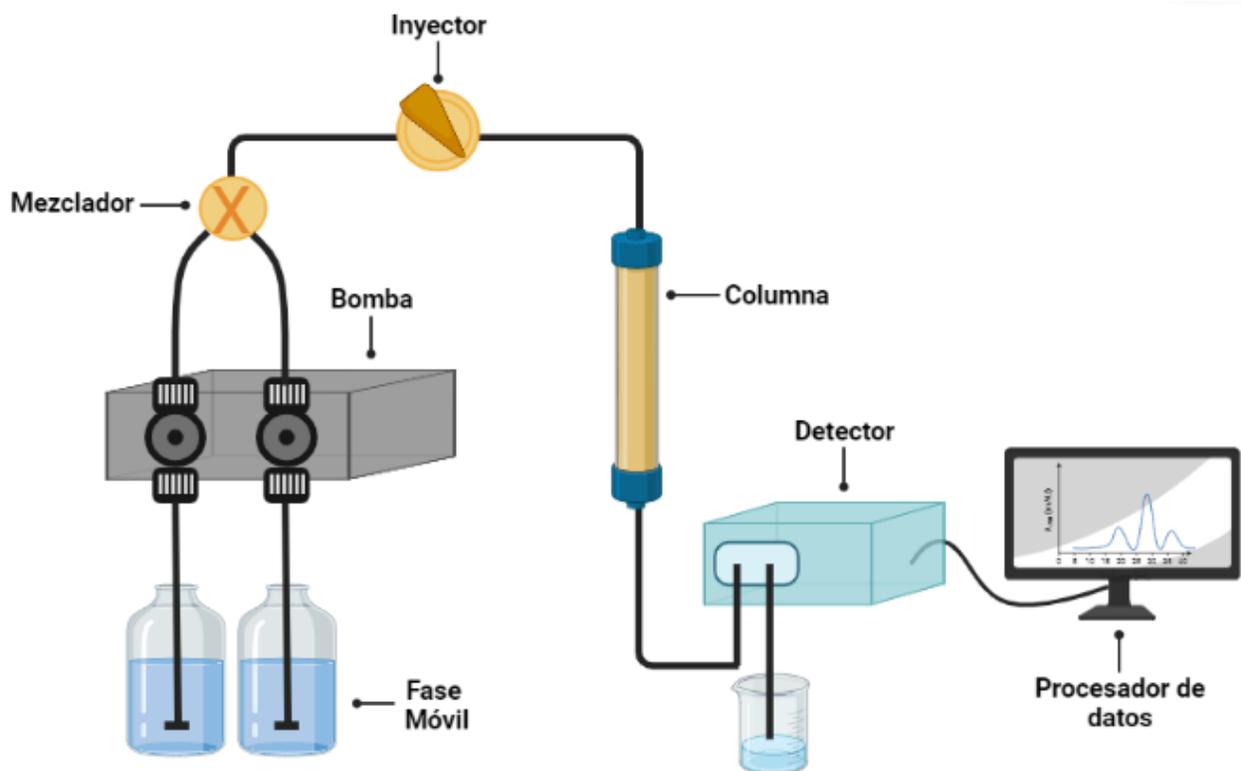
- ✓ Durante la HPLC participan la muestra a estudiar y las fases móvil y estacionaria que tienen la característica de ser inmiscibles entre sí.
- ✓ La fase móvil es líquida y su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida sostenida por un sólido inerte.
- ✓ Los analitos deben de ser totalmente solubles en la fase móvil para que ésta los pueda arrastrar compitiendo con la fase estacionaria.
- ✓ Los componentes con mayor afinidad a la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad, lo que generará diferencia de velocidades entre ellos y por lo tanto su separación.
- ✓ Las distintas fuerzas químicas y físicas que interactúan entre la mezcla de interés y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la muestra, entre las que se incluyen primordialmente:
 - a. Fuerzas de dispersión de London
 - b. Interacciones dipolo
 - c. Interacciones por puentes de hidrógeno
 - d. Interacciones electrostáticas (Ospina & Hernández, 2018; García de Marina & Yusá, 2016)

2.5 Instrumentación

La instrumentación de un cromatógrafo de HPLC siempre se compone de, por lo menos, cinco módulos conectados mediante tubería de acero u otros materiales resistentes: el sistema de bombeo de alta presión (compuesto por una o varias bombas), el inyector de muestras (manual o automático), la columna cromatográfica (con o sin precolumna), el o los detectores y el procesador de datos y, de hecho, es la complejidad del equipo de HPLC la responsable de la gran sensibilidad de la técnica, aunque también de su alto costo monetario, el cual puede incrementar si se acoplan módulos complementarios como horno de columnas o válvulas de automatización (Skoog, et al., 2015).

Figura 14.

Componentes básicos que constituyen un equipo de HPLC



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2022.

2.5.1. Bombas

Las bombas de HPLC impulsan a la fase móvil a través de la columna y al resto del sistema de una manera controlada, exacta y precisa. Más del 90% de las bombas que se emplean

actualmente son bombas alternativas, siendo las de doble pistón las más eficientes al reducir casi por completo las fluctuaciones en el flujo a diferencia de sus contrapartes de un solo pistón, las cuales producen un flujo discontinuo ocasionado por el movimiento del propio pistón que es incompatible con las especificaciones de la técnica, ya que los detectores del cromatógrafo de HPLC necesitan de un flujo constante y sin fluctuaciones (o únicamente con fluctuaciones mínimas) para reportar señales sin ruido de fondo (Reuhs & Rounds, 2017).

Además, para garantizar un correcto flujo de la fase móvil, las bombas necesitan generar presiones superiores a los 6000 psi, contar con velocidades de bombeo de 0.1 a 10 mL/min y ser resistentes a la corrosión por una variedad de disolventes, existiendo hoy en día en el mercado bombas de acero inoxidable, polímeros resistentes e inertes y pistones de zafiro; aunque su efectividad también puede ser complementada por filtraciones de la fase móvil con filtros de 0.45 o 0.22 μm , desgasificación de eluyentes mediante aplicación de vacío para eliminar burbujas o amortiguadores que supriman aún más las fluctuaciones (Moldoveanu & David, 2013).

2.5.2 Inyector

El inyector de muestras tiene la función de colocar la muestra problema en la fase móvil que fluye para que sea introducida en la columna cromatográfica. El método de inyección más utilizado se basa en un bucle donde la muestra puede colocarse dentro y fuera de la fase móvil simplemente cambiando una válvula. En primera instancia, la muestra se carga, con la ayuda de una jeringa, en un circuito externo a volumen fijo (normalmente de 10-100 μL) al mismo tiempo en que el eluyente fluye directamente y a alta presión desde la bomba a la columna; mientras que cuando la válvula cambia de posición, el circuito pasa a formar parte de la corriente de flujo del eluyente y la muestra es transportada hacia la columna (Reuhs & Rounds, 2017).

Sin embargo, se debe tener en consideración que el volumen de inyección se selecciona en función de factores tales como la sensibilidad del detector, la capacidad de carga de la columna y el efecto del solvente en la muestra; además de que los volúmenes de inyección demasiado pequeños pueden provocar problemas en la reproducibilidad o pérdidas en la columna cromatográfica, en tanto que los volúmenes demasiado grandes afectan la separación del analito. Para aumentar la reproducibilidad y la precisión, es posible automatizar los sistemas de inyección con software especializados que son capaces de trabajar con multitud de muestras contenidas en viales a distintos volúmenes según el contexto, permitiendo optimizar tiempo, aunque lo anterior tiene la gran limitante en que las muestras pueden perder estabilidad al estar desatendidas por mucho tiempo y presentar efectos de arrastre, el cual se define como la

contaminación de una muestra con pequeñas cantidades de los componentes de la muestra procesada anteriormente que permanecieron en el muestreador al ser inyectada (LaCourse & LaCourse, 2017; Reuhs & Rounds, 2017).

2.5.3 Columna

La columna es la parte esencial del cromatógrafo, ya que en ella tiene lugar la separación entre los analitos e interferentes a través de diferentes mecanismos como la absorción, partición, intercambio iónico, afinidad, etc. Generalmente son construidas con acero inoxidable o con paredes gruesas de polímeros como la polieterecetona (PEEK) que otorgan mejores rendimientos para analitos particulares, siempre siendo columnas rectas y con dimensiones que van desde 5-25 cm de longitud por 3-5 μm de diámetro interno. No obstante, el éxito y uso generalizado de HPLC se debe al desarrollo de una amplia variedad de materiales de relleno que se empaquetan dentro de la columna y sirve como soporte y fase estacionaria, siendo el gel de sílice el empaquetamiento más comúnmente utilizado (excepto cuando se trabaja en un rango de pH 2-7) debido a que cuenta con una buena estabilidad química, suficiente resistencia mecánica para soportar la presión generada durante su uso y la disponibilidad de una estructura bien definida con una distribución de partícula estrecha; aunque también se han desarrollado distintas resinas orgánicas sintéticas constituidas de microporos o una combinación entre micro y macroporos (Quito, 2015).

Es importante conocer las instrucciones del fabricante con respecto al mantenimiento, manipulación y limitaciones de cada columna para así mejorar su eficiencia, teniendo en consideración que las columnas se degradan fácilmente por la adsorción irreversible de impurezas de muestras y disolventes. Por lo tanto, es factible proteger la integridad de la columna analítica instalando guardacolumnas o precolumnas pequeñas (de 3-10 cm), las cuales contribuyen bloqueando la basura y materia sólida proveniente de la muestra que pudiesen ensuciar la columna, o bien, atrapando compuestos que se retienen muy fuertemente y que de otra manera quedarían atrapados en la columna analítica, sin diluirse. Por último, las precolumnas deben regenerarse o sustituirse cada cierto tiempo, aunque tienen la ventaja de que son mucho más baratas y accesibles que las columnas analíticas (Christian, 2009).

2.5.4 Detectores

Los detectores monitorean y traducen en señales eléctricas alguna propiedad espectroquímica o electrofísica del analito cuando éste eluye de la columna analítica, cuya señal es registrada en niveles proporcionales, pudiendo ser amplificada vía electrónica. A pesar de que

existe una gran diversidad de detectores, existen dos clasificaciones que engloban a todos: los detectores de propiedades a granel que responden a una propiedad general del eluyente (como el índice de refracción o conductividad) y los detectores de propiedades de soluto que responden a alguna propiedad específica del analito (como la absorbancia UV), siendo estos últimos hasta 1000 veces más sensibles que los de granel. Cabe mencionar que para que un detector sea afín a HPLC, debe de ofrecer una alta sensibilidad, buena estabilidad, contar con linealidad, tiempo de respuesta corto y confiabilidad, no causar destructividad y ser fácil de usar (Reuhs & Rounds, 2017).

Los principales detectores, utilizados en solitario o conectados en serie, son:

- ✓ **Detectores de absorbancia ultravioleta.** Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda, pudiendo utilizar un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector. Gracias a que es útil a una gran cantidad de compuestos orgánicos, a que es relativamente barato y a que funciona independientemente de la temperatura, es el detector más comúnmente empleado al participar en aproximadamente el 80% de las mediciones de HPLC.
- ✓ **Detectores de fluorescencia.** El principio de operación se basa en la irradiación con luz UV al componente de interés y la posterior medida de la luz fluorescente emitida por éste. Su selectividad es similar o incluso superior a la otorgada por el detector de absorbancia UV por el hecho de que existen menos compuestos que fluorescen que los que absorben, aunque esto va a depender de la intensidad de la fuente o la eficiencia cuántica del fluoróforo.
- ✓ **Detectores electroquímicos.** Responden a analitos que pueden oxidarse o reducirse, apoyándose de técnicas electroquímicas como son la amperometría, voltamperometría y coulombimetría. Estos detectores ofrecen grandes ventajas en cuanto a su especificidad, sensibilidad y amplia aplicabilidad, especialmente cuando se trabaja con compuestos orgánicos.
- ✓ **Detectores de refractómetro diferencial.** Mide cambios en el índice de refracción del eluyente causados por la presencia de solutos al salir de la columna, siendo el método casi universal de detección. A pesar de esto, cuentan con muchas desventajas empezando por el hecho de que es menos sensible que los otros detectores debido a que mide una propiedad a granel, además de ser muy sensible a los cambios de temperatura y ser obsoletos cuando se utiliza una elución en gradiente, ya que se altera el índice de refracción.

- ✓ **Detectores de conductividad.** Son los más utilizados cuando los solutos eluidos son iónicos, como ácidos y bases, así como cationes y aniones inorgánicos después de su separación por cromatografía de intercambio iónico. Son baratos y de larga duración, aunque no tan específicos al ser detectores de una propiedad a granel (Pássaro et al., 2016; LaCourse & LaCourse, 2017).

Tabla 7.

Propiedades de los detectores de HPLC

Detector para HPLC	Disponible comercialmente	Límite de detección de masa típico
Absorbancia	Sí	10 pg
Fluorescencia	Sí	10 fg
Electroquímico	Sí	100 pg
Índice de refracción	Sí	1 ng
Conductividad	Sí	100 pg-1 ng
Espectrometría de masa	Sí	< 1 pg
FTIR	Sí	1 µg
Dispersión de luz	Sí	1 µg
Actividad óptica	No	1 ng
Selectivo a elementos	No	1 ng
Fotoionización	No	< 1 pg

Modificado de Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, F. Settle (ed.). Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, 1997; E. S. Yeung y R. E. Synovec, Anal.Chem., 1986, 58, 1237A, en "Química Analítica" por Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. & Crouch, S.R., 2008, p. 991.

2.5.5 Procesador de datos

El procesador de datos es el último elemento en la cadena de instrumentación, encargándose de mostrar el cromatograma e integrar las áreas de los picos. Los paquetes de softwares son casi omnipresentes en el HPLC moderno y todos cuentan con herramientas muy potentes para la identificación y cuantificación de las muestras analizadas (Reuhs & Rounds, 2017).

2.6 Desarrollo y optimización de la técnica

Cualquier análisis químico que incluya HPLC sigue un esquema de: entrada ⇒ proceso ⇒ salida. La entrada consiste básicamente en esclarecer el o los objetivos del análisis, recabar información inicial sobre el analito de interés y seleccionar el procedimiento cromatográfico más adecuado, mientras que el proceso consta de varios pasos que pueden agruparse en la recogida de muestra, preparación de la muestra, análisis cromatográfico y procesamiento de datos, que finalizan con la obtención de resultados y el logro de los objetivos, los cuales conforman la salida (Moldoveanu & David, 2013).

2.6.1 Establecimiento de los objetivos

Antes de iniciar el desarrollo de un procedimiento cromatográfico, el grupo de trabajo debe tener en claro los objetivos que persigue el análisis ya que de esta manera se sientan las bases de lo que posteriormente se tiene que realizar al mismo tiempo que se consideran todos los aspectos importantes que conlleva la técnica como lo son:

- ✓ **Seguimiento de un protocolo específico debido a requisitos oficiales o legales.** Por este motivo se debe definir con qué intenciones se lleva a cabo el análisis: aseguramiento de la calidad de materias primas o productos terminados, control de procesos, evaluación de problemas ambientales, relacionados con la salud, con el área forense, o por investigación.
- ✓ **Elección del tipo de HPLC.** Depende de la disponibilidad del equipo y materiales específicos (columnas, disolventes, soluciones patrón), tiempo, costo, naturaleza y número de analitos a estudiar, restricciones relativas a la seguridad (propiedades intrínsecas y volumen de disolventes a eliminar) así como el nivel de capacitación que debe tener el operador.
- ✓ **Elección del tipo de detector.** Se debe conocer si se requiere medir la concentración del analito o es suficiente con detectar su presencia y en caso de optar por un estudio cuantitativo valorar la precisión con la que se obtendrán los resultados. Sin embargo, al igual que con el punto anterior, depende en gran parte de la disponibilidad del equipo.
- ✓ **Determinar si es necesario trabajar con toda la muestra o solo una fracción que esté purificada.** En ocasiones se requiere que el análisis no sea destructivo, mientras que en otros casos es preferible que la muestra tenga un tratamiento previo a su inyección en el equipo de HPLC para evitar posibles interferencias (Moldoveanu & David, 2013; Moldoveanu & David, 2015).

Algunos de estos puntos se discuten con mayor profundidad más adelante.

2.6.2 Recopilación de información relacionada con el analito

La información sobre los analitos a caracterizar o medir es otro componente importante en la planificación de un análisis debido a que ayuda no solo en la selección de la columna y la fase móvil, sino también en todas las decisiones relacionadas con el proceso, por lo que este apartado se complementa con el anterior (Moldoveanu & David, 2013). Así pues, resulta útil conocer:

- ✓ **Propiedades fisicoquímicas relevantes** como estado de la materia, estructura química, masa molecular, volatilidad, polaridad, solubilidad, liposolubilidad, termoestabilidad, constante de disociación ácida (pKa), rango de absorción UV-visible, índice de refracción, fluorescencia o fragmentación en un espectrómetro de masas.
- ✓ **Nivel estimado de los analitos en la muestra** (trazas, niveles medios o niveles altos por ser constituyente principal) para tomar decisiones sobre la sensibilidad requerida, así como la posibilidad de enriquecer la muestra en caso de que el analito esté presente en cantidades ínfimas.
- ✓ **Estabilidad del analito.** Le indica al operador si existe riesgo de obtener resultados subestimados o sobreestimados si no se cuenta con un procedimiento preventivo adecuado. Por ejemplo, en el caso de un bioanálisis, la actividad enzimática, temperatura, pH, entre otros pueden degradar el analito de interés, no obstante, se puede evitar con diferentes estrategias como la adición de inhibidores enzimáticos, antioxidantes, modificadores de pH, refrigeración o congelación.
- ✓ **Naturaleza de la matriz** (material orgánico, inorgánico, biológico o ambiental) para decidir si se necesita un nuevo método analítico o si se puede utilizar o adaptar uno ya disponible. Asimismo, se valora si es preferible realizar un tratamiento a la muestra dados los demás componentes que la constituyen.
- ✓ **Peligrosidad de la muestra.** Es otro aspecto que, aunque no se resalta mucho, es de suma importancia tenerlo en cuenta porque influye a poner en práctica las medidas de seguridad necesarias durante su manipulación (Moldoveanu & David, 2015; Li, Jian & Fu, 2019).

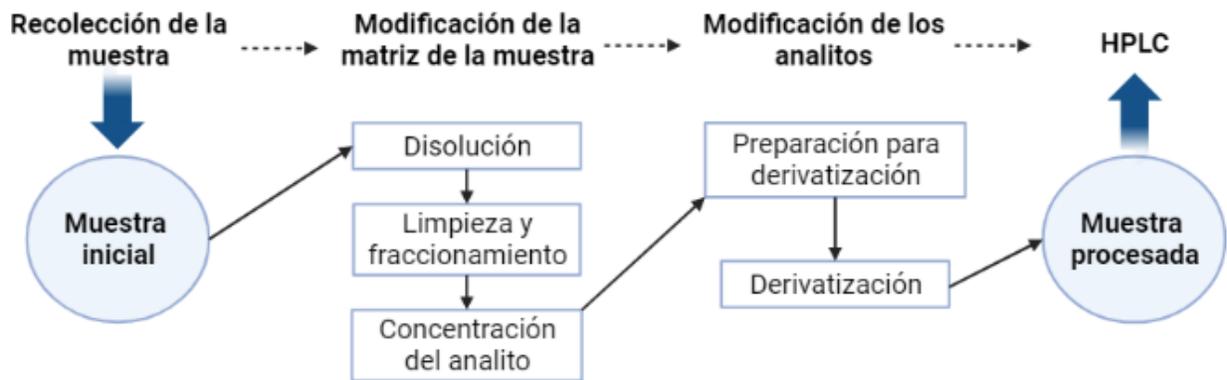
2.6.3 Preparación de la muestra

Definiendo el propósito del análisis y conociendo las características tanto del analito como de la muestra que lo contiene, se vuelve más fácil el seleccionar las técnicas de recolección, manejo, conservación, almacenamiento y, por supuesto, preparación de la muestra.

Para simplificar, la preparación se basa en realizar una serie de cambios en la matriz de la muestra, los analitos o ambos. Comúnmente, el inicio de este paso incluye la disolución de la muestra, seguido de una limpieza y fraccionamiento de la matriz con la subsecuente concentración de la muestra y de los analitos pudiendo estos últimos ser modificados por reacciones químicas (ej. derivatización) para obtener mejores propiedades en el análisis cromatográfico (Moldoveanu & David, 2013).

Figura 15.

Proceso de preparación de muestras para HPLC



Adaptado de "Essentials in Modern HPLC Separations" por Moldoveanu, S. & David, V., 2013, p. 15.

A continuación, se menciona un panorama general de los principales procedimientos de preparación de muestras en HPLC.

2.6.3.1 Disolución

Es de los procesos más simples, pero que a menudo no tiene éxito si no se selecciona el solvente adecuado; para evitar cometer este error se debe tomar en cuenta la diferencia de solubilidades y otros factores como la reactividad del solvente para discernir la compatibilidad con la fase móvil, posibilidad de solvolisis o interferencia en la derivatización, si es que se efectúa. Por otra parte, la disolución puede requerir de reacciones químicas (ej. digestión) o la implementación de procedimientos adicionales que ahorren tiempo: sonicación, disrupción celular, calentamiento, agitación, entre otros (Moldoveanu & David, 2015).

2.6.3.2 Precipitación

Se utiliza habitualmente para la eliminación de un componente de matriz indeseable o para la separación de analitos específicos. Es una buena opción dada su simplicidad, el reducido

número de reactivos ocupados y la recuperación o exclusión del precipitado por técnicas también sencillas como lo son la filtración o centrifugación. A pesar de esto, debe tenerse en consideración que se requieren grandes diferencias de solubilidad entre los componentes a separar para prevenir fenómenos de coprecipitación que puedan generar una contaminación. Adicionalmente, cuando los precipitados se forman como suspensiones coloidales, la coagulación puede ser difícil y lenta, en particular cuando se busca conseguir el aislamiento de una pequeña cantidad de fase sólida, por lo que también son puntos que deben considerarse al elegir este procedimiento (Rigo-Bonnin, Canalias-Reverter, Esteve-Poblador, Gella-Tomás, González-de la Presa & López-Martínez, 2017; Skoog, et al.,2008).

2.6.3.3 Filtración

Útil para la separación de mezclas heterogéneas compuestas por sólidos muy finos que no sedimentan con facilidad. El proceso puede estar impulsado por varias fuerzas como 1) presión mecánica utilizada en la filtración, microfiltración, ultrafiltración y osmosis inversa, 2) diferencia de potencial químico visto en la diálisis y osmosis inversa, y 3) migración en un campo eléctrico empleado en la electrodiálisis. Sin embargo, en HPLC las técnicas que se apoyan de la presión mecánica suelen ser las más frecuentes para la preparación de muestras las cuales se pueden clasificar de acuerdo con las dimensiones de las partículas retenidas por el filtro (Moldoveanu & David, 2015).

Tabla 8.

Rango de dimensiones de partículas separadas por presión mecánica

Fuerza de separación	10⁻⁴-10⁻³ μm	10⁻³-10⁻² μm	10⁻²-10⁻¹ μm	10⁻¹-10 μm	10-100 μm
Presión mecánica	Osmosis inversa	Ultrafiltración Osmosis inversa	Ultrafiltración Osmosis inversa	Microfiltración	Filtración

Adaptado de "Modern Sample Preparation for Chromatography" por Moldoveanu, S. & David, V., 2015, p. 93.

2.6.3.4 Extracción líquido-líquido

Usado con fines de separación selectiva. Se fundamenta en la partición de un soluto entre dos líquidos inmiscibles denominados fase acuosa (agua) y fase orgánica (disolvente no polar),

gobernada por la ley de distribución (Skoog, et al., 2008). Algunas de las variables que influyen en el método convencional son:

- ✓ **El disolvente extractante.** Las consideraciones para elegir un disolvente orgánico incluyen, entre otras, polaridad, solubilidad en agua, densidad, volatilidad, viscosidad, tendencia a formar emulsiones, toxicidad e inflamabilidad.
- ✓ **El pH de la muestra.** Cuando el compuesto a extraer presenta diferentes formas más o menos polares dependiendo del pH, se puede modificar éste para conseguir la máxima extracción de la especie neutra.
- ✓ **La relación existente entre el volumen de disolvente extractante y el de la fase acuosa.** Cuanto menor es la relación a un coeficiente de distribución, mayor será la concentración del analito en la fase orgánica; se suele emplear un volumen de agua grande y un volumen pequeño del disolvente
- ✓ **El número de extracciones realizadas.** Dependiendo del coeficiente de distribución del compuesto de interés, una sola extracción puede ser todo lo que se necesita para separar éste de manera efectiva. Por otra parte, si el compuesto tiene un bajo coeficiente de partición en el disolvente orgánico, es recomendable repetir el procedimiento dos, tres o más veces con nuevas cantidades de disolvente para optimizar su aislamiento o bien, se puede optar por cambiar el disolvente (Cortada-Cortés, 2012; Moldoveanu & David, 2015; Nichols, 2022).

Así que, modificando los parámetros anteriormente citados de acuerdo con el estudio ejecutado, la extracción líquido-líquido convencional puede resultar altamente eficaz. No obstante, hoy en día se prefiere llevar a cabo la miniaturización del método, en otras palabras, la microextracción líquido-líquido pues, además de disminuir el tiempo significativamente, reduce considerablemente el volumen de disolvente orgánico requerido (Cortada-Cortés, 2012).

2.6.3.5 Extracción en fase sólida

Diseñada para la preparación y purificación selectiva de uno o más analitos provenientes de una muestra líquida de la cual se separan en una fase sólida adsorbente mediante reacciones fuertes pero reversibles del tipo hidrofóbicas, polares o interacciones de intercambio iónico. La técnica es reconocida por su sencillez y reproducibilidad, aunque, al igual que la extracción líquido-líquido, no está exenta de tener variables experimentales que deben ser controladas para maximizar la eficiencia de las separaciones, siendo algunos ejemplos:

- ✓ **Naturaleza química del disolvente.** Con la finalidad de evitar posibles interacciones con el componente de interés, la elección del disolvente se basa principalmente en identificar grupos

funcionales, fuerzas iónicas, aromaticidad y polaridad, siendo características que se escogen posterior a la dilucidación de las propiedades exclusivas del analito.

- ✓ **pH del sistema.** La adición de sustancias ácidas, básicas o tampones que establezcan un pH específico posibilita la neutralización del analito para aumentar su afinidad por la fase sólida, o bien, la ionización de grupos funcionales del sorbente que propicien interacciones electrostáticas con cargas contrarias provenientes del analito, favoreciendo en ambos casos la calidad de la extracción.
- ✓ **Propiedades de la fase sólida.** La correcta actividad de superficie y un tamaño de partícula apropiado son las consideraciones más relevantes en cuanto a la fase sólida, la cual, a su vez, debe ser empaquetada de forma homogénea y libre de huecos y canales para asegurar la máxima eficiencia de contacto, retención, separación y recuperación de la muestra.
- ✓ **Mecanismo de salida.** Dependiendo de las directrices de cada metodología, el disolvente puede salir del sistema ya sea por fuerza de gravedad, presión positiva o sistemas al vacío, tomando mayor importancia las dos últimas ya que un ajuste incorrecto en sus caudales puede ocasionar que el disolvente se adhiera permanentemente al adsorbente o que eluya demasiado rápido sin haber existido siquiera alguna retención del analito a la fase sólida.

Una vez estandarizadas todas las variables experimentales, la extracción en fase sólida otorga al analista una alta selectividad, reproducibilidad, facilidad de uso y extracciones que por lo general no toman más de 30 minutos, asimismo brindan una buena recuperación cuantitativa con bajos requisitos y volúmenes de disolvente y una gran facilidad para la automatización. Cabe añadir que el amplio diseño de adsorbentes disponibles y los avances tecnológicos relacionados al empaquetado de fase sólida hacen que este tipo de extracción sea una técnica mucho más versátil y con mayor número de aplicaciones que su contraparte líquido-líquido (SiliCycle, 2021; Raynie & Watson, 2014; Schug, 2014).

2.6.3.6 Derivatización

Las reacciones de derivatización son aquellas en las que el analito de interés interacciona con un reactivo adicional para cambiar sus propiedades físicas y químicas con el objetivo de mejorar su detectabilidad. La eficiencia de este proceso depende meramente del método de detección a utilizar y de los grupos funcionales activos en el analitos que sean “candidatos” para derivatizarse (Agilent Technologies, 2013).

En el caso de una HPLC convencional, dichas reacciones consisten en la adición de grupos funcionales fluorescentes o cromóforos que permitan el análisis de la muestra a través de detectores UV-Vis. Sin embargo, la alta sensibilidad intrínseca y rápido poder de detección de las

técnicas cromatográficas pocas veces necesitan de un paso de derivatización previo, por lo que éste a menudo se utiliza como último recurso debido a que aumenta el tiempo de análisis, agrega un grado de complejidad a la técnica, propicia la aparición de errores e incrementa la posibilidad de añadir componentes no deseados que terminen sesgando los resultados (Agilent Technologies, 2013).

Conviene subrayar que la aplicación de los procedimientos mencionados puede dar lugar a una pérdida parcial del analito y, por otro lado, no todos permiten eliminar totalmente los distintos interferentes de la muestra siendo incluso necesario, algunas veces, la combinación de dos o más de estas técnicas. Asimismo, cabe recalcar que de no llevarse a cabo un adecuado tratamiento de la muestra es probable que se presenten diversos problemas tales como: obtención de señales erróneas en el detector, picos cromatográficos asimétricos o sobrepuestos, falta de reproducibilidad de los tiempos de retención, menor capacidad de detección, obstrucción o inclusive destrucción de alguna parte del equipo (inyectores, válvulas, columna, etc.). Por ello la finalidad de este paso radica en 1) eliminar o reducir interferencias, y 2) concentrar al componente de interés y si es posible mejorar sus propiedades de identificación, de tal manera que se consiga una apropiada separación y eficacia cromatográficas (Rigo-Bonnin, et al., 2017).

2.6.4 Selección del tipo de HPLC y modalidad de trabajo

Para realizar una adecuada separación cromatográfica, además de las características mencionadas en el apartado 2.6.1, también es necesario que exista un equilibrio entre las fuerzas intermoleculares de los tres participantes activos: el analito, la fase móvil y la fase estacionaria. Como consecuencia, cuando se desarrolla el procedimiento, debe seleccionarse el tipo de cromatografía líquida atendiendo a cuáles son las interacciones entre el analito y las diferentes fases (Rigo-Bonnin, et al., 2017), pudiendo clasificarse por lo general con base en su mecanismo de separación o según el tipo de fase estacionaria. Estos incluyen:

- ✓ **Cromatografía de reparto o de partición.** La fase estacionaria, mantenida en un sólido adecuado, es un segundo líquido que es inmisible con la fase móvil líquida, de tal forma que el soluto se reparte entre ambas fases de acuerdo con su solubilidad en cada una de ellas. Se puede subdividir en cromatografía líquido-líquido y cromatografía líquido-fase enlazada, siendo esta última la que predomina en la actualidad debido a su mayor estabilidad, compatibilidad con la elución en gradiente y disponibilidad de empacamientos con polaridades diferentes.

Es el tipo de HPLC más utilizado y en el que se distinguen dos modalidades de trabajo denominadas como “fase normal” y “fase inversa/reversa” que se fundamentan en las polaridades relativas de la fase móvil y estacionaria.

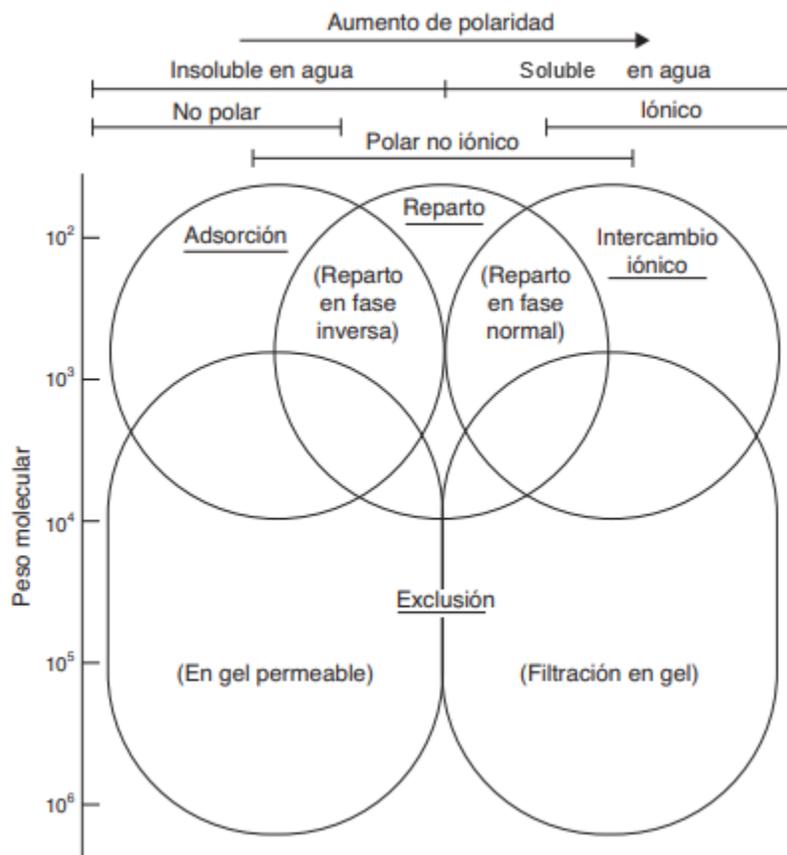
- **Fase normal.** Los primeros trabajos sobre cromatografía líquida empleaban fases estacionarias altamente polares, como trietilenglicol o agua, y un disolvente apolar o poco polar (hexano, tolueno, cloroformo) como fase móvil, razón por la cual con el paso del tiempo se le conoció como *cromatografía en fase normal*. En esta modalidad, los compuestos más polares quedan más tiempo retenidos en la fase estacionaria mientras que los menos polares eluyen primero.
- **Fase inversa.** Al contrario que la fase normal, esta se caracteriza por el uso de fases estacionarias apolares o poco polares, habitualmente cadenas hidrocarbonadas, y una fase móvil relativa o elevadamente polar (metano, acetonitrilo, tetrahidrofurano, agua). En este caso, los compuestos menos polares quedan más retenidos y los más polares eluyen en primer lugar. Se ha estimado que más de tres cuartos de todas las separaciones por HPLC se realizan por fase inversa al ser más versátil que otros tipos de cromatografía debido a su mecanismo de separación (Skoog, et al., 2008; Rigo-Bonnin, et al., 2017).
- ✓ **Cromatografía de adsorción o líquido-sólido.** Es la forma clásica de cromatografía líquida, capaz de diferenciar compuestos isómeros. El mecanismo de separación se basa en la retención mediante adsorción selectiva en la superficie de un sólido (sílice, alúmina) que constituye la fase estacionaria, donde las moléculas de soluto y disolvente (fase móvil) compiten por las posiciones en el adsorbente.
- ✓ **Cromatografía de intercambio iónico.** La fase estacionaria es una resina que contiene grupos cargados positiva o negativamente, teniendo la capacidad de separar especies iónicas. Los solutos de carga opuesta a la fase estacionaria son atraídos por ésta mediante fuerzas electrostáticas. Se suele utilizar con iones inorgánicos (zinc, hierro, nitritos) o analitos fácilmente ionizables (aminas biógenas, hemoglobinas).
- ✓ **Cromatografía de exclusión molecular.** También llamada de filtración o de permeación en gel por tener empacamientos hidrofílicos e hidrofóbicos, respectivamente. Se distingue porque la fase estacionaria está constituida por un polímero entrecruzado de tamaño de poro definido en el que las moléculas grandes, no compatibles con el tamaño del poro, siguen su avance mientras que las más pequeñas quedan retenidas en los intersticios del gel por tiempos mayores, siendo las últimas en eluir. Es una técnica poderosa y particularmente útil

para especies neutras de alto peso molecular, realizando la separación en función de su tamaño.

- ✓ **Cromatografía de afinidad.** La fase estacionaria es un sólido, como agarosa o perlas porosas de vidrio, que se une covalentemente a un reactivo llamado *ligando de afinidad* que no son más que moléculas que se unen reversible y selectivamente a las moléculas del analito, típicamente anticuerpos y enzimas. A diferencia de otros tipos de cromatografía, presenta la gran ventaja de ser extraordinariamente específica, siendo su uso primario el aislamiento rápido de biomoléculas durante el trabajo preparativo (Gismera-García, Quintana-Mani & da Silva-de Campos, 2009; Skoog, et al., 2008; Rigo-Bonnin, et al., 2017).

Figura 16.

Tipos de cromatografía líquida en función del peso molecular y polaridad del analito de estudio



Tomado de "Desarrollo de procedimientos de medida basados en la cromatografía líquida de alta resolución" por Rigo-Bonnin, R., Canalias-Reverter, F., Esteve-Poblador, S., Gella-Tomás, F.J., González-de la Presa, B. & López-Martínez, R.M., 2017, p.140.

2.6.5 Selección de la fase móvil y fase estacionaria

Tanto la fase móvil como la fase estacionaria juegan un papel relevante durante el proceso cromatográfico por lo que deben considerarse diferentes aspectos que se describen a continuación.

Por una parte, los factores principales que influyen en la selección de la fase móvil son:

- ✓ **El analito de interés.** El conocimiento de sus propiedades fisicoquímicas como la polaridad o la solubilidad son las que rigen su compatibilidad con la fase móvil, evitando a toda costa que exista reactividad entre ambos y produzca nuevos compuestos, precipitaciones, cambios de color, entre otros efectos.
- ✓ **La fuerza eluyente.**
- ✓ **El pH.** La concentración de H^+ en el sistema modula la ionización o no del compuesto seleccionado, siendo capaz de alterar la selectividad o la forma del pico cromatográfico a raíz de que una molécula ionizada intrínsecamente se hace más polar, ocasionando que su retención en la fase estacionaria, dependiendo de la naturaleza del empacamiento, sea menor o mayor, situación que ocurre en moléculas ácidas o básicas. Es por lo anterior que, a menos que se seleccionen fases móviles altamente apolares o neutras, resulta indispensable tamponar el sistema en un rango de pH que evite la ionización, lo cual es sencillo si se conoce el pKa de la molécula en cuestión, aunque hay que destacar que el buffer debe contar con una concentración adecuada que evite su precipitación en forma de sales y que además sea compatible con el detector acoplado a la cromatografía, garantizando su transparencia o nula absorción en detectores de espectro UV-Vis.
- ✓ **La modalidad de elución.** Existen dos modalidades de elución, 1) la isocrática que mantiene constante la composición de la fase móvil durante toda la separación y 2) en gradiente que varía la composición de los disolventes de la fase móvil a lo largo del análisis, mostrando este último un aumento en la eficiencia cromatográfica al disminuirse la anchura de los picos aun cuando se trabajan con muestras complejas.
- ✓ **La temperatura.** La viscosidad de la fase móvil se reduce cuando se trabaja a más de 40°C, ocasionado así que la tasa de transferencia de masa del analito entre la fase móvil y la estacionaria sea mayor al verse incrementada la velocidad de difusión, influyendo positivamente en la eficacia, la resolución y la separación cromatográfica.
- ✓ **La ausencia de gasificación.** El gas disuelto en cualquiera de los disolventes es propenso a salir de la solución en forma de burbujas e interferir en el funcionamiento del sistema de bombeo o del detector, por lo que la fase móvil elegida forzosamente requiere de algún

proceso desgasificador previo como lo es el rocío con helio o rondas en un sonicador, aunque esto puede ser obviado si el equipo de HPLC tiene incorporado internamente un mecanismo similar (Rigo-Bonnin et al., 2017; Agilent Technologies, 2019).

Para el caso de la columna, la elección está en función de las propiedades del compuesto que se pretende separar, tipo de HPLC y modalidad de trabajo, requisitos de la separación independientes de los analitos y la fase móvil como la velocidad y número de muestras a analizar, características de la fase móvil (tipo de elución, viscosidad, pH, contenido de agua) y de las propiedades específicas de la columna (Moldoveanu & David, 2013), las cuales dependen del:

- ✓ **Tamaño del poro.** Se basa en el tamaño de la molécula a analizar, siendo aquellas con masa molar inferior a los 2000 g/mol capaces de difundirse fácilmente por dentro y fuera de los rellenos con tamaño de poro estándar, el cual oscila entre 80 a 120 Å, pero en caso de trabajarse con analitos grandes, tales como péptidos o proteínas, es recomendable un tamaño de poro superior, llegando a ser hasta de 300 Å.
- ✓ **Empacamiento químico.** En la actualidad, hay gran variedad de columnas comerciales disponibles con diferentes tipos de empacamientos químicos (Tabla 9). Aunque la mayoría de los análisis cromatográficos parten de utilizar empaquetados largos de C18 o C8, siendo útiles cuando se busca retener compuestos polares a no polares o analitos con baja-media masa molar, se debe considerar el uso de empacamientos cortos, como ciano o fenilo, cuando se separen proteínas demasiado grandes o compuestos muy hidrofóbicos difíciles de eluir.
- ✓ **Tamaño de la partícula.** Es un parámetro que modifica el rendimiento de la separación y el tiempo de ésta. Por lo general, un tamaño de 2-3 µm ofrece una eficacia y rapidez considerable, aunque si se buscan separaciones complejas que involucren muchos componentes en la muestra entonces se podría elegir un tamaño de partícula menor a 2 µm, pero considerando que la presión operativa de la columna puede aumentar drásticamente, lo que requiere de cromatógrafos capaces de operar a dichas condiciones.
- ✓ **Diámetro interno de la columna.** Define la cantidad de masa o volumen que puede ser inyectado en la misma, en la que diámetros pequeños permiten un volumen de muestra limitado, pero ofrecen mayor capacidad de retención. En HPLC convencional, el diámetro de 4.6 mm es un tamaño suficiente para mantener resoluciones aceptables.
- ✓ **Longitud de la columna.** Está relacionado estrechamente con el tamaño de partícula, es un factor que condiciona la velocidad del proceso al otorgar análisis de 20-30 minutos cuando se emplean columnas de 100, 150 o 250 mm, o bien, tiempos aún menores al utilizarse longitudes 30, 50 o 75 mm empaquetadas con partículas que no sobrepasan los 3.5 µm (Rigo-Bonnin et al., 2017; Agilent Technologies, 2019).

Tabla 9.

Principales empacamientos químicos, tipo de cromatografía y modalidad de trabajo que suelen utilizarse en HPLC

Tipos de empacamientos químicos	Tipos de cromatografía	Modalidad de trabajo
C ₁₈ (octadecilo, "ODS")	Reparto	Fase inversa
C ₈ (octilo)	Reparto	Fase inversa
C ₆ (hexilo)	Reparto	Fase inversa
C ₄ (butilo)	Reparto	Fase inversa
C ₁ (trimetilsililo)	Reparto	Fase inversa
"Fenilo"	Reparto	Fase inversa
PFP (pentafluorofenilo)	Reparto	Fase inversa
CONH ₂ (amida)	Reparto	Fase inversa
CN (ciano)	Reparto	Fase inversa
		Fase normal
NH ₂ (amino)	Reparto	Fase inversa
		Fase normal
NH(CH ₃) ₂ (dimetilamina)	Reparto	Fase inversa
		Fase normal
Poliestireno	Reparto	Fase inversa
		Fase normal
Sílice	Reparto	Fase normal
(OH) ₂ (diol)	Reparto	Fase normal
NR ₄ (amina cuaternaria)	Intercambio iónico	-
SO ₃ (ácido sulfónico)	Intercambio iónico	-
CH ₃ NH ₂ (metilamina)	Intercambio iónico	-
COOH (ácido carboxílico)	Intercambio iónico	-
Polímeros/sílice específico	Afinidad	-
	Exclusión molecular	

Adaptada de "Desarrollo de procedimientos de medida basados en la cromatografía líquida de alta resolución" por Rigo-Bonnin, R., Canalias-Reverter, F., Esteve-Poblador, S., Gella-Tomás, F.J., González-de la Presa, B. & López-Martínez, R.M., 2017, p. 143.

2.6.6 Selección del sistema de detección cromatográfico

Algunos de los criterios que se toman en cuenta en la elección de un detector para una aplicación en particular son los siguientes:

- ✓ **Disponibilidad del equipo en el sitio de trabajo.**
- ✓ **Propiedades del analito.** Las características físicas y químicas, su concentración en la muestra, sus diferencias con otros componentes presentes, así como el resultado de la preparación de la muestra (analitos purificados, concentrados, derivatizados) suelen determinar la sensibilidad requerida y la implementación de los ajustes cuando se emplee,

por ejemplo, el uso de una longitud de onda de absorción para un detector UV-Vis o la configuración de una masa específica para monitorear por espectrómetro de masas.

- ✓ **Propósito del análisis.** Todos los detectores están diseñados para la obtención de mediciones cuantitativas, pero solo algunos están destinados a proporcionar información cualitativa que sea útil para la identificación de compuestos.

Cuando solo es necesario un análisis cuantitativo, la identificación del pico del compuesto conocido se puede realizar basándose solamente en el tiempo de retención, siendo la única preocupación una separación cromatográfica eficiente sin interferencias. Sin embargo, si se precisa de un análisis cualitativo en el que se requiere la confirmación de un compuesto, se deben utilizar técnicas como la espectrometría de masas o la espectrometría de masas en tándem que tienen diferentes modalidades de trabajo y por tanto más variables a considerar para mejorar la selectividad del detector.

- ✓ **Tipo de elución (isocrática o en gradiente).** Varios detectores, como el de índice de refracción, no son aplicables para la elución en gradiente o no responden idóneamente al cambio de composición de la fase móvil, causando cierta desviación en la línea base e inclusive diferencias en la sensibilidad en una composición de solvente u otro, favoreciendo en ocasiones la elección de una elución isocrática.

- ✓ **Propiedades de la fase móvil.** La fase móvil debe diferir de las moléculas eluidas en ciertas propiedades fisicoquímicas para evitar ser detectada al mismo tiempo que éstas: absorción UV, fragmentación molecular o índice de refracción. Además, otras particularidades a tomar en cuenta son la volatilidad, presencia de tampones salinos, pH, polaridad y la pureza ya que influyen en la sensibilidad, en el ruido de fondo y, para el caso de un espectrómetro de masas, en la eficiencia de la ionización.

- ✓ **Propiedades del detector.** Abarca características diversas entre las que destacan si el detector responde a la mayoría de los analitos (universales) o son específicos para una clase de compuestos por lo que tienen aplicabilidad relativamente limitada; alta sensibilidad, estabilidad de la señal, frecuencia de la medición por unidad de tiempo que asegura una evaluación precisa de la forma del pico, resistencia a ácidos y bases que pudiera contener la fase móvil, capacidad de ofrecer información cualitativa además de información cuantitativa (representadas por las áreas del pico en el cromatograma) y capacidad para ser utilizado en serie o en paralelo con otros detectores.

- ✓ **Facilidad de mantenimiento y operación.** Existen detectores que pueden ser propensos a problemas, generando cierta desviación o resultados no reproducibles ya sea por la antigüedad del instrumento, el fabricante, las condiciones ambientales o por una deficiente

limpieza del equipo. Por estos motivos, ciertos detectores requieren un mantenimiento especial de costo elevado y un mayor esfuerzo para establecer las condiciones de funcionamiento adecuadas, aunque también hay otros que son fáciles de operar y prácticamente no requieren ajustes llegando, en algunos casos, a sopesar las desventajas como la pérdida de sensibilidad o la falta de información cualitativa (Moldoveanu & David, 2013).

2.6.7 Relevancia de soluciones adicionales que participan en el análisis

Tal como se ha podido ver a lo largo de este capítulo, la característica principal de los equipos de HPLC es la medición de una magnitud física que es transformada en una señal eléctrica e interpretada en el sistema de registro y tratamiento de datos. Sin embargo, para llevar a cabo análisis que garanticen resultados fiables y válidos, además de calibrar los aparatos y darles un buen mantenimiento cada cierto periodo de tiempo, muchas veces también resulta necesario recurrir al uso de soluciones de pureza elevada y soluciones estándar puesto que:

- ✓ **El uso de reactivos grado HPLC** es una de las condiciones más elementales en todo el proceso cromatográfico, partiendo de que la preparación de la fase móvil, soluciones patrón y demás soluciones suelen utilizar reactivos genéricos de elevada pureza, comúnmente mayor al 99%, para evitar que se comprometa la medición de la magnitud al disminuirse la capacidad de detección, o bien, el buen funcionamiento del equipo, ya que el uso de reactivos de dudosa procedencia pueden ocasionar la obstrucción de las cánulas, tubos, válvulas, inyectores o detectores. Es por eso que, en medida de lo posible, siempre se deben utilizar materiales y reactivos provenientes de casas comerciales de reputación aceptable.
- ✓ **Los estándares internos** son principalmente utilizados en sistemas cromatográficos con una finalidad cuantitativa, corresponden a compuestos de concentración conocida con diferentes tiempos de retención que se agregan a la muestra y demás materiales de control para reducir errores atribuibles a la preparación de la muestra o que afecten al sistema cromatográfico, como aquellos generados en el pipeteo, efecto matriz o fluctuaciones en la señal eléctrica.
- ✓ **Los estándares externos** son empleados en la construcción de curvas de calibración tomando como referencia algún parámetro del cromatograma, como el área del pico o su altura, frente a la concentración conocida del propio estándar, cuyo propósito sea cuantificar analitos problema ajustando su elución a la curva construida (AGQ Labs, 2017; Centro Español de Metrología, 2018).

2.7 HPLC acoplada a otras técnicas

Para obtener más información sobre las muestras estudiadas, el eluyente de un sistema de HPLC se puede pasar a un segundo instrumento analítico, como infrarrojos (IR), resonancia magnética nuclear (NMR) o espectrómetros de masas (MS) (Reuhs & Rounds, 2009). Sin embargo, como son técnicas tan distintas, se exige una interfaz de trabajo sofisticada en la que se garantice que no se descomponga ni altere el analito durante el proceso. Cumpliendo con lo anterior, la técnica hibridada otorga un análisis confiable, con gran selectividad y sensibilidad, de muestras complejas, trazas, analitos desconocidos, etcétera, obviando la duda de una posible coelución (García de Marina & Yusá, 2016).

La integración del Espectrómetro de Masas a un equipo de HPLC es, sin lugar a duda, el más extendido y utilizado, por lo que se abordará más a fondo.

2.7.1 HPLC acoplada a Espectrometría de Masas

La combinación de la HPLC y la espectrometría de masas, abreviado como LC-MS por *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* y por su traducción al español como Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas, ofrece una poderosa técnica analítica que une la cromatografía como técnica de separación, y la espectrometría de masas como técnica de detección, identificación y cuantificación para compuestos orgánicos/organometálicos (Universidad de Burgos, 2020). Entre las ventajas que ofrece esta técnica hibridada podemos encontrar que se logra una alta selectividad, ya que los picos no resueltos se pueden aislar al monitorizar solo una masa seleccionada; puede proporcionar la “huella digital” de un eluyente específico, en lugar de basarse en el tiempo de retención, como en la HPLC convencional. Además, la combinación permite tener información de masa molecular y estructural, así como análisis cualitativos y cuantitativos precisos en cantidades de picogramos (Skoog, et al., 2008), aunque algo importante que se debe tomar en cuenta para la sensibilidad del análisis por LC-MS es que va a depender tanto del analito que se trate como de la interfase empleada.

2.7.2 Principios

La detección cromatográfica a través de MS se fundamenta en la separación de los fragmentos de los analitos que, al salir del sistema de HPLC y entrar en contacto con la interfaz del espectrómetro, son convertidos en fase gaseosa y cargados eléctricamente, para posteriormente ser transferidos a un analizador de masas donde se clasifican los iones en base a su relación masa-carga (m/z) (Urban, 2016). Finalmente, los iones separados llegan a un

detector y producen una señal eléctrica que es ampliada, procesada y registrada en un ordenador, dando lugar al correspondiente espectro de masas que no es más que la representación gráfica de la intensidad de la señal (abundancia de iones detectados) frente a la relación m/z (García de Marina & Yusá, 2016; Universidad de Burgos, 2020). En pocas palabras, el espectrómetro de masas produce, separa y detecta iones en fase gaseosa.

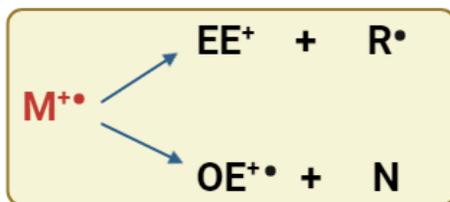
Cabe mencionar que las partículas detectadas pueden corresponder a las moléculas originales, sus fragmentos u otras especies formadas durante el proceso de ionización como consecuencia de la ganancia/pérdida de electrones o atracción/separación de especies con carga positiva, por ejemplo, los protones (Urban, 2016). Generalmente se trata de cationes radicales que tienen un número impar de electrones y pueden dividirse para dar lugar a un radical y un ion con un número par de electrones, o una molécula y un nuevo catión radical (de Hoffmann & Stroobant, 2007).

Figura 17.

Ionización y especies ionizadas que se pueden detectar en MS



1. La molécula (M) es bombardeada con electrones; la energía del rayo electrónico es capaz de retirar un electrón de la molécula para generar un catión radical ($M^{+\bullet}$), es decir, un ión con carga formal positiva y un e^- desapareado, representado por el signo de más y el punto, respectivamente.



2. Este nuevo ión se puede fragmentar por exceso de energía electrónica que se convierte en energía vibracional interna capaz de romper los enlaces entre los átomos, produciendo un ión con un número par de e^- (EE^+ por *even electron*) y un radical (R^\bullet) no cargado, o bien un nuevo catión radical ($OE^{+\bullet}$ por *odd electron*) y una molécula (N).

Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2022.

2.7.3 Instrumentación

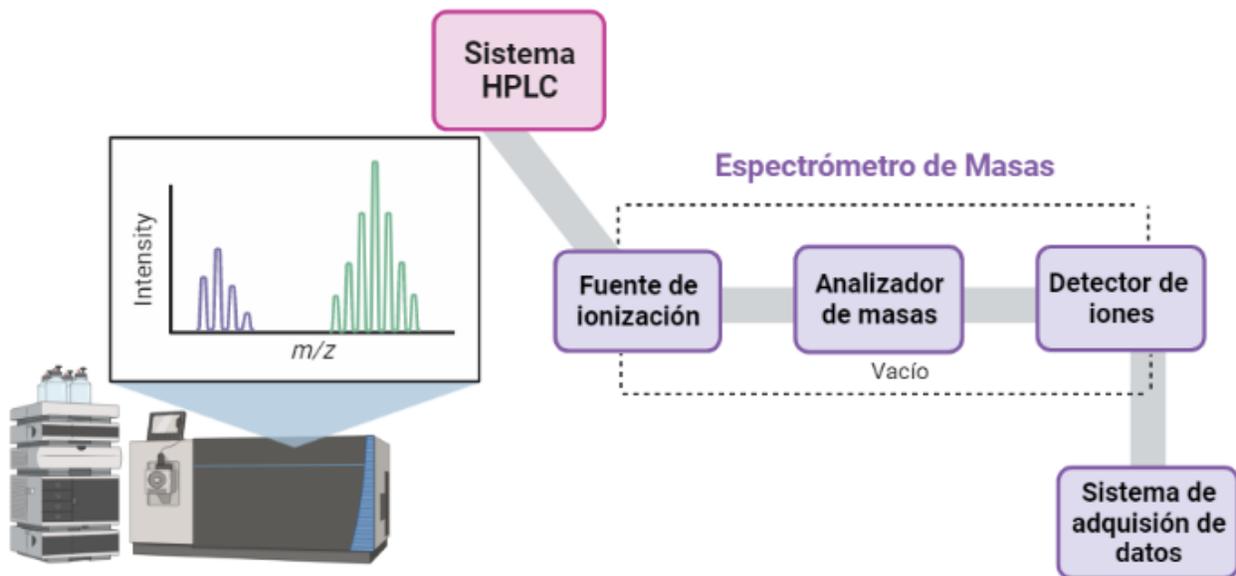
Un espectrómetro de masas consiste en tres partes principales: una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector, los cuales se encuentran en una atmósfera de vacío para mantener una baja presión y asegurar una frecuencia de colisión relativamente baja entre las

diferentes especies químicas que se encuentran en el equipo pues es esencial para la producción y mantenimiento de iones y electrones libres. Sin embargo, no todas las fuentes de ionización trabajan en un sistema al vacío ya que existen algunas en donde el proceso de generación de iones se produce a una presión atmosférica o superior (Skoog, et al., 2008; Urban, Chen & Wang, 2016).

Por otro lado, todas estas partes se complementan con una serie de componentes auxiliares, incluidas interfaces para el preprocesamiento y la introducción de muestras, elementos ópticos de iones para manipular haces de iones y sistemas electrónicos de adquisición de datos (Urban, et al., 2016). De igual manera, en muchos equipos LC-MS también se opta por montar un detector UV-Vis (arreglo de diodos o espectrofotométrico) para tener una visión familiar de los analitos eluidos (García de Marina & Yusá, 2016).

Figura 18.

Partes que conforman un sistema LC-MS



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2022.

Se debe tomar en cuenta que las dos decisiones instrumentales iniciales que juzgan adecuado o no un equipo LC-MS para una investigación y muestra dada son el tipo de ionización que se usa y el analizador de masas que posee (García de Marina & Yusá, 2016).

2.7.3.1 Interfaz / Fuente de ionización

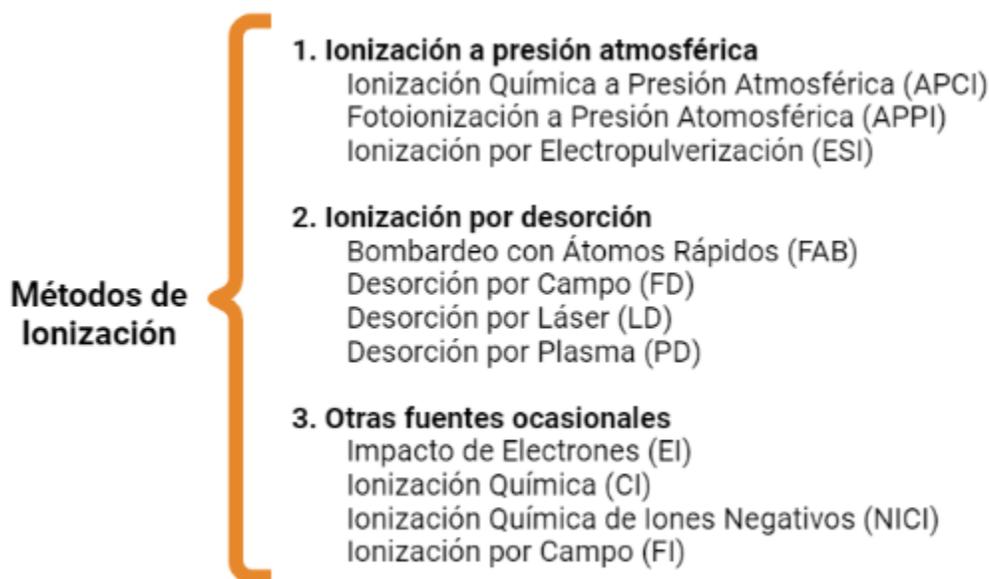
La interfaz une el espectrómetro de masas con el sistema de HPLC mediante un tubo capilar de sílice, acero o PEEK que está dispuesto perpendicularmente al espectrómetro, en una geometría ortogonal de 90° (García de Marina & Yusá, 2016).

Como se mencionó, la interfaz a menudo se integra con la fuente de iones y por lo general es difícil hacer una clara distinción entre ambas, razón por la cual se toman como sinónimos pues su función es la misma: introducir, ionizar y fragmentar los analitos procedentes del equipo de HPLC, además de facilitar su transferencia de la fase condensada a la fase gaseosa o semigaseosa (Urban, et al., 2016).

Existen muchos métodos de ionización disponibles (Figura 19) y cada uno tiene sus propias ventajas y limitaciones, pero los más empleados en LC-MS son la Ionización por Electropulverización (ESI), Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI) y Fotoionización a Presión Atmosférica (APPI) (SHIMADZU, 2019).

Figura 19.

Métodos de ionización



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2022.

2.7.3.1.1 Ionización por Electropulverización (ESI)

La ionización por electropulverización hace referencia al proceso de generación de iones gaseosos a partir de la pulverización de una solución bajo un alto potencial eléctrico y a presión atmosférica. Para lograr esto, el equipo consta de dos electrodos: un capilar de acero inoxidable que funge como ánodo y una placa de apertura de muestreo de presión atmosférica que sirve como cátodo o contraelectrodo, estando conectados entre sí a través de una fuente de alimentación de alto voltaje de ± 6 kV (Gibson, 2014).

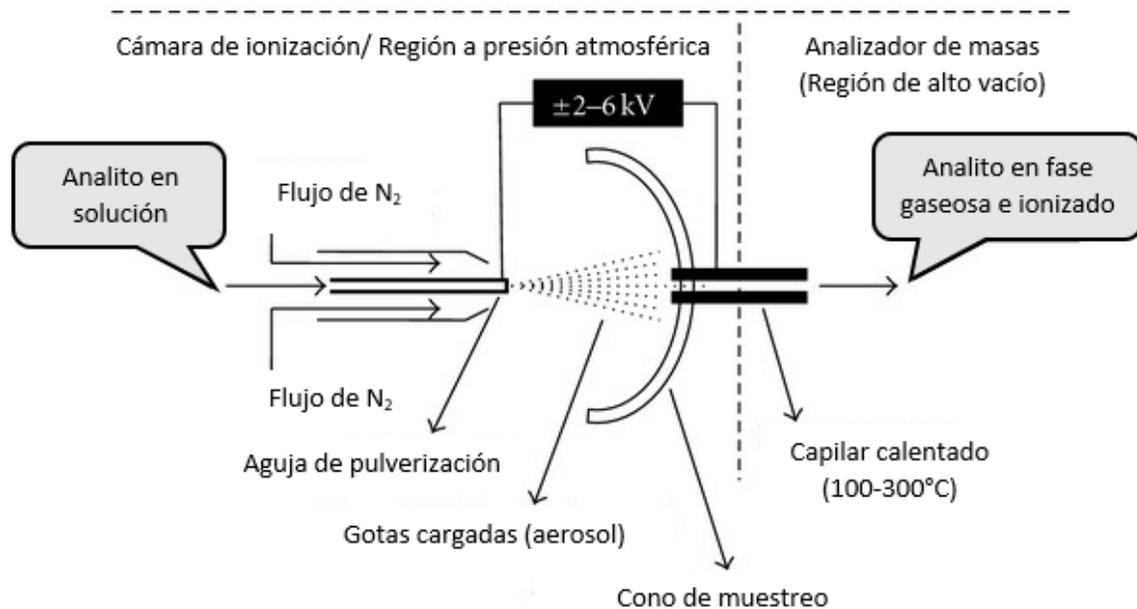
En una ESI típica, el analito de interés, disuelto en un disolvente polar volátil, es inyectado dentro del capilar de metal y bombeado a caudales bajos (1-20 $\mu\text{L}/\text{min}$) para que cuando esté cerca de la punta, se exponga al campo eléctrico y provoque la polarización del analito por reacciones de oxidación que ocurren en la interfaz del líquido con el capilar, protonando así a la molécula. Por ejemplo, en el caso de péptidos y proteínas el extremo N-terminal y los residuos de histidina, arginina o lisina son candidatos que suelen protonarse (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, 2015; Gibson, 2014). De esta forma, mientras están bajo la influencia del alto campo eléctrico aplicado, los iones positivos presentes en la solución se comienzan a concentrar en demasía cerca de la superficie del menisco del capilar, mientras que los iones negativos son alejados. Este fenómeno de polarización provoca que las cargas positivas comiencen a repelerse entre sí hasta que superen la tensión superficial del líquido y distorsionen al menisco, el cual se alargará en una forma cónica que apunta hacia abajo a raíz de la atracción existente que el contraelectrodo ejerce sobre los cationes, generando el llamado Cono de Taylor. (Bonvin et al., 2012)

Cuando se forma el Cono de Taylor, se crea una capa superficial delgada que va hacia el contraelectrodo y es lo que recibe el nombre de *electrospray*, que no es más que un fino rocío de pequeñas gotas altamente cargadas de una sola polaridad (Jayo, 2014). Mientras viajan, las gotas experimentan numerosos procesos de desolvatación debido a la evaporación que sufre el solvente por acción del calor de la atmósfera circundante de un cono de muestreo adjunto a un capilar caliente (100-300°C) y por un flujo de N_2 posicionado en los alrededores del primer capilar, el cual también ayuda a dirigir el rocío hacia el analizador de masas (Banerjee y Mazumdar, 2012). En consecuencia, el radio de las gotas va disminuyendo simultáneamente al aumento en la cercanía de las cargas positivas hasta que se excede un valor crítico, llamado límite de Rayleigh, donde las repulsiones entre los iones superan las fuerzas cohesivas de la tensión superficial de la gota, conduciendo a su inestabilidad y posterior “explosión” a gotas secundarias más pequeñas, las cuales sufrirán el mismo proceso y comenzará de nueva cuenta el ciclo, continuando de forma

sucesiva hasta que lleguen únicamente las especies ionizadas en forma gaseosa al analizador (Davidson, 2017).

Figura 20.

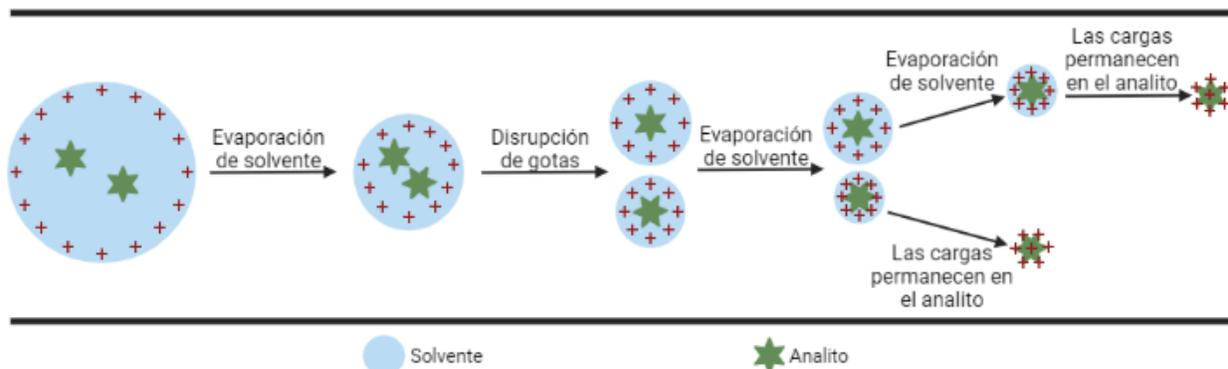
Esquema de ESI



Modificado de "Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte", por Banerjee, S., & Mazumdar, S., 2012, p. 4.

Figura 21.

Mecanismo de ionización en ESI



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2022.

ESI funciona bien con moléculas moderadamente polares a altamente polares, poco volátiles, termolábiles y de bajo a alto peso molecular, siendo bastante útil y adecuada para el análisis de muchos metabolitos, xenobióticos, oligonucleótidos, proteínas y péptidos, por lo que se considera la fuente de iones más utilizada para moléculas biológicas, aunque es probable que las moléculas neutras y de baja polaridad, como los lípidos, no se ionicen de manera eficiente con este método (Pitt, 2009).

Se considera una fuente de ionización “suave”, lo que significa que se imparte relativamente poca energía al analito y por tanto se produce poca fragmentación (Pitt, 2009). A diferencia de otros métodos de ionización en la que solo se consiguen iones monocargados, mediante ESI es posible obtener especies iónicas de biopolímeros multicargadas (Quintela, Cruz, Concheiro, De Castro & López-Rivadulla, 2005).

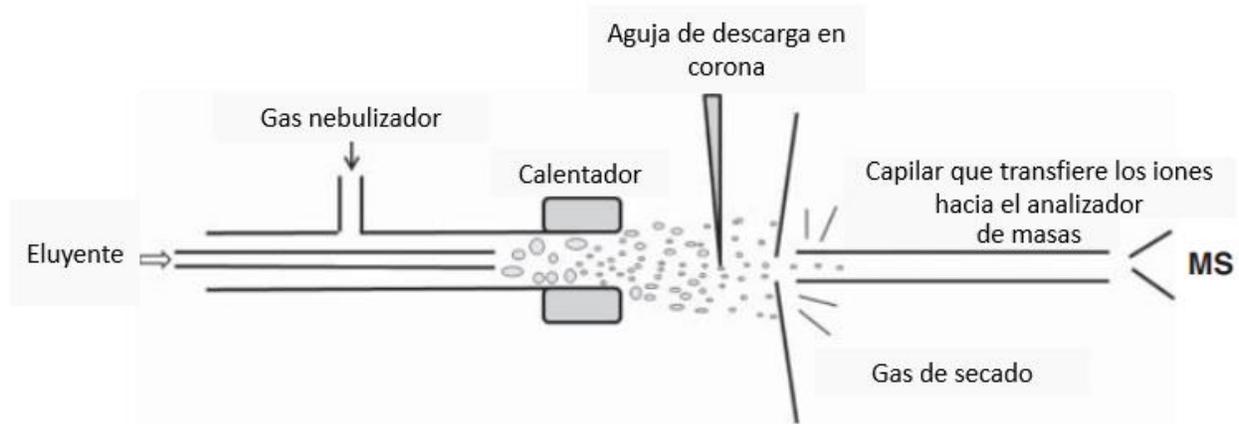
2.7.3.1.2 Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI)

APCI es un método de ionización que utiliza reacciones ión-molécula en fase gaseosa y a presión atmosférica. Se puede acoplar con cromatografía líquida debido a su tolerancia a las altas velocidades de flujo de las fases móviles, 0.2-2.0 mL/min, que se usan comúnmente en HPLC (de Hoffmann & Stroobant, 2007).

En este método, el eluyente se introduce coaxialmente en un nebulizador neumático donde se convierte en una fina niebla a través de un haz de N₂ de alta velocidad que rápidamente es desplazada a un tubo de cuarzo calentado a temperaturas elevadas (300-500°C) con la finalidad de que tanto la fase móvil como la muestra se vaporicen (de Hoffmann & Stroobant, 2007). Cuando abandonan el tubo, se encuentran con una aguja metálica a la que se le aplica un voltaje entre 2-6 kV para formar una zona o nube de descarga en corona y así lograr la ionización de los compuestos; los iones primarios se generan a partir de los componentes del aire, principalmente nitrógeno y oxígeno, dando lugar a cationes radicales que después reaccionan con el vapor del solvente para producir iones secundarios que actúan como donantes de protones durante la ionización posterior de los analitos (reacción ión-molécula) (Urban, et al., 2016). En modo iónico positivo, se forman moléculas protonadas y aductos con cationes mientras que, en modo negativo, se forma la especie desprotonada y la combinación con aniones o la captura electrónica (Quintela, et al., 2005).

Figura 22.

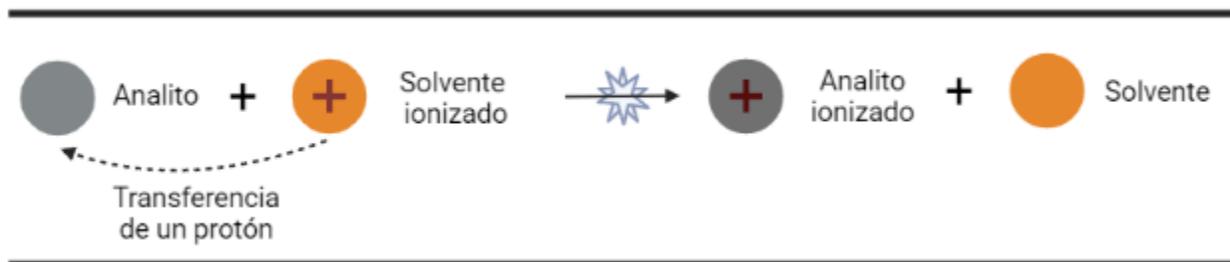
Esquema de APCI



Modificado de "Time-Resolved Mass Spectrometry" por Urban, P.L., Chen, Y.-C. & Wang, Y.-S., 2016, p. 18.

Figura 23.

Ejemplo de reacción ión-molécula que ocurre en APCI



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2022.

Su aplicación abarca principalmente compuestos polares y relativamente no polares con un peso molecular moderado de hasta aproximadamente 1000 Daltons siempre que la afinidad protónica de los analitos sea mayor que la de los disolventes. Se considera un método de ionización suave que regularmente produce iones monocargados, registrando solo unos cuantos iones fragmentados. No obstante, la descomposición del analito puede ocurrir debido al calentamiento, por lo que no es una buena opción de uso para muestras que no son térmicamente estables (Urban, et al., 2016).

2.7.3.1.3 Fotoionización a Presión Atmosférica (APPI)

APPI es de las más recientes fuentes de ionización a presión atmosférica que han sido desarrolladas y, de hecho, se considera como una fuente APCI modificada, solo que la principal diferencia es el uso de una lámpara de descarga que emite fotones en lugar de la aguja metálica de descarga en corona que emite electrones (de Hoffmann & Stroobant, 2007).

En este método, similar a lo que sucede con APCI, el eluyente se vaporiza con la ayuda de un gas nebulizador (como N_2) y un calentador. Posteriormente el analito ingresa a una cámara de ionización a presión atmosférica donde las moléculas se exponen a radiaciones fotónicas que son emitidas por el uso de lámparas de descarga de corriente continua de kriptón (Kr-DC) o de radiofrecuencia de kriptón de baja presión (Kr-RF), cuyas radiaciones son elegidas en base a que sean lo suficientemente altas para ionizar a las moléculas objetivo, y al mismo tiempo lo suficientemente bajas como para no ionizar el gas atmosférico y otras moléculas no deseadas, como los solventes que contienen la muestra de interés (metanol, agua, acetonitrilo), permitiendo la formación selectiva de iones y la reducción considerable del ruido de fondo (Wang, 2015). Cabe resaltar que las lámparas de Kriptón emiten fotones a 10.0 y 10.6 eV y la mayoría de los analitos poseen energías de ionización entre 7.0 y 10.0 eV, mientras que la mayoría de los solventes y los componentes del aire tienen energías de ionización por arriba de los 10.8 eV, razón por la cual este tipo de lámparas son la mejor opción comparadas con las de Xenón y Argón que emiten fotones a 8.4 y 11.2 eV, respectivamente (de Hoffmann & Stroobant, 2007).

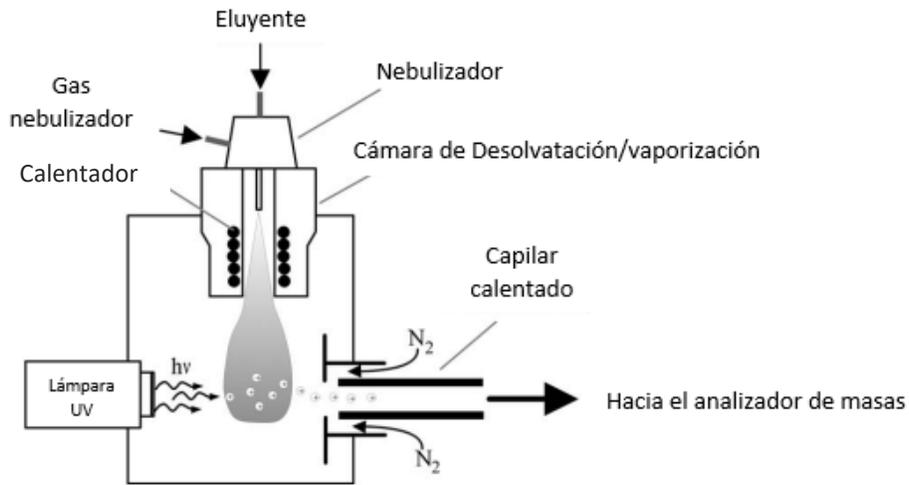
Una vez que se exponen a los fotones, las moléculas del analito se pueden ionizar de dos formas: directamente o con asistencia de agentes dopantes. En la primera, la ionización sucede porque el potencial de ionización de la muestra es menor a la energía del fotón, por lo que su absorción excita a la molécula y cambia el estado energético de un electrón que a posteriori se perderá, creando un catión radical que continuará por el espectrómetro de masas gracias a su carga positiva (McKenna, 2021; Grimalt, 2010). Sin embargo, un inconveniente que caracteriza a este procedimiento es su débil eficiencia puesto que el solvente puede absorber fotones para producir fotoexcitación sin ionización, lo cual reduce el número de fotones disponibles para la ionización directa de la muestra (de Hoffmann & Stroobant, 2007).

En la segunda forma los agentes dopantes, es decir, compuestos con una energía de ionización más baja que la energía de los fotones emitidos por la lámpara, como la acetona (8.83 eV) y el tolueno (9.70 eV), son los que reciben los fotones, se ionizan fácilmente y facilitan la ionización de los analitos ya sea mediante la donación de protones al analito o por el recibimiento

de un electrón de éste (McKenna, 2021; Grimalt, 2010; Urban, et al., 2016). En este procedimiento el dopante suele estar en concentraciones relativamente más altas que la muestra, observándose un aumento en la eficiencia de ionización de 10 a 100 veces en comparación con la ionización directa (de Hoffmann & Stroobant, 2007).

Figura 24.

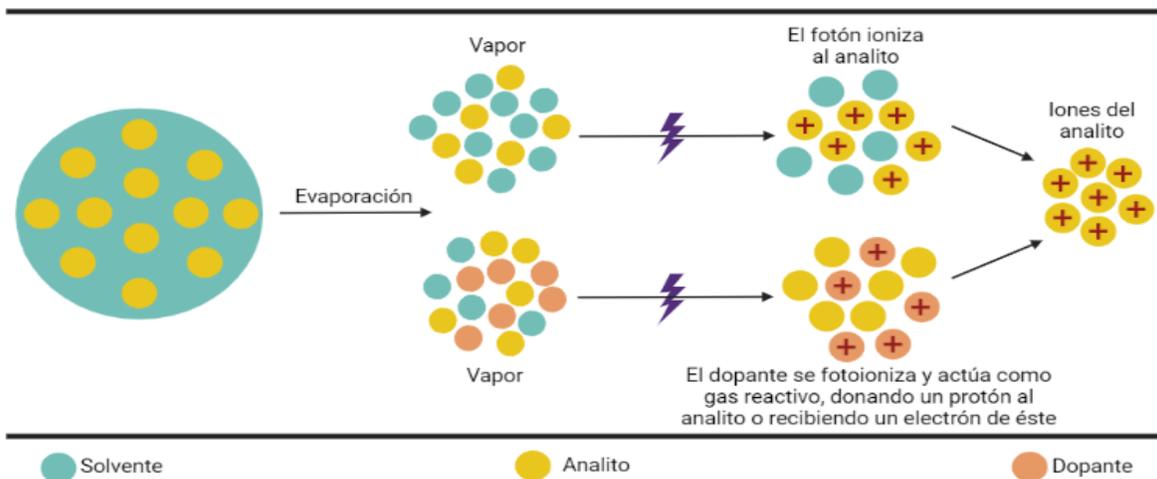
Esquema de APPI



Modificado de "Mass Spectrometry. Principles and Applications" por de Hoffmann, E. & Stroobant, V., 2007, p.58.

Figura 25.

Ionización directa y con agentes dopantes en APPI



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2022.

El interés en la fotoionización es su potencial de ionizar compuestos que no son ionizables ni por APCI ni por ESI, en particular compuestos que no son polares o tienen muy baja polaridad y con una masa molecular de aproximadamente 1000 Daltons (Urban, et al., 2016).

Tabla 10.

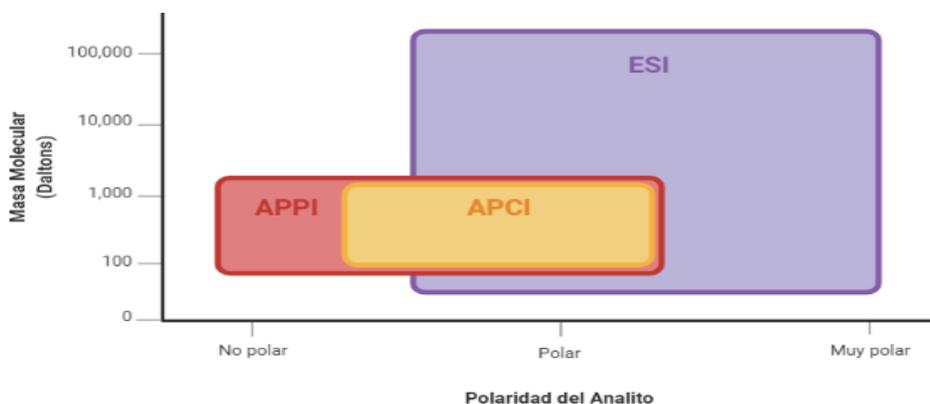
Resumen de los procesos de ionización y propiedades de los analitos requeridos en los métodos de Ionización a Presión Atmosférica (API)

Método API	ESI	APCI	APPI
Proceso de ionización	Los iones en el solvente pasan a la fase gaseosa por electropulverización	Se produce en fase gaseosa por descarga en corona	Ocurre en fase gaseosa por irradiación UV
Tipos de iones formados	Iones con cargas múltiples	Iones con una sola carga	Iones con una sola carga
Volatilidad del analito	No necesita ser volátil	Requiere cierto grado de volatilidad	Requiere cierto grado de volatilidad
Estabilidad del analito	No es necesario que sea termoestable, puede ser termolábil	Debe ser termoestable	Debe ser termoestable

Adaptado de "Fundamental Guide to Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS)" por SHIMADZU, 2019, p.23.

Figura 26.

Métodos de Ionización a Presión Atmosférica (API) y su rango de aplicación



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2022.

2.7.3.2 Analizador de masas

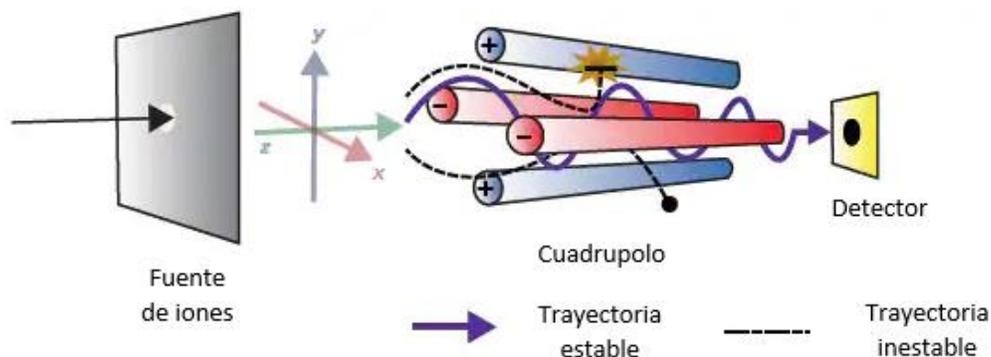
La tarea principal de un analizador de masas es separar (o resolver) los iones que se han formado en la fuente de ionización según sus relaciones m/z , a la par de que permite el paso de un número suficiente de iones con la finalidad de producir corrientes iónicas que puedan medirse posteriormente (Skoog, et al., 2015). Actualmente existen diferentes tipos de analizadores disponibles que han sido fabricados en base a funciones puntuales, partiendo de la premisa de que no existe un único analizador que sea adecuado para todas las aplicaciones, por lo que la elección del uso de cada uno dependerá de factores y consideraciones como el rango m/z que puede cubrir, la masa del analito, el poder de resolución, límite de detección requerido o la capacidad del analizador para interactuar con la fuente de ionización que se esté ocupando (Haag, 2016). Con base a los métodos de ionización vistos, los analizadores más comúnmente empleados son los de Cuadrupolo (Q) y de Trampa de Iones (IT), los cuales además de laborar individualmente, tienen la ventaja de combinar sus características y capacidades analíticas con otros métodos como HPLC (Olshina & Sharon, 2016).

2.7.3.2.1 Analizador de Cuadrupolo (Q)

Consiste básicamente en 4 varillas de metal cilíndricas o hiperbólicas paralelas entre sí que funcionan como electrodos y forman una sección cuadrada al interior; un par se conecta al polo positivo de una fuente variable de corriente continua (CC) y el otro par a la terminal negativa, superponiendo un voltaje de radiofrecuencia (RF). La combinación de RF y CC, controlada por computadora, se elige para permitir que únicamente los iones con una m/z definida o un rango de m/z específico se transporten a través del analizador con una trayectoria estable en espiral dada por los dos planos formados por ambos pares de electrodos opuestos, hasta llegar al analizador. Los iones con relación m/z inespecífica a los parámetros eléctricos impuestos caen o chocan con las varillas, lo que hace que su carga cambie o se vuelva neutra, sean succionados por el sistema al vacío y, por tanto, no sean detectados, convirtiendo así al cuadrupolo en un analizador bastante acoplable a las especificaciones de trabajo dadas por el operador (Haag, 2016).

Figura 27.

Esquema de un analizador de Cuadrupolo



Modificado de "Fundamental Guide to Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS)" por SHIMADZU, 2019, p.30.

Hoy en día el cuadrupolo es utilizado ampliamente debido a las ventajas que presenta: es fácil de operar y mantener, es relativamente barato, compacto y elaborado con materiales que han demostrado ser resistentes y fiables durante largos periodos de tiempo, independientemente de la casa fabricante, cuenta con un tiempo de barrido extraordinariamente rápido (0.01 segundos) al trabajar sólo con campos eléctricos por lo que es útil para realizar análisis en tiempo real, inclusive tiene un buen rendimiento a pesar de que existe una caída en el nivel de vacío causada por alguna interfaz, convirtiéndolo en el analizador más adecuado para interactuar con fuentes API y con técnicas cromatográficas (McMahon, 2021).

Por otro lado, es capaz de hibridarse con otros analizadores, incluido consigo mismo para formar al triple cuadrupolo (QqQ), permitiendo la cuantificación a nivel de trazas. Sin embargo, dicha facilidad de hibridación surge más bien como una forma de corregir su mayor desventaja en solitario: rangos de masa limitados y baja resolución; el cuadrupolo tiene inconvenientes cuando se analizan compuestos de gran peso molecular que pueden no formar iones de carga múltiple o mezclas complejas de compuestos con masas similares (McMahon, 2021).

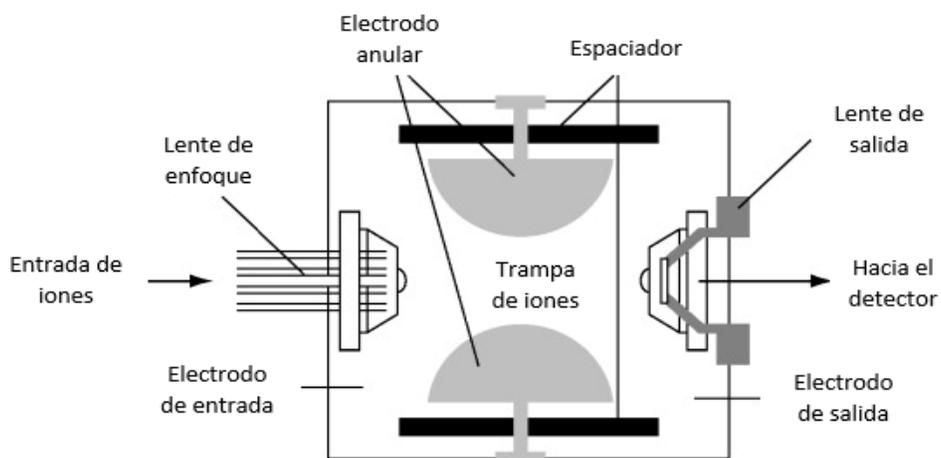
2.7.3.2.2 Analizador de Trampa de Iones (IT)

Clásicamente, el modelo esférico o "3D" se compone por tres electrodos (central, superior e inferior) de superficie hiperbólica, formando una cavidad en la que se produce la ionización, la fragmentación y el análisis de masas. Para ello, se aplica un potencial de radiofrecuencia de 525 kHz entre los electrodos superior e inferior y otro de 1.1 MHz con amplitud variable (0-7,500 V) en el electrodo central, creando un campo electromagnético cuadrupolar tridimensional en el

quedan confinados los iones con una trayectoria oscilante estable, dependiente de los voltajes aplicados y su relación m/z . Cuando el potencial de radiofrecuencia se aumenta, las órbitas de los iones más pesados llegan a estabilizarse, mientras que las de los iones más ligeros se desestabilizan, causando que colisionen con la pared del electrodo y se eyecten de la trampa, eliminando la posibilidad de que viajen al detector y sean reconocidos por este. Así, un cambio gradual de la amplitud del campo de radiofrecuencia provoca que los iones salgan en orden creciente a su relación m/z , lo que da lugar a un espectro de masas. Lo mismo aplica para las trampas lineales o “2D”, con la diferencia en que se utiliza un potencial a cada extremo de un cuadrupolo para retener los iones (Consejo Superior de Investigación Científica, 2015).

Figura 28.

Esquema de analizador de Trampa de Iones



Modificado de “Detection of Explosives by Mass Spectrometry” por Yinon, J., 2007, p. 45.

Al igual que su contraparte de cuadrupolo, los analizadores de trampa de iones son de tamaño pequeño y relativamente accesibles económicamente hablando, aunque su principal ventaja es que cuando se utiliza en experimentos en tándem, son capaces de atrapar un ion específico, fragmentarlo y luego atrapar un ion de producto puntual para una mayor fragmentación, repitiendo el ciclo. Por lo tanto, la trampa de iones se considera especializado en dilucidar rutas de fragmentación que son útiles para la determinación estructural de una molécula, siendo una herramienta excelente en la identificación de estructuras incógnitas de *novo* en campos como la proteómica, donde ha permitido la identificación de proteínas en mezclas complejas, sobre todo con modelos híbridos (Shimadzu, 2022; Haang, 2016). No obstante, aunque su sensibilidad es

buena, cuenta con poco poder de resolución y es propenso a que los iones se deshagan espontáneamente (descomposición unimolecular), experimenten interacciones no deseadas con otros iones (efectos de carga espacial), moléculas neutras (reacciones ion-molécula) o sufran perturbaciones en su movimiento debido a campos eléctricos imperfectos. Esto puede conducir a artefactos y cambios inesperados en el espectro de masas (College of Arts & Sciences, 2020).

Existen otros tipos de analizadores comúnmente utilizados en la espectrometría de masas, como el de Sector Magnético (BE) o el de Tiempo de Vuelo (TOF), aunque su uso en conjunto con HPLC no es compatible por distintas causas. En el caso del analizador BE, el cual se basa en el hecho de que los campos magnéticos generados por electroimanes pueden dispersar iones en trayectorias circulares distintas de acuerdo con sus relaciones m/z , su velocidad de escaneo es lenta y requiere de un nivel de vacío extremadamente alto (aproximadamente 10^{-7} Pa), provocando dificultades técnicas en la interfaz con el equipo de HPLC, por lo que rara vez se acoplan entre sí, sin mencionar las desventajas intrínsecas del BE como lo son su gran tamaño o su costo elevado (McMahon, 2021; German Society for Mass Spectrometry, 2022).

En el caso del analizador TOF, los iones formados son acelerados en un campo electrostático y viajan a través de este a velocidades distintas en función de sus respectivas masas, llegando en diferentes tiempos al detector. Aquí se requiere que la hora de inicio (que es el momento en que los iones abandonan la fuente de ionización) esté bien definida, por lo que necesita de un método de ionización pulsada como la desorción láser asistida por matriz (MALDI) para maximizar su rendimiento en el llamado espectrómetro de masas MALDI-TOF, cuya alta resolución y velocidad de escaneo no han requerido de la hibridación con HPLC para el análisis e identificación de biomoléculas, pero se sabe que se acopla bien con otros tipos de cromatografía, como lo es la de gases (Karlamanos et al., 2020; College of Arts & Sciences, 2020).

2.7.3.3 Detector

El objetivo de los detectores de corriente de iones que se utilizan en conjunto con los espectrómetros de masas es proporcionar una medida de la intensidad de los iones con diferentes valores de m/z que previamente fueron separados en los analizadores. Los iones de cada haz iónico llegan a un colector donde generan una señal eléctrica al chocar con una superficie “especializada”, que va desde una simple placa de metal hasta una superficie cubierta con un revestimiento sofisticado, en donde se convierten en una corriente eléctrica que se puede amplificar para proporcionar medidas de intensidades de iones que son representativas del

número de iones recogidos en un determinado valor de m/z , almacenando y procesando los datos en un ordenador, siendo muy frecuente la construcción de bibliotecas de espectros de masas que permiten la identificación casi inequívoca de cualquier compuesto por comparación (Roboz, 2016).

Comercialmente han sido desarrollados diferentes tipos de detectores con el propósito de reunir varias características tales como poseer alta amplificación, tiempo de respuesta rápido, bajo ruido, alta eficiencia de recolección, bajo costo, misma respuesta para todas las masas, estabilidad a largo plazo y larga vida media, siendo la caja (o copa) de Faraday y el multiplicador de electrones los más utilizados rutinariamente en la mayoría de espectrómetros de masas, aunque existen muchos otros como la detección fotográfica, los micromultiplicadores multicanal, el contador de centelleo, detectores de macroiones, los criogénicos e incluso los detectores de imagen de codificador de ánodo resistivo (Medhe, 2018).

2.7.3.3.1 Caja de Faraday

Tradicionalmente, consta de un simple electrodo en forma de caja o jaula de metal abierta con una placa colectora de metal (de CsSb, BeO o GaP) ligeramente inclinada para evitar la reflexión de iones, la cual está conectada a tierra a través de una resistencia óhmica alta ($10^{10} - 10^{12} \Omega$), de tal manera que cuando los iones lleguen a dicha placa sean neutralizados ya sea aceptando o donando electrones. Así, cuando llega un número grande de iones a la placa se induce un flujo analógico igual a la corriente de electrones en el cable de tierra que posteriormente origina una pequeña corriente eléctrica que puede ser amplificada y convertida en voltaje para su posterior visualización (Roboz, 2016).

Cuenta con ventajas como poseer gran sencillez, trabajar a presiones relativamente altas (aproximadamente 10^{-4} mbar) y poseer gran linealidad de respuesta con una corriente mínima detectable (10^{-14} A), por lo que es muy utilizado en determinaciones cuantitativas, sobresaliendo las determinaciones isotópicas. No obstante, cuenta con baja sensibilidad al generar una medición equivalente a los iones que llegan, a pesar de que la forma geométrica del aparato asegura la recolección total de los electrones a través de potenciales negativos; cuando se intentan medir corrientes más bajas se corre el riesgo de presentar defectos en la precisión dados por la existencia de ruidos térmicos y electrónicos provenientes de la resistencia y los circuitos amplificadores (Chemistry Library, 2020; McMahon, 2021).

2.7.3.3.2 Multiplicador de electrones

Probablemente son los detectores más comunes, especialmente cuando es necesario detectar iones positivos y negativos en el mismo instrumento, basándose en la emisión de electrones secundarios. En ellos, los iones, independientemente de su carga, salen del analizador de masas y son acelerados hacia el multiplicador por un potencial (-2 a 5 kV) hasta que inciden en una placa de dínodo de conversión, cuya superficie de aleación de Cu-Be expulsa dos electrones secundarios por cada ion que llega. Ahora bien, los electrones liberados se aceleran por magnetismo y golpean un segundo dínodo desde el cual se expulsan múltiples electrones por cada uno que lo golpea, para posteriormente ser acelerados hacia una tercera placa y así sucesivamente, obteniendo una lluvia de electrones al haberse amplificado la señal hasta un millón de veces al pasar típicamente por 6-20 dínodos, la cual atraviesa un convertidor de corriente a voltaje que termina por digitalizar el análisis (Medhe, 2018).

El multiplicador de electrones es superior a la caja de Faraday en función de que es un detector mucho más sensible, capaz de procesar señales mínimas detectables de aproximadamente 10^{-18} A, y por poseer velocidades de barrido inferiores a 50 nanosegundos, teniendo así una velocidad de respuesta bastante considerable. Pese a esto, requiere alta tensión y un mayor vacío para operar, del orden de 10^{-6} mbar o menor, además de necesitar calibración frecuente al contar con piezas de vida media limitada que se van desgastando con el uso, cuidando especialmente las subidas de presión, ya que su sensibilidad hacia ellas pueden destruirlo prácticamente si se produce una ruptura o accidente de vacío (Hatton y Lundie, 2020).

Como se pudo ver, los sistemas LC-MS son más complejos por lo que presentan frecuentes problemas, mayor mantenimiento y, en ocasiones, mayor inversión monetaria. A pesar de esto, sus ventajas analíticas superan tales inconvenientes, especialmente por la confirmación positiva de los analitos que nos brinda esta técnica hibridada (García de Marina & Yusá, 2016).

2.7.4 Aplicaciones

Las características de la espectrometría de masas junto con cromatografía líquida la han elevado a una posición destacada entre los métodos analíticos, convirtiéndola en una técnica casi imprescindible en una gran variedad de campos, más que nada gracias al rápido progreso o desarrollo de instrumentos que buscan seguir mejorando la técnica para lograr satisfacer las necesidades de cada área. Así pues, sus aplicaciones actuales incluyen:

- ✓ Análisis medio ambientales, especialmente el análisis de agua
- ✓ Seguridad alimentaria, para la detección de contaminantes químicos en alimentos y bebidas
- ✓ Control de calidad de materia prima y productos terminados
- ✓ Descubrimiento y metabolismo de productos farmacéuticos
- ✓ Estudios toxicológicos, ya sea en la realización de estudios de dopaje o estudios clínicos
- ✓ Apoyo en las ciencias ómicas, como la proteómica en la caracterización de proteínas, medición de pesos moleculares de polipéptidos intactos, determinación de la identidad y estructura del péptido
- ✓ Identificación de biomarcadores, como metabolitos, que están presentes en estados patológicos (de Hoffmann & Stroobant, 2007; Manzanares-Meza, Gutiérrez-Román & Medina-Contreras, 2017; Universidad de Burgos, 2020).

2.7.5 Espectrometría de masas en tándem, ¿qué es y por qué se volvió tan popular?

La utilización del espectrómetro de masas en sus inicios se limitaba a los laboratorios de investigación física y química, así como en industrias petroleras y farmacéuticas. Tiempo después, la amplia aceptación posibilitó su implementación dentro de los laboratorios clínicos, aspecto que fue potenciado gracias al acoplamiento con la cromatografía de gases y, en mucho mayor medida, con la cromatografía líquida (Arroyave, et al., 2018). Sin embargo, las necesidades de la química clínica en cuanto a obtener más información de varios analitos a la vez estando dispuestos a nivel de trazas en matrices complejas, como lo son las muestras biológicas, impulsaron el desarrollo de lo que posteriormente se convertiría en una de las herramientas más poderosas y versátiles dentro del vasto campo de la bioquímica: la Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem, abreviado como LC-MS/MS (Campos, 2012).

De manera general, la LC-MS/MS consiste en la realización de análisis de masas consecutivos entre los cuales se intercala una etapa de fragmentación del ion. Para lograrlo, la técnica se fundamenta bajo los mismos conceptos e instrumentación que la LC-MS, con la diferencia de que el tándem se caracteriza por presentar al menos dos analizadores de masas conectados en serie y separados por una cámara de colisión (Campos, 2012). Esta modificación corrige de manera eficaz la carencia de información estructural necesaria para asegurar que la señal obtenida corresponda a un analito puntual y no a otro compuesto isobárico presente en la muestra analizada, siendo ésta una limitación propia de algunas de las fuentes de ionización

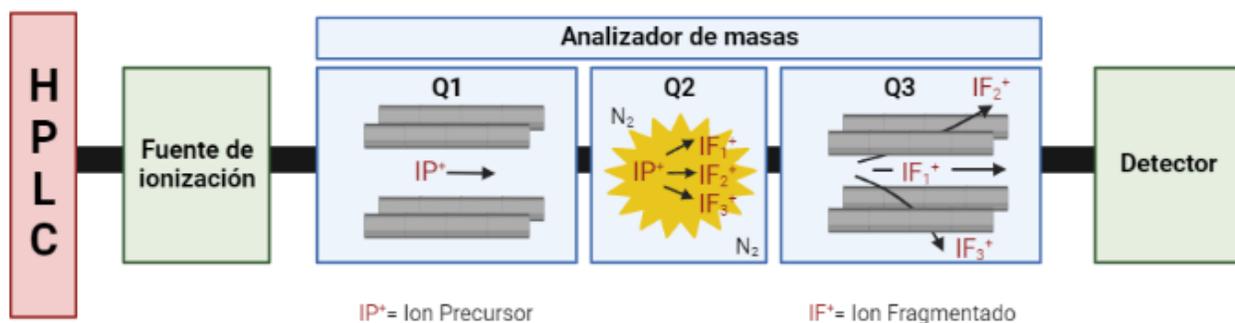
suave desarrolladas para el acoplamiento LC-MS, principalmente APCI y APPI, al ser incapaces en varias ocasiones de fragmentar a la molécula de interés en más de un ion (García, 2013).

Actualmente existen diferentes acoplamientos entre los distintos analizadores de masas en un equipo LC-MS/MS y se diseñan de acuerdo con la naturaleza de las moléculas de interés. Entre el gran abanico de posibilidades, son los analizadores de triple cuadrupolo (QqQ) los que más relevancia tienen al ser los más sencillos y utilizados en los laboratorios clínicos y de investigación, por lo que es el que se abordará más a fondo. No obstante, el tercer cuadrupolo también se puede reemplazar con un analizador de trampa de iones (QqIT) obteniendo más variedad de modelos híbridos con características diferentes en cuanto a su resolución, exactitud, intervalo de masas y coste monetario (Arroyave, et al., 2018; García, 2013).

Tal como su nombre lo indica, el analizador de triple cuadrupolo consta de tres cuadrupolos dispuestos en serie: el primero (Q1) separa una especie iónica de interés, denominado ion precursor, del resto de los iones generados en la fuente de ionización; el segundo (q o Q2) es una celda de colisión diseñada para mantener la baja presión del gas de colisión, pudiendo ser helio, argón, xenón o nitrógeno, cuyas moléculas chocan con el ion precursor en un proceso conocido como disociación inducida por colisión (collision induced dissociation, CID), dando como resultado la ruptura del ion; mientras que el tercero (Q3) se encarga de acelerar y separar los fragmentos iónicos, denominados iones producto o fragmentados, permitiendo su detección y registro de forma independiente (Gracia, 2013; García, 2013).

Figura 29.

Esquema de un espectrómetro de masas en tándem



Elaborado por Vázquez Mayo Fátima Isabel, 2022.

Al reconocerse a la LC-MS/MS como una poderosa técnica cualitativa y cuantitativa con una amplia gama de aplicaciones particularmente en el área clínica y bioquímica, hoy día los laboratorios optan por su uso en un intento de innovar o sustituir metodologías antiguas y, en muchos de los casos, obsoletas para los requerimientos tecnológicos actuales (Jannetto, 2015). Una de las principales ventajas que otorga la espectrometría de masas en tándem es la capacidad de multiplexar, detectar, identificar y cuantificar de forma simultánea varios analitos de interés que estén dispuestos en una matriz compleja puesto que se obtiene su información estructural a través de la generación de fragmentos específicos que permiten la construcción de un patrón de fragmentación característico para cada uno, concediendo una sensibilidad del 99% y una especificidad del 99.995% aun cuando los analitos están en concentraciones mínimas (Mak, et al., 2013; Guo, et al., 2017; Arroyave, et al., 2018; Remane, et al., 2016). Como consecuencia, se ha favorecido la creación de “perfiles” en los que se recopila una gran cantidad de información de muchos metabolitos a partir de una muestra de hasta 100 uL en un tiempo que muchas veces no supera los dos minutos, ahorrando costos y potenciando al máximo el rendimiento al trabajar con muestras simplificadas o mínimas (Mak, et al., 2013; Jannetto, 2015). Ejemplos de otras ventajas y aplicaciones de la LC-MS/MS en dichos campos son:

- ✓ La detección de enfermedades congénitas y errores innatos del metabolismo en recién nacidos. Esta tal vez es la aplicación clínica más frecuente de la técnica, al ayudar en el diagnóstico de aminoacidopatías, acidurias orgánicas, trastornos de la oxidación de ácidos grasos y alrededor de otros 40 trastornos de este tipo, contribuyendo en la reducción de aparición de resultados falsos positivos (Mak, et al., 2013; Shusha & Zonderman, 2010).
- ✓ El uso extendido en la endocrinología, analizando metabolitos y hormonas de bajo peso molecular a concentraciones picomolares que en muchas ocasiones cuentan con isómeros discriminables. Tanta es su aceptación que la American Endocrine Society ha emitido declaraciones recomendando a la LC-MS/MS como un método ideal para la determinación de los niveles endógenos de hormonas esteroides sobre tecnologías más comunes como lo son los inmunoensayos (Carvalho, 2012; Shusha & Zonderman, 2010); su ventaja frente a éstos se debe a que la confiabilidad ha sido cuestionada por su alta probabilidad de presentar reactividad cruzada entre diferentes estereoisómeros, además de que requieren grandes volúmenes de muestra, en especial cuando el analito está presente en bajas concentraciones (Sinreih, et al., 2015).
- ✓ Dentro de la toxicología para el hallazgo de sustancias tóxicas y drogas de abuso (anfetaminas y psicoactivos), las cuales necesitarían de pasos más laboriosos y complejos

en caso de que se ocupen otras metodologías para tales fines al ser sustancias volátiles y polares, opacando así a la cromatografía de gases (Adaway, et al., 2015).

- ✓ La posibilidad de recolectar gran cantidad de péptidos ionizados específicos provenientes de microorganismos patógenos para su comparación en bases de datos e identificación, logrando obtener un diagnóstico microbiológico 24 horas más rápido que las pruebas rutinarias o moleculares. Pese a esto, como la LC-MS/MS no logra diferenciar de manera plena a microorganismos con estrecha relación filogenética, su empleo continúa siendo acompañado de métodos clásicos complementarios, es decir, de pruebas bioquímicas o el crecimiento en medios de cultivo (Adaway et al., 2015; Guo et al., 2017).
- ✓ En el campo de la proteómica y después de un tratamiento o digestión previa pueden obtenerse y caracterizarse anticuerpos monoclonales que son utilizados como biomarcadores clave en la inmunidad, autoinmunidad, cáncer y en la detección y tratamiento de gran variedad de patologías (Jannetto, 2015; Nedelkov, 2017).

Si bien las ventajas y utilidades de la LC-MS/MS siguen reportándose en la literatura científica hasta el día de hoy, también es cierto que la metodología cuenta con varios inconvenientes y desafíos a superar. El primero y más obvio resulta ser el alto costo monetario inicial que representa, ya que su utilización, instalación, acondicionamiento, mantenimiento y reparación necesitan de personal con alta experiencia técnica y equipo sofisticado de última generación. Además, los kits comerciales que han sido lanzados al público que intentan “facilitar” la técnica muchas veces difieren en los rangos de referencia de los resultados y en las condiciones de trabajo y de almacenamiento que necesitan las muestras para su correcto análisis, por tanto, no existe un manual universal que reduzca la variabilidad en los resultados (Arroyave, et al., 2018; Jannetto, 2015). Por esto los fabricantes continúan mejorando, automatizando y simplificando esta técnica ya que, al mejorar su sensibilidad, especificidad y rendimiento, también se incrementarán sus aplicaciones en el ámbito de la salud, incluso extrapolándola a procedimientos quirúrgicos en tiempo real, en donde el bisturí del cirujano sea capaz de conectarse al equipo para distinguir entre tejido normal y canceroso (Adaway, et al., 2015). Así que, en lo que se refiere a la LC-MS/MS, los avances tecnológicos lucen con un futuro bastante prometedor.

2.8 Presente y futuro de la HPLC

Las innovaciones tecnológicas de la HPLC están centradas en ofrecer mayor presión de bombeo, reducción del tamaño y diámetro de las partículas de la columna, y la mejora en la hibridación a un espectrómetro de masas con la finalidad de aumentar la productividad, lo que ha dado como resultado el desarrollo de la LC-MS/MS o la UHPLC (ThermoFisher Scientific, 2018). Actualmente se busca el desarrollo de múltiples detectores dispuestos para análisis simultáneos; un software fácil de operar que de acceso a múltiples analistas, con opciones de manejo remoto, actualización vía internet y capacidad de autodiagnóstico; automatización que abarque desde el inicio hasta el apagado tocando un solo botón y reduciendo el consumo de energía, incluyendo las inyecciones de muestras; y, sobre todo, que sea sencillo de enseñar, por lo que todas las características anteriores se resumen en la búsqueda de una HPLC “completamente inteligente” (Chan, 2019).

Capítulo 3. Comparación entre las técnicas Western Blot y HPLC

Tabla 11.

Comparación entre Western Blot y HPLC

		Western Blot	HPLC
Fecha de invención		En 1979 por Harry Towbin y Neal Burnette	En 1967 cuando sale a la venta el primer equipo de HPLC exitoso elaborado por Waters Associates
Muestra	Objeto de estudio	Proteínas	Proteínas, carbohidratos, lípidos, iones, toxinas, fármacos, metabolitos, materia prima
	¿Dónde está contenida?	Tejidos o células	Muestras biológicas, materia orgánica e inorgánica, productos terminados
	Condiciones de trabajo	Temperatura de trabajo a 4°C y en presencia de PPI.	El analito debe ser termolábil o no volátil, además de soluble con la fase móvil. A su vez, la fase móvil y la estacionaria deben ser inmiscibles entre sí.
Funciones de la técnica		<ul style="list-style-type: none"> ✓ Separación e identificación selectiva de proteínas a partir de una mezcla de proteínas. ✓ Estimación del tamaño de la proteína de interés. ✓ Medición relativa de la expresión de la proteína. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Separación e identificación de analitos a partir de una mezcla compleja. ✓ Purificación de analitos (uso de HPLC como técnica preparativa). ✓ Cuantificación de las concentraciones de los analitos.

Análisis cualitativo		Sí, la identificación se da por la presencia de la banda en el gel de electroforesis con respecto a un control positivo.	Sí, la identificación convencional se da por el tiempo de retención del analito que se compara con la referencia. En caso de LC-MS y LC-MS/MS, es por la <i>m/z</i> específica del analito.
Análisis cuantitativo		Sí, si la detección es por métodos fluorescentes, de lo contrario lo máximo que se puede alcanzar son resultados semicuantitativos mediante películas de rayos X o imágenes por cámara CCD.	Sí, la cuantificación del compuesto se realiza por el uso de estándares internos o externos, entre otros métodos, con un subsecuente análisis matemático apoyado del cromatograma.
Sensibilidad y especificidad		Alta	Alta, y más si el eluyente se hace pasar por un segundo equipo analítico como el espectrómetro de masas
Metodología	Preparación de la muestra	Involucra la extracción de proteínas (lisis celular), cuantificación de PT por espectrofotometría, desnaturalización de proteínas (si es requerido) y carga en los pocillos del gel para electroforesis.	Incluye la disolución de la muestra, limpieza y fraccionamiento de la matriz, generalmente por métodos físicos, para lograr la concentración del analito cuyas propiedades pueden llegar a ser modificadas posteriormente por reacciones químicas.
	Separación	Mediante PAGE-SDS. La separación de proteínas está en función del peso molecular.	Llevada a cabo en la columna. Dada por la distintas velocidades de elución de los analitos ocasionadas por la diferencia de afinidades que presentan hacia la fase estacionaria o móvil.

Metodología	Requerimientos para la detección	Las proteínas separadas en el gel deben transferirse a una membrana de nitrocelulosa o PVDF que posteriormente será bloqueada para realizar el sondeo con anticuerpos.	En HPLC convencional, el detector debe distinguir una propiedad intrínseca del analito que no esté presente la fase móvil. En LC-MS y LC-MS/MS, el eluyente debe ionizarse y pasar a fase gaseosa para que el detector reconozca e identifique a la molécula de interés.
	Detección	Principalmente por Quimioluminiscencia Indirecta. Suele emplearse la enzima HRP o FA cuya reacción es capturada a través de películas de rayos X o por cámaras CCD.	Principalmente por un detector de arreglo de diodos, aunque también pueden utilizarse otro tipo de detectores con base a las propiedades intrínsecas del analito, dando como resultado la obtención de un cromatograma.
Automatización	No, el analista realiza manualmente todo el procedimiento.	Sí, el analista configura las condiciones de trabajo a través del software del equipo y éste lo realiza en automático.	
Complejidad de la técnica y tiempo invertido	Mayor que en HPLC, el análisis puede llegar a durar más de un día.	Menor que en WB, el análisis llega a durar un par de horas.	
Características del equipo	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Fácil de mover y transportar de un sitio a otro. ✓ Las dimensiones del equipo no son de gran tamaño y por ende no ocupa tanto espacio. ✓ Mayor disponibilidad en el sitio de trabajo. ✓ Requiere mantenimiento periódico. ✓ No conectado en serie. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Fijado a un espacio de trabajo. ✓ Las dimensiones del equipo son de gran tamaño, abarcando mayor espacio físico. ✓ Menor disponibilidad en el sitio de trabajo. ✓ Requiere mantenimiento periódico. ✓ Conectado en serie mediante tubería de acero u otros materiales resistentes. 	

Materiales y reactivos	Suministrado por proveedores	PPI, reactivos para preparar buffers y geles, marcador de peso molecular, membrana, papel filtro y esponjas, solución de bloqueo, anticuerpo primario y secundario, sustratos quimioluminiscentes.	Precolumnas y columnas analíticas, bombas, válvulas, disolventes, reactivos grado HPLC, materiales inherentes a la preparación de muestra (filtros, cartuchos de extracción, etc.)
	Elaborado por el analista	Buffers, reactivo para la cuantificación de PT, gel de electroforesis, anticuerpo primario (en ocasiones), soluciones de lavado.	Fase móvil, soluciones estándar, buffers.
Capacidad de hibridación con otras técnicas	En sí, el WB integra diferentes técnicas como parte de su procedimiento estándar: espectrofotometría, electroforesis, blotting e inmunodetección.		Sí, el equipo de HPLC es capaz de acoplarse a un segundo instrumento analítico como NMR, IR o espectrómetros de masa, siendo el último el más ampliamente utilizado, formando las técnicas conocidas como LC-MS y LC-MS/MS.
Capacitación de personal	Sí, para el uso y montaje del equipo.		Sí, para el uso del equipo.
Gasto económico	Elevado		Elevado
Campos donde se utiliza	Biología celular y molecular, microbiología, bioquímica, inmunología, biomedicina, química clínica, proteómica, investigación.		Bioquímica, química clínica, biomedicina, química orgánica e inorgánica, química forense, química analítica, toxicología, farmacéutica, monitoreo ambiental, investigación, control de calidad de materia prima y producto terminado a nivel industrial.

Conclusiones

Como se pudo ver a lo largo de los capítulos, el WB y la HPLC son técnicas altamente específicas y sensibles que permiten al investigador lograr análisis selectivos gracias a los procedimientos que parten desde una preparación de la muestra de interés (con base a sus propiedades), pasa por una separación de los componentes de ésta y culmina con una detección. No obstante, es posible denotar que existen diferencias entre ellas, siendo las más importantes la naturaleza de la muestra que cada técnica puede procesar, los datos que se pueden obtener, así como la complejidad metodológica, lo cual repercute directamente en los sitios en las que son empleadas.

Por un lado, el WB se especializa únicamente en el análisis proteico brindando información sobre la presencia de alguna proteína específica, su peso y su semicuantificación, pero con la desventaja de ser laboriosa y muy tardada, limitando su aplicación en laboratorios de docencia, investigación y diagnóstico. Por otro lado, la HPLC resulta mucho más versátil al utilizarse para separar, purificar, identificar y cuantificar analitos de distinta naturaleza (no exclusivamente muestras biológicas y de origen proteico) en un tiempo más corto, y con la ventaja de poder acoplarse a un segundo equipo analítico, como la espectrometría de masas, para conseguir resultados mucho más precisos, lo cual le confiere un lugar privilegiado no solo en ámbitos educativos y de investigación sino también en las ramas industriales.

Con la ayuda de estas dos técnicas es posible complementar, enriquecer o hasta confirmar la información resultante de los trabajos de investigación, servicio social y tesis que se llevan a cabo en el Laboratorio de Farmacología del Miocardio, sin embargo, pese a que la elección de emplear ambas técnicas o solo una se debe basar principalmente en el alcance que tienen y el objetivo del protocolo experimental, lo cierto es que dicha decisión muchas veces está sujeta al tiempo invertido, al presupuesto económico para el estudio y la disponibilidad de los materiales y equipos requeridos, aunque para este último punto también vale la pena evaluar la opción de enviar la muestra a otro instituto o laboratorio para realizar el análisis.

Finalmente, con la ciencia y tecnología avanzando cada día más, es factible que estas dos técnicas sigan desarrollando mejoras para alcanzar una máxima optimización que reduzca tiempos y costos, y aumente la calidad y cantidad de datos obtenidos, eliminando así la necesidad de recurrir a más de un procedimiento.

Referencias

- Adaway, J. E., Keevil, B. G., & Owen, L. J. (2015). Liquid chromatography tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Annals of Clinical Biochemistry*, 52 (1), 18–38. <https://doi.org/10.1177/0004563214557678>
- Advansta. (2011). Análisis de Proteínas Electroforesis, Transferencia e Inmunodetección. <http://www.ecogen.com/upfiles/A56009.pdf>
- Agilent Technologies. (2013). Sample Preparation Fundamentals for Chromatography. https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf
- Agilent Technologies. (2019). The LC Handbook Guide to LC Columns and Method Development. <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/LC-Handbook-Complete-2.pdf>
- AGQ Labs. (2017). Análisis químico, medir es comparar. <https://agqlabs.cl/wp-content/uploads/Analisis-quimico-medir-es-comparar.pdf>
- Altova, E. P., & Hargittai, I. (2021). Mikhail S. Tsvet—pioneer of chromatography—150 years from his birth. *Structural Chemistry*, 33, 1-3. <https://doi.org/10.1007/s11224-021-01804-z>
- Arnaud, C. H. (2016). 50 years of HPLC. <https://cen.acs.org/articles/94/i24/50-years-HPLC.html>
- Arroyave, C. L., Arango, E. F., Zuleta, J. J., Restrepo, M. V., Lopera, J., Zuluaga, H., Pachón, I., & Botero, J. P. (2018). Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem: ¿qué es? ¿Para qué se usa? https://www.hptu.org.co/phocadownloadpap/tecnologia_evaluada/Espectrometria_de_masa_en_Tandem.pdf
- Azure biosystems. (2017). Western Blotting past, present and future. <https://azurebiosystems.com/blog/western-blotting-past-present-future/>

Balmer, C. (2015). The Past, Present, and Future of Western Blotting in the Clinical Laboratory.

<https://www.aacc.org/cln/articles/2015/october/the-past-present-and-future-of-western-blotting-in-the-clinical-laboratory>

Banerjee, S., & Mazumdar, S. (2012). Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International journal of analytical chemistry*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>

Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., & Atherton, P. J. (2017). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 27(1), 4–25. <https://doi.org/10.1111/sms.12702>

Biomedical and Biological Science. (25 de noviembre de 2016). *A full explanation about Bradford assay, Coomassie Brilliant Blue, and the calibration curve*. [Video] YouTube. https://www.youtube.com/watch?v=hdb3s4YHkms&list=LL&index=3&t=337s&ab_channel=BiomedicalandBiologicalSciences

Bio-Rad. (s.f.). A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf

Bonvin, G., Schappler, J., & Rudaz, S. (2012). Capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry interfaces: Fundamental concepts and technical developments. *Journal of Chromatography A*, 1267, 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.019>

Brown, J. (2021). When was HPLC introduced? <https://theknowledgeburrow.com/when-was-hplc-introduced/>

Buie, J. (2010). Evolution Of HPLC Systems. <https://www.labmanager.com/laboratory-technology/evolution-of-hplc-systems-19579#:~:text=The%20origins%20of%20HPLC%20date,chromatography%20in%20the%20early%201960s>

- Burnette, WN. (2015). Western blotting: a remembrance of things past. *Methods Mol Biol.* 1312. 9-12. [10.1007/978-1-4939-2694-7_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7_3)
- Campos, D. (2012). Aplicación de la espectrometría de masas en tándem en el tamiz neonatal de los errores innatos del metabolismo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 46 (2), 195-203. <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v46n2/v46n2a04.pdf>
- Carvalho, V. M. (2012). The coming of age of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry in the endocrinology laboratory. *Journal of Chromatography B*, 883-884, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.08.027>
- Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. (2015). Espectrometría de masas de tipo electrospray. <https://www.cbm.uam.es/images/servicios/proteomica/documentos/espectrometria-de-masas-ESI-MSMS.pdf>
- Centro Español de Metrología. (2018). Procedimiento QU-004 para la calibración de equipos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). https://www.cem.es/sites/default/files/qu-004_digital.pdf
- Chan, D. (2014). Future of HPLC needs to be innovative. <https://www.biospectrumasia.com/opinion/29/6379/future-of-hplc-needs-to-be-innovative.html>
- Chemistry Library. (2020). Ion detectors. https://chem.libretexts.org/Courses/Providence_College/CHM_331_Advanced_Analytical_Chemistry/1/15%3A_Molecular_Mass_Spectrometry/15.04%3A_Ion_Detectors
- Choudhary, G., Acharya, P. & Miller, R. (2017). The Fluorescent Way: Why Start Fluorescent Western Blotting Now? *Bioradiations*. <https://www.bioradiations.com/the-fluorescent-way-why-start-fluorescent-western-blotting-now/>

Christian, G.D. (2009). Química analítica. 6° ed. México: McGraw-Hill Interamericana. 857 p.

Chromatography Today. (2014). Who is Mikhail Tsvet?

<https://www.chromatographytoday.com/news/gc-mdgc/32/breaking-news/who-is-mikhail-tsvet/32304>

Chromatography Today. (2015). The Role of Martin and Synge in the Birth of Modern Chromatography.

<https://www.chromatographytoday.com/news/industrial-news/39/breaking-news/the-role-of-martin-and-synge-in-the-birth-of-modern-chromatography/33267>

College of Arts & Sciences. (2020). Summary of the characteristics of different mass analyzers.

<https://www.as.uky.edu/sites/default/files/jeolanalyzers.pdf>

Consejo Superior de Investigación Científica. (2015). Espectrometría de masas.

https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf

Cortada-Cortés, C. (2012). Nuevas metodologías y aplicaciones de las técnicas de microextracción líquido-líquido para la determinación de contaminantes orgánicos. Tesis doctoral. Universidad de Alicante.

https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/24657/6/Tesis_Cortada_Cortes.pdf

Cushing, K. (2015). Western Blotting: A Guide to Current Methods. *Science AAAS*.

https://www.sciencemag.org/sites/default/files/custom-publishing/documents/Western_Blotting_ScienceGE2booklet_MedRes_9june15.pdf

Davidson, K. L. (2017). Investigation of the Fundamentals of Electrospray Ionization and the Separation of Small Molecules using Ion Mobility Mass Spectrometry.

https://digital.lib.washington.edu/researchworks/bitstream/handle/1773/40523/Davidson_washington_0250E_17862.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- De Hoffmann, E. & Stroobant, V. (2007). Mass Spectrometry. Principles and Applications. England: WILEY. <http://www.usp.br/massa/2014/qfl2144/pdf/MassSpectrometry.pdf>
- Easthope, E. (2019). Western Blot Tools and Techniques Evolving Rapidly. <https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/360024-Western-Blot-Tools-and-Techniques-Evolving-Rapidly/>
- Eisenstein, M. (2005). Westward expansion. *Nature Methods*. 2, 796. <https://doi.org/10.1038/nmeth1005-796>
- Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the bradford protein assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (38), 1918. <https://doi.org/10.3791/1918>
- EVISA. (2010). Alcott Chromatography Inc. - 708AL Positive Displacement Autosampler. <http://www.speciation.net/Database/Instruments/Alcott-Chromatography-Inc/708AL-Positive-Displacement-Autosampler-;i2420>
- Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas FBIOyF. (s.f.). Bioquímica-Electroforesis. [https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/6798/mod_resource/content/0/Electroforesis.pdf#:~:text=El%20primer%20aparato%20sophisticado%20de,prote%C3%ADnas%20en%20soluci%C3%B3n%20\(1\)](https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/6798/mod_resource/content/0/Electroforesis.pdf#:~:text=El%20primer%20aparato%20sophisticado%20de,prote%C3%ADnas%20en%20soluci%C3%B3n%20(1))
- García, D. (2013). Espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida con pretratamiento on-line: determinación de xenobióticos en alimentos y biomarcadores en muestras biológicas. Tesis de Doctorado. Universidad de Salamanca. https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/122991/BQANB_Garciagomez_espectometriamasastandem_tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- García de Marina, A. & Yusá, D.J. (2016). HPLC instrumental. Editorial Universitat Politècnica de Valencia. https://gdocu.upv.es/alfresco/service/api/node/content/workspace/SpacesStore/18923b6c-0080-4aab-b237-547a4678e10b/TOC_6234_01_01.pdf?quest=true

- Gavini, K. & Parameshwaran, K. (2020). Western Blot. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542290/>
- German Society for Mass Spectrometry. (2022). Mass Spectrometers. <https://dgms.eu/en/about-dgms/this-is-mass-spectrometry/mass-spectrometers/>
- Gibson, S. C. (2014). Investigations into Ambient Ionization Mechanisms: Electrospray Ionization and Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry. https://trace.tennessee.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=4266&context=utk_graddiss
- Gismera-García, M.J., Quintana-Mani, M.C. & da Silva-de Campos, M.P. (2009). Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución. España: Ediciones Universidad Autónoma de Madrid.
- Gracia, E. (2013). Potencial de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem para la detección, cuantificación y confirmación de fármacos en aguas. Tesis de Doctorado. Universitat Jaume I. https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/396212/2013_Gracia_Lor_Emma.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Grimalt, S. (2010). Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal. Tesis de Doctorado. Universitat Jaume I. <https://www.tdx.cat/handle/10803/384554>
- Grinias, J. & Majors, R. E. (2021). The LCGC Blog: Digging Deeper into the History of HPLC: Elmar Piel. <https://www.chromatographyonline.com/view/the-lcgc-blog-digging-deeper-into-the-history-of-hplc-elmar-piel>

- Guo, H., Peng, H., & Emili, A. (2017). Mass spectrometry methods to study protein-metabolite interactions. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12 (12), 1271–1280. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.137817>
- Haag, A. M. (2016). Mass analyzers and mass spectrometers. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 157-169. https://doi.org/10.1007/978-3-31941448-5_7
- Hatton, P., y Lundie, D. (2020). Mass Spectrometry in Real Time. https://www.hidenanalytical.com/wp-content/uploads/2020/08/Hidden-Article_LMUJ_K_JULY_20.pdf
- Hirano, S. (2012). Western blot analysis. *Methods Mol Biol.* 926. 87-97. [10.1007/978-1-62703-002-1_6](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-002-1_6)
- Hirschfeld, T. (1980). The Hyphenated Methods. *Analytical Chemistry*. 52(2): 297A-312A.
- Hodson, G. (2020). The people who shaped chromatography – Mikhail Tsvet. <https://phenomenex.blog/2020/09/29/mikhail-tsvet/>
- Jannetto, P. (2015). Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. The Swiss Army Knife for Clinical Laboratories. <https://www.aacc.org/cln/articles/2015/july/liquid-chromatography-tandem-mass-spectrometry>
- Jayo, R. (2014). Mechanisms of Electrospray Ionization for Mass Spectrometry Analysis. <https://open.library.ubc.ca/media/download/pdf/42591/1.0075825/1>
- Jensen, E. (2012). The Basics of Western Blotting. *The Anatomical Record*, 295 (3). 369-371. <https://doi.org/10.1002/ar.22424>
- Kailasam, S. (2022). LC-MS. What Is LC-MS, LC-MS Analysis and LC-MS/MS. <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/lc-ms-what-is-lc-ms-lc-ms-analysis-and-lc-msms-348238>

- Kaklamanos, G., Aprea, E., y Theodoridis, G. (2020). Mass spectrometry: principles and instrumentation. *Chemical Analysis of Food*, 525–552. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813266-1.00011-5>
- Köhler, G. & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256(5517). 495-497. [10.1038/256495a0](https://doi.org/10.1038/256495a0)
- Kurien, B. T., Dorri, Y., Dillon, S., Dsouza, A., & Scofield, R. H. (2011). An Overview of Western Blotting for Determining Antibody Specificities for Immunohistochemistry. *Signal Transduction Immunohistochemistry*, [10.1007/978-1-61779-024-9_3](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-024-9_3)
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2015). Western blotting: an introduction. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1312, 17–30. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7_5
- LaCourse, M. E., & LaCourse, W. R. (2017). General instrumentation in HPLC. *Liquid Chromatography*, 417–429. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805393-5.00017-8>
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Heads of Bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259). 680-685. [10.1038/227680a0](https://doi.org/10.1038/227680a0)
- Li, W., Jian, W. & Fu, Y. (2019). *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis*. WILEY. 10.1002/9781119274315
- Lu, T. S., Yiao, S. Y., Lim, K., Jensen, R. V., & Hsiao, L. L. (2010). Interpretation of biological and mechanical variations between the Lowry versus Bradford method for protein quantification. *North American journal of medical sciences*, 2(7), 325–328. <https://doi.org/10.4297/najms.2010.2325>
- Luque, J. & Herráez, A. (2001). *Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética*. España: Elsevier.
- MacPhee, D. (2010). Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Methods*. 61 (2). 171-177. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2009.12.001>

- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Majors, R. E. (2018). HPLC Column Technology: The First 50 Years. <https://www.labcompare.com/10-Featured-Articles/353029-HPLC-Column-Technology-The-First-50-Years/>
- Majors, R. & Baltrus, J. (2020). The Top 10 Game Changers in HPLC History. <https://theanalyticalscientist.com/techniques-tools/the-top-10-game-changers-in-hplc-history>
- Mak, C. M., Lee, H.-C. H., Chan, A. Y.-W., & Lam, C.-W. (2013). Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 50 (6), 142–162. <https://doi.org/10.3109/10408363.2013.847896>
- Manzanares-Meza, L.D., Gutiérrez-Román, C.I. & Medina-Contreras, O. (2017). MALDI imaging: beyond classic diagnosis. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 74(3): 212-218. <https://doi.org/10.1016/j.bmhmx.2017.03.004>
- Martínez, K., Salazar, A., Fernández, J., Pineda, C., Aguilar, C. & López, A. (2017). Western blot: a tool in the biomedical field. *Investigación en Discapacidad*. 6 (3). 128-137.
- McKenna, A. (2021). Atmospheric Pressure Photoionization (APPI). <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/appi>
- McMahon, G. (2021). Analizadores de masas para espectrometría de masas. <https://www.news-courier.com/analysis/articles/mass-analyzers-for-mass-spectrometry-347877#D5>
- McMahon, G. (2021). Tipos de detectores de iones para espectrometría de masas. <https://www.news-courier.com/analysis/articles/types-of-ion-detector-for-mass-spectrometry-347890>

Medhe, S. (2018). Mass Spectrometry: Detectors Review. *Science Publishing Group*, 3(4), 51-58.

<https://doi.org/10.11648/j.cbe.20180304.11>

MilliporeSigma. (s.f.). History of Western Blotting.

https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-CL-Site/es_ES/-/CLP/ShowDocument-File?ProductSKU=MM_NF-C3117&DocumentId=201608.017.ProNet&DocumentUID=35247931&DocumentType=P&Language=EN&Country=NF&Origin=PDP

Moldoveanu, S.C. & David, V. (2013). *Essentials in Modern HPLC Separations*. Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/C2010-0-65748-8>

Moldoveanu, S. & David, V. (2015). *Modern Sample Preparation for Chromatography*. ELSEVIER

Naka, K. (2021). 1-3. Standardization of laboratory automation systems: transportation methods and racks. https://www.aandt.co.jp/eng/medical/las_p/naka/

Nedelkov, D. (2017). Human proteoforms as new targets for clinical mass spectrometry protein tests. *Expert Review of Proteomics*, 14 (8), 691–699.

<https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1362337>

Niet, T. C., Bansal, J., Zhang, X., Kenneth, C. H., & Curtis, H. (1994). Enhanced chemiluminescence as a means of increasing the sensitivity of Western blot assays for HIV antibody. *Journal of Virological Methods*. 47 (1-2). 153-164. [10.1016 / 0166-0934 \(94\)90074-4](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)90074-4)

[90074-4](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)90074-4)

Olshina, M. A., y Sharon, M. (2016). Mass Spectrometry: A Technique of Many Faces. *Quarterly reviews of biophysics*, 49, 18. <https://doi.org/10.1017/S0033583516000160>

Ornstein, L. (1964). Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 121(2). 321-349. [10.1111/j.1749-6632.1964.tb14207.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14207.x)

Pássaro, C. P., Rivera, C. M., Román, M. A., Cardona, L. M., Muñoz, L. M., David, D., Quiceno, J. M., & Rojas, L. C. (2016). Guía sobre principios básicos de cromatografía y sus

aplicaciones.

https://repositorio.sena.edu.co/bitstream/handle/11404/4694/guia_cromatograf%EDa.pdf:jsessionid=232A44290C955CF9EE6D0644670B536E?sequence=1

Pitt J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical biochemist. Reviews*, 30 (1), 19–34.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2643089/>

Quintela, O., Cruz, A., Concheiro, M., De Castro, A. & López-Rivadulla, M. (2005). Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. *Revista de Toxicología*. 22(1): 7-14. <https://www.redalyc.org/pdf/919/91922102.pdf>

Quito, M. A. (2015). Validación de método analítico de cuantificación de pregabalina 150mg cápsulas, por cromatografía de alta resolución (HPLC) en laboratorio farmacéutico Qualipharm. Tesis de licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Raynie, D. E., & Watson, D. W. (2014). Understanding and Improving Solid-Phase Extraction. *LCGC North America*, 32 (12), 908-915.
<https://www.chromatographyonline.com/view/understanding-and-improving-solid-phase-extraction-1>

Remane, D., Wissenbach, D. K., & Peters, F. T. (2016). Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology — An update. *Clinical Biochemistry*, 49 (13-14), 1051–1071.
<https://doi.org10.1016/j.clinbiochem.2016.07.010>

Reuhs, B.L. & Rounds, M.A. (2009). High-Performance Liquid Chromatography. http://anuragaja.staff.ipb.ac.id/files/2017/05/2_HPLC.pdf

Rigo-Bonnin, R., Canalias-Reverter, F., Esteve-Poblador, S., Gella-Tomás, F.J., González-de la Presa, B. & López-Martínez, R.M. (2017). Desarrollo de procedimientos de medida

- basados en la cromatografía líquida de alta resolución. *Revista del Laboratorio Clínico*. 11(3): 137-146. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2017.05.001>
- Robards, K. & Ryan, D. (2022). Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods, Second Edition. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/C2019-0-03803-4>
- Roboz, J. (2016). A History of Ion Current Detectors for Mass Spectrometry. *The Encyclopedia of Mass Spectrometry*, 183–188. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-043848-1.00023-7>
- Sack, H. (2016). Mikhail Tsvet – the Father of Chromatography. <http://scihi.org/mikhail-tsvet-chromatography/>
- Schug, K. (2014). The LCGC Blog: Basics, Applications, and Innovations in Solid-Phase Extraction. <https://www.chromatographyonline.com/view/lcgc-blog-basics-applications-and-innovations-solid-phase-extraction>
- SHIMADZU. (2019). Fundamental Guide to Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS). [https://www.shimadzu.ru/sites/shimadzu.seg/files/SEG/C10G-E065A Shimadzu Fundamental Guide to LCMS.pdf](https://www.shimadzu.ru/sites/shimadzu.seg/files/SEG/C10G-E065A%20Shimadzu%20Fundamental%20Guide%20to%20LCMS.pdf)
- Shusha, B., & Zonderman, J. (2010). Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry for Clinical Applications. <https://www.spectroscopyonline.com/view/liquid-chromatography-coupled-tandem-mass-spectrometry-clinical-applications>
- SiliCycle. (2021). How to Solve Common Challenges in Solid-Phase Extraction. <https://www.silicycle.com/articles/cat/product-blog/post/how-to-solve-common-challenges-in-solid-phase-extraction>
- Singh, K.K., Gupta, A., Bharti, C., Sharma, H. (2021). Emerging techniques of western blotting for purification and analysis of protein. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7 (239). <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00386-1>

SinoBiological. (s.f.). Chemiluminescent Western Blotting Detection.

<https://www.sinobiological.com/category/chemiluminescence-wb>

Sinreih, M., Zukunft, S., Sosič, I., Cesar, J., Gobec, S., Adamski, J., & Lanišnik Rižner, T. (2015).

Combined Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Analysis of Progesterone Metabolites. *PLOS ONE*, 10 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117984>

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. & Crouch, S.R. (2008). *Fundamentos de química analítica*.

8° ed. España: Ediciones Paraninfo, S.A.

Smithies, O. (2019) How It All Began: A Personal History of Gel Electrophoresis. *Methods Mol Biol*. 1855. 1-21. [10.1007/978-1-4939-8793-1_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_1)

Stuurman, N. y Vale, R. (2016). Impact of New Camera Technologies on Discoveries in Cell

Biology. *Bio Bull*, 23 (1). 5-13. 10. [10.1086/689587](https://doi.org/10.1086/689587)

ThermoFisher. (2018). Chemiluminescence western blotting technical guide and protocols.

<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Application-Notes/TR0067-Chemiluminescence-Western-guide.pdf>

ThermoFisher Scientific. (2018). What Does the Future Hold for HPLC? Is It All About Productivity? <https://www.analyteguru.com/t5/Blog/What-Does-the-Future-Hold-for-HPLC-Is-It-All-About-Productivity/ba-p/3391>

<https://www.analyteguru.com/t5/Blog/What-Does-the-Future-Hold-for-HPLC-Is-It-All-About-Productivity/ba-p/3391>

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from

polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 76(9).

4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>

Universidad de Burgos. (2020). Cromatografía de Gases/Líquidos acoplado a espectrometría de

masas de Alta Resolución (MS-AR). <https://www.ubu.es/parque-cientifico-tecnologico/servicios-cientifico-tecnicos/espectrometria/cromatografia-de-gasesliquidos-acoplado-espectrometria-de-masas-de-alta-resolucion-ms-ar>

<https://www.ubu.es/parque-cientifico-tecnologico/servicios-cientifico-tecnicos/espectrometria/cromatografia-de-gasesliquidos-acoplado-espectrometria-de-masas-de-alta-resolucion-ms-ar>

- Universidad Nacional de Quilmes. (2008). Western blot. http://cronos.unq.edu.ar/ibcm/guiastp/2008/manana/tp6_tm.pdf
- Urban P. L. (2016). Quantitative mass spectrometry: an overview. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, 374(2079), 20150382. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0382>
- Urban, P.L., Chen, Y.-C. & Wang, Y.-S. (2016). *Time-Resolved Mass Spectrometry*. England: WILEY.
- Veiga, A. (2013). *Western Blot. Introducción y Optimización*. Abcam discover more. <https://docs.abcam.com/pdf/events/spanish-wb-webinar.pdf>
- Vesterberg, O. (1993). A short history of electrophoretic methods. *Electrophoresis*. 14(12). 1243-1249. [10.1002/elps.11501401188](https://doi.org/10.1002/elps.11501401188)
- Wang C. (2015). The Ionization Technology of LC-MS, Advantages of APPI on Detection of PPCPs and Hormones. *Austin Chromatography*, 2(2), 1032. <https://austinpublishinggroup.com/chromatography/fulltext/chromatography-v2-id1032.pdf>
- Yinon, J. (2007). Detection of Explosives by Mass Spectrometry. *Counterterrorist Detection Techniques of Explosives*, 41–59. <https://doi.org/10.1016/b978-044452204-7/50021-3>
- Zaldívar, V.J. (2022). Identificación y cuantificación de sustancias por HPLC. <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/usaii/identificacion-y-cuantificacion-de-sustancias-por-hplc/>