CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES

SECYTA

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
CROMATOGRAFÍA
Y TÉCNICAS AFINES

27
BOLETIN DE LA SECYTA
VOLUMEN 27 NÚM.1 (2006)
WWW.SECYTA.ORG

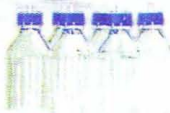
Cromatografía iónica sin reactivos

EL FUTURO DE LA CROMATOGRAFÍA IÓNICA

Reagent-Free™ IC

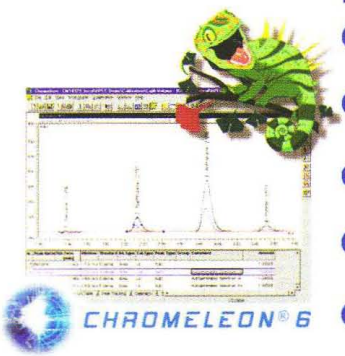
UTILICE SÓLO AGUA DESIONIZADA PARA LA GENERACIÓN AUTOMÁTICA DE ELUYENTES

TECNOLOGÍA REAGENT-FREE IC



NUEVOS MODELOS DIONEX HPLC • SUMMIT

DIONEX



- Ahorro de tiempo, trabajo y coste.
- Mejora de la reproducibilidad.
- Rango más amplio.
- Mayor sensibilidad.
- Gradientes de forma fácil y de rutina.

VERTEX

www.vertex.es

TELS: Barcelona 93 223 33 33 Madrid 91 324 00 14 Bilbao 94 447 19 99 Valencia 96 135 21 91 Vigo 986 70 00 72
FAX: 93 223 22 20 vertex@vertex.es S.A.T. Asistencia Técnica 902 19 97 92

CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES
Madrid, junio de 2006 Vol. 27, núm. 1
ISSN 1132-1369

Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (http://www.secyta.org)

ÍNDICE

2 **Editorial**

3 **Entrevista: Prof. Dr. Miquel Gassiot i Matas**

ARTÍCULOS

6 Microfluidics and nanotechnology for analytical instrumentation - New kids on the block? *por Frantiçek Foret*

8 Metabolómica y cromatografía *por Ana Cristina Soria*

18 Desarrollo de métodos analíticos avanzados para el estudio de organismos modificados genéticamente. Combinación de técnicas de PCR y técnicas electroforéticas capilares *por Laura Sánchez, Antonio Crego, Ramón González y Alejandro Cifuentes*

NOTICIAS DE LA SECyTA

33 Próxima reunión científica de la SECyTA

35 Estatutos de la SECyTA

38 Nuevos socios

INFORMACIONES

39 Congresos celebrados

INFORMACIÓN BIBLIOGRÁFICA

42 Artículos de interés

43 Reseña de libros

DE NUESTRAS EMPRESAS COLABORADORAS

44 Novedades técnicas

Redacción: Isabel Martínez Castro (iqomc16@iqog.csic.es), Lourdes Ramos (l.ramos@iqog.csic.es)
Instituto de Química Orgánica General (CSIC)
Elena Ibáñez (elena@ifi.csic.es), Alejandro Cifuentes (acifuentes@ifi.csic.es)
Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)
Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid. Tel.91 562 29 00

Publicidad: José Luis Andréu
Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)
Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid. Tel. 91-562 29 00, ext 355

Comité Editorial: A. Cifuentes, M. de Frutos, E. Ibáñez, M.L. Marina, I. Martínez Castro, L. Ramos

Depósito legal: M-1902-1975

Diseño, preimpresión e impresión: Helios, S.L. • Duque de Sevilla 16 • 28002 Madrid • Tel. 91 768 49 50

Diseño de portada: Pau de Riba

Los autores son responsables del contenido de sus artículos.

EDITORIAL

GENÓMICA, PROTEÓMICA Y OTRAS "ÓMICAS"

En febrero del 2001 se publicaron, por fin, las dos secuencias rivales completas del genoma humano [1]. En una ceremonia oficial en la Casa Blanca, Craig Venter y Francis Collins, coordinadores de los dos proyecto competidores desarrollados por Celera y por un consorcio de Instituciones públicas respectivamente, presentaron sendos borradores "casi completos" del genoma del *Homo sapiens*. Con aquel "sencillo" acto se inauguraba lo que se ha dado en llamar la era *posgenómica*. Cinco años después de aquel evento, y con la perspectiva que da el paso de tiempo, nos damos cuenta de lo poco que se sabía sobre el genoma al final de esta primera etapa del Proyecto Genoma Humano. Durante la era genómica no faltaron "gurús" que predijeran la cantidad de cosas que descubriríamos una vez secuenciado el genoma y -no menos importante- la cantidad de dinero que produciría, directa o indirectamente, el conocimiento del genoma completo. Es cierto que la genética ha aprendido muchas cosas desde febrero de 2001, aunque por ahora no tantas como se esperaba. En cuanto a lo del dinero, la cosa está todavía por ver[2]. Por ahora, lo que está ocurriendo es lo mismo que hace 150 años durante la fiebre el oro en el Oeste Americano: los que de verdad se están haciendo de oro son los que venden los picos y las palas (ahora, secuenciadores de ADN, microarrays, etc.) para llevar a cabo esa investigación.

Sin embargo, en mi opinión, con la secuenciación del genoma humano hemos aprendido dos lecciones importantes. Por una parte, se ha cumplido al pie de la letra lo que decía Mikhail S. Tswett: "todo avance científico implica un avance en los métodos", pues conviene no olvidar que la secuenciación del genoma humano sólo empezó a ser "high throughput" con el desarrollo de la electroforesis capilar[3] Por otra, ahora que la secuenciación del genoma ya está completada, ¿tiene algún interés en la práctica clínica conocer la secuencia completa del genoma de un determinado paciente? Parece ser que no. Lo importante es saber si una persona presenta, por ejemplo, las mutaciones BRCA1 y BRCA2 que le hacen más susceptible de desarrollar cáncer de mama.

En la era posgenómica han comenzado a parecer otras "ómicas": la proteómica, la metabolómica, la transcriptómica, la glicómica, la celómica, ..., y las que vendrán. Por ahora, en ellas parece que se vuelve a repetir la aproximación "holística" que caracterizó los 10 primeros años del Proyecto Genoma Humano, ya sea para abordar el problema de todas las proteínas presentes en el plasma, todos los metabolitos excretados en la orina, o todos los ARNm expresados por las células de un tumor. Como es lógico, se está haciendo con los medios que tenemos a nuestro alcance: electroforesis bidimensional en geles para la proteómica, HPLC para la metabolómica, etc. Todo esto abre nuevas perspectivas para la *cromatografía y las técnicas afines* y, por tanto, para la actividad de una buena parte de los socios de la SECyTA.

Para una mayor eficacia en el empleo de las nuevas "ómicas" no hay que olividar las dos lecciones aprendidas de su hermana mayor, la genómica, y ya citadas más arriba. ¿Son las técnicas de separación que actualmente utilizan esas "ómicas" las más adecuadas? En el caso de la proteómica y sus geles bidimensionales, quizá la técnica de separación no sea la mejor en términos de reproducibilidad, exactitud y sensibilidad, pero no hay por ahora, muchas técnicas comerciales de separación de proteínas que puedan competir con ella en términos de capacidad de separación (capacidad de picos)[4]. En mi opinión, y como es fácil comprender, todavía "hay sitio al final del autobús" de la proteómica para la ciencia de las separaciones.

Otra importante cuestión es si realmente es necesario, por ejemplo, analizar todas las proteínas del plasma de un paciente para diagnosticar un cáncer de vejiga. Después de descubrir con ayuda de la proteómica "pura y dura" –la de los geles de electroforésis en 2D, la espectrometría de masas y la bioinformática- todas la proteínas que son marcadores de cáncer de próstata, quizá baste con analizar simultáneamente tan sólo unas pocas -tres, cuatro, ..., cinco- para obtener un diagnóstico fiable del cáncer de próstata[5]. Aquí también los científicos de las separaciones tienen bastante "tajo". Lo mismo cabría decir de otras "ómicas" a la vista de los resultados preliminares publicados.

En conclusión, tanto desde el punto de vista instrumental como metodológico la proteómica y las otras "ómicas" abren un mundo insospechado al cromatografista y al electroforetista. La Profesora Ana Gago, que se encarga de organizar la 6ª Reunión Científica de la SECyTA (Vigo, 8-10 de noviembre de 2006) ha preparado un programa científico ambicioso en el que junto con temas ya tradicionales, tales como el análisis de alimentos o medio ambiente, hay lugar para conferencias, comunicaciones orales y pósters en los que se discuten el papel de la cromatografía y las técnicas relacionadas en las "ómicas" Todos los miembros de la SECyTA estáis invitados a esta reunión con el fin de -parafraseando a Hans Sloane, fundador del British Museum- "reflexionar sobre los misterios de la Naturaleza y el núcleo del pensamiento humano". Espero tener el placer de saludaros en Vigo el próximo mes de noviembre.

J.C. Diez-Masa
Presidente de la SECyTA

Bibliografía:

[1] *The Human Genome*. C.Dennis, R.Gallagher, Eds., Nature-Palgrave, Cambridge, UK, 2001.

[2] *Biotecnología: un "boom" sin beneficios*. Diario Médico, 4 de mayo de 2006 (Tomado de un editorial de The Economist)

[3] N.J. Dovichi, *DNA sequencing by capillary electrophoresis*. Electrophoresis 18 (1997) 2393-2399. *Development of DNA sequencer*. Science 285 (1999) 1016-1016.

[4] J.C.Giddings, *Unified Separation Science*. Wiley Ed., N.Y., 1991 pp.112-140.

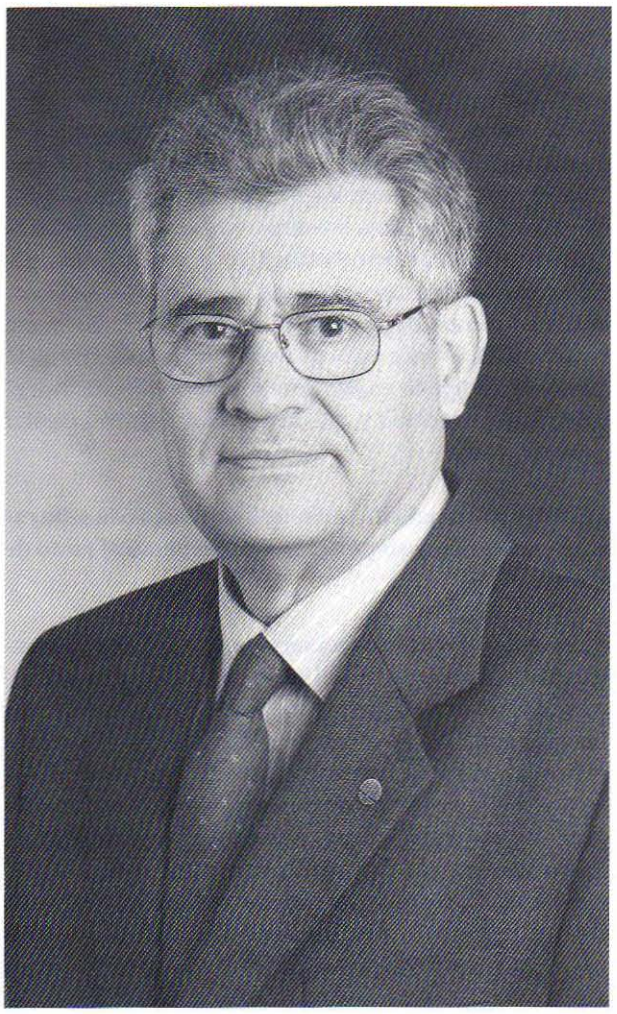
[5] M.Sánchez-Carbayo, N.D. Socci, J.J.Lozano, B.B. Haab, C.Cordón-Cardó, *Profiling bladder cancer using targeted antibody arrays*. Amercan Journal of Pathology 168 (2006) 93-103.

ENTREVISTA

Entrevista realizada al Profesor Miquel Gassiot i Matas

Luis Comellas i Riera
IQS, Universitat Ramon Llull

Miquel Gassiot forma parte de la historia de la Cromatografía española. Fue uno de los fundadores del GCTA (Grupo de Cromatografía y Técnicas Afines) de la Real Sociedad Española de Química, y el segundo presidente del grupo, desde 1976 hasta 1980. Ingeniero Químico del Instituto Químico de Sarrià en 1960, Licenciado en Ciencias (Sección de Químicas) por la Universidad de Barcelona en 1962 y Doctor en Ciencias (Sección de Químicas) por la Universidad de Madrid en 1966. Realizó su trabajo de final de carrera en el IQS sobre la separación de los ácidos grasos del aceite de Chaulmoogra mediante cromatografía de papel, y su tesis doctoral en cromatografía de gases. Como profesor en el IQS, de la Universitat Ramon Llull, del que es catedrático, se ha dedicado a la docencia de la Química general y de las Técnicas Cromatográficas y a la investigación en el campo de la Cromatografía y sus aplicaciones a los más diversos ámbitos. Su designación como Director general del Instituto Químico de Sarriá en 1985 y posteriormente su elección y nombramiento como Rector de la Universitat Ramon Llull de Barcelona significaron su total dedicación a cargos de gestión debiendo abandonar, con gran pesar, la docencia directa y la dedicación a la cromatografía. Actualmente, habiendo agotado el mandato como rector de acuerdo con los estatutos de la "Universitat", dirige el departamento de Ingeniería Química del IQS. El día 4 de diciembre de 2003, Miquel Gassiot ingresó en la Academia de Ciencias y Artes de Barcelona como Académico Numerario.



¿Cómo fueron sus inicios en las técnicas de separación?

Fueron duros pero apasionantes, dejando aparte las primeras experiencias con cromatografía de papel, la puesta a punto del primer cromatógrafo de gases que llegó a nuestro país exigió muchas horas y paciencia. Afortunadamente mi director de tesis, el profesor Luis Condal, que murió en 2005, era inasequible al desaliento, trabajador infatigable, excelente profesor de Química Física que dominaba la electrónica y apasionado de la instrumentación científica. Por otra parte, el Dr. Condal junto con el Dr. Montagut S.J. y el Dr. Casassas de la Universidad de Barcelona, en los inicios de los años 60 habían intuido las grandes posibilidades que tendría la cromatografía en un no lejano futuro. Inmediatamente después de haber defendido yo la tesis doctoral, el Dr. Condal dejo en mis manos el laboratorio y el tema de la cromatografía que entonces se centraba casi exclusivamente en la de gases. Esta fe en el porvenir de la metodología de Tswett enriquecida con la incipiente instrumentación analítica mantuvo el entusiasmo y ayudó mucho a superar las no pocas dificultades de puesta a punto y aplicación de esta técnica, en unos tiempos en los que aprender fuera de nuestro país era mucho más difícil que ahora. Con el legendario cromatógrafo Perkin Elmer 116E - magnífico aparato - con detector catarométrico, y resistente a inexpertos, abordamos con éxito los más diversos problemas que la industria y la sociedad plateaban a la Química Analítica. Resolvimos, en 1961, el problema del análisis del "gas butano"; también colaboramos con el

problema del metanol en bebidas alcohólicas y alcoholes vínicos. Naturalmente, las columnas eran de relleno, que permitían alcanzar los 3000 platos teóricos con dos metros de longitud de columna, optimizando el flujo de gas portador; que era hidrógeno por exigencias del detector, y porque el helio estaba entonces fuera de nuestro alcance. Uno de los problemas que más satisfacción nos produjo en aquellos primeros años fue la posibilidad de resolver la separación de los ácidos grasos de un aceite o grasa, como esteres metílicos. La información que se conseguía con la cromatografía sobre la estructura de un triglicérido era muy superior a la que ofrecían las clásicas técnicas analíticas a través de los índices. Podría alargarme mucho sobre estos inicios, que fueron apasionantes y que todo lo positivo que conseguimos se debe en una gran parte a los magníficos colaboradores que tuve y a los que dediqué un artículo: Una vivencia cromatográfica de 25 años; publicado en el Boletín Informativo del grupo de Cromatografía y Técnicas afines, vol. 9, Nº 1, páginas de la 11 a la 23.

Durante los 30 años de vida del GCTA ¿Qué hecho recuerdas con mayor cariño?

No es fácil responder a esta pregunta, por qué recuerdo con gran cariño "todo el GCTA" No obstante, si debo seleccionar algo, escogería dos hechos y un "talante"
El primero de ellos sería el nacimiento del grupo: éramos siete, entonces jóvenes la mayoría y "magníficos" todos, por el entusiasmo y por el sentido práctico y de solidaridad científica con la que emprendimos esta iniciativa. Un cierto espíritu del 68 daba un carácter especial al nuevo grupo; sí quizás entonces teníamos una cierta aureola contestataria. Pero dejando de lado los detalles de apariencia, fue muy real el espíritu de colaboración y ayuda que de forma casi inmediata se estableció entre los miembros del grupo, esto explica el gran interés que el CGTA despertó entre los cromatografistas de la industria. Por otra parte hubo un gran interés entre los miembros de la junta directiva en atraer a jóvenes investigadores (doctorandos) y en promover la colaboración y participación de las empresas de instrumentación.
El segundo hecho fue el 10th Internacional Symposium on Chromatography que, gracias a la existencia del GCTA, se consiguió que se realizara en Barcelona del 30 de octubre al 4 de noviembre de 1974. Tan sólo dos años después de la creación del grupo fue posible traer a España el congreso de cromatografía más importante del mundo. El éxito del congreso fue absoluto y durante muchos años los especialistas de muchos países comentaron la perfecta organización del congreso de Barcelona. Vale la pena destacar una anécdota: en la cena - espectáculo que hubo al final del congreso un hábil mago consiguió que salieran pollitos vivos de los pantalones de Mc. Taggart, conocidísimo cromatografista inglés.
Sobre el "talante", término que los políticos están desvirtuando, pero ni con el diccionario de sinónimos acierto a sustituir para referirme al estilo, a la peculiar vida del grupo. Se consiguió un ambiente de exigencia científica desprovista de empaque academicista. Todos nos encontrábamos en las reuniones con ánimo de aprender, desde los más veteranos, con más experiencia por estar en las universidades o centros de investigación, hasta los más jóvenes o principiantes; nadie se encontraba incómodo en las jornadas o asambleas. Quizás esta fue una de las razones por la cual el GCTA fue el grupo especializado de la Real Sociedad Española de Química que más, y rápidamente, creció.

¿Cómo han evolucionado las técnicas de separación en España en estos 30 años?

Mucho y bien. Ni los más optimistas o soñadores, que en los primeros años 60 me animaron a dedicarme a algo que parecía casi trivial, podían imaginar los alcances de la cromatografía en nuestro país. Con sano orgullo vemos la aparición de publicaciones de cromatografistas españoles en las más importantes revistas internacionales. Lo más veteranos sabemos lo difícil que fue el conseguir las primeras publicaciones en Journal of Chromatography. Por otra parte, la cromatografía se ha transformado en una técnica fundamental en los más diversos ámbitos de la ciencia y de la industria moderna, y los cromatografistas españoles han respondido a las exigencias de la investigación científica más avanzada. La bioquímica es posiblemente el campo de la ciencia en el que más despunta nuestro país, avance en el que nuestra cromatografía, la española, ha tenido un papel importante. Recordemos el rol de la electroforesis y, más aún, la electroforesis capilar en la genómica.

¿Cuál es la actual situación de las técnicas de separación en España y su posición con respecto al resto de Europa?

En cuanto a nivel de conocimientos, experiencia e instrumentación estamos a "nivel europeo". No obstante deberíamos mejorar en organización, hace falta intensificar el trabajo en red. No olvido que el GCTA se caracterizó precisamente en iniciar este trabajo en red buscando complementar entre grupos los recursos que ninguno podía poseer en su totalidad. Por otra parte, ahora se corre el riesgo de quedarnos con una maravillosa herramienta, el instrumento, y no hacer progresar las muchas posibilidades que tiene el conjunto de la cromatografía, en todas sus versiones, junto con la espectrometría de masas. Ahora en

España ya no faltan instrumentos, la gran mayoría de ellos funcionan, pero corremos el riesgo de quedarnos aquí, como excelentes y distinguidos operadores de esta maravillosa y compleja metodología. Queda mucho por investigar aún y, si no lo hacemos no conseguiremos mantener el nivel que hemos alcanzado.

¿Hacia dónde crees que va a evolucionar la cromatografía? ¿Qué perspectivas de futuro le ves a esta técnica?

A mi juicio la cromatografía está saliendo del ámbito analítico para constituirse también en una Operación Básica de la Ingeniería Química. La adsorción ya forma parte, desde hace años, de muchos procesos continuos en plantas de gran tonelaje en la química de las Comodities, a pesar de ser la adsorción un proceso discontinuo. Por otra parte, la Química Fina del futuro, la que podríamos llamar "Química Fina 2" o "Química Fina Fina", está llamada a recurrir a procesos continuos y limpios reduciendo el impacto ambiental y el coste energético, por tanto no debe extrañarnos que sea precisamente aquí donde se abre un interesante porvenir a la cromatografía. La cromatografía preparativa a gran escala es ya una realidad en algunos procesos y la Mobile bed Chromatography, está llamada a resolver la limitación de la discontinuidad del proceso cromatográfico para poder formar parte de un proceso industrial continuo. Las interesantes experiencias de las cromatografías multidimensionales, así como las enormes posibilidades del moderno control de procesos, serán la base del desarrollo de los procesos cromatográficos preparativos de separación de alta eficacia en continuo. Los cromatografistas no debemos estar ausentes de esta interesantísima aplicación de la cromatografía en el campo de la ingeniería química.

¿Qué satisfacciones y decepciones te han proporcionado las técnicas de separación?

Satisfacciones muchísimas. Sería muy difícil enumerarlas. Creo que el entusiasmo que destila el mencionado artículo que publiqué en el Boletín del GCTA y mi memoria de ingreso en la Academia de Ciencias y Artes de Barcelona son la mejor indicación de lo mucho que gocé en el laboratorio, con los cromatógrafos de todo tipo y el acoplamiento CG-EM. Las clases de "Técnicas Separativas" y los muchos cursos de graduados que impartí en el IQS, y en varios países de América Latina, fueron fuente de muchas satisfacciones. Pero donde mi realización personal fue máxima fue en la dirección de las tesis doctorales y los trabajos de fin de carrera, donde tuve la ocasión de aprender mucho de mis alumnos: cromatografía y muchas cosas más que siempre recordaré y agradeceré.
Decepciones, como he dicho, ninguna. Tan solo el pesar por haber tenido que dejar la Sección de Cromatografía, para dedicarme al servició que me pedía la institución a la cual me entregué. Pesar que ha sido compensado por la satisfacción de comprobar que la Sección de Cromatografía del IQS está en mejores manos de las que salió.

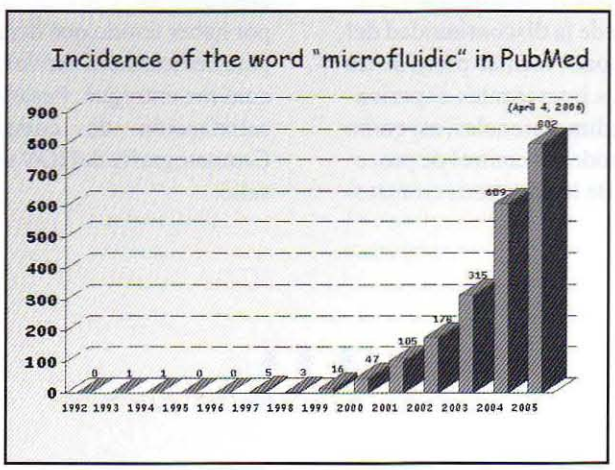
* * *

Microfluidics and nanotechnology for analytical instrumentation - new kids on the block?

Frantiçek Foret, Institute of Analytical Chemistry, Brno, Czech Republic. foret@iach.cz

At the peak of the "irrational exuberance" of the stock market around the year 2000 microfabrication and microfluidics were the banners for success. Many startup companies made their fortunes overnight when going public at that time. Several years later only a few of the "old timers" remain in the business. Even less of them are really making profit on the microfluidics; however, new startups are still being formed. In his editorial "Microfluidics, the Ultrahigh-Throughput Underachiever" in the GenomeWeb News (5/14/03) the senior editor John S. MacNeil calls this period as a time of "...frantic search for the one application that will force reluctant customers in academia, biotech, and big pharma to go whole hog on microfluidics." since the whole concept "...might just be too powerful a concept not to succeed eventually."

Similarly, the nanotechnology is driving lots of news in the media and high hopes in the public. The rich and highly developed countries (US, EU), which started forming National nanotechnology initiatives to promote the field are now followed by many nations around the world. For example NANOTEC was officially established by the Thai Cabinet's decree in response to the fast growing development of nanotechnology and its applications to future manufacturing. At the same time the venture capitalists are much less enthusiastic in funding the startups in the field. The title of the recent report by Cientifica (www.cientifica.com) "VCs to Nanotech: Don't Call Us!" says it all. Seven years away from being a projected trillion dollar industry, nanotechnology scarcely registers on the radar of most venture capitalists. Even the well established companies are now losing money while they wait for their markets to emerge in 2012.



While we may be still several years from the major practical applications, the new technologies will, eventually, change many fields in the science, technology and medicine. Take the applications of microfluidics in chemical analysis as an example. Although the first examples of the development of the microfabricated instrumentation can be traced back to the mid seventies when the reports of the famous gas chromatograph on a silicone chip were published [1], without any doubt the major trend of miniaturization and integration of analytical processes and instrumentation has been witnessed only in the past ten years, or so. The figure shown below clearly demonstrates the trend. Plotting the occurrence of the word "microfluidic" for the past decade reveals that the number of scientific articles listed in the PubMed database (www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed) started increasing exponentially in just the same time when the stock market bubble burst.

It can be anticipated that microfluidics [2] (Lab-on-a-chip) will play an important role in the new instrumentation for high sensitivity/high throughput analyses. The main advantages of the technology include speed of analysis, minimum consumption of the reagents and samples, integration of functional elements and possibility to create massively parallel systems for high throughput. Additionally, the reduction of the instrument size leads to lower requirements for the laboratory space.

Typical examples of the applications of miniaturization and microfluidics in analytical instrumentation include systems for microcolumn chromatography and electrophoresis, sample processing units, e.g. for preconcentration and desalting, or chemical microreactors. The applications are aimed mainly for the analysis of DNA, proteins and peptides or drug screening. In an increasing number of cases mass spectrometry coupling is required and this trend will keep growing especially with the evolution of Proteomics [3] Indeed, the first commercial microfabricated systems for

electrospray-mass spectrometry coupling are already available from several vendors including, e.g., Advion, Diagnoswiss or Agilent. One of the important features of microfabrication technology from the prospective of a separation scientist is the fact that leak-free, zero dead volume junctions can easily be produced. Additionally, when a structure performance is optimized, the available replication technologies can easily mass produce the systems with identical performance. The fabrication technologies include the processes used commonly in electronics, e.g., photolithography and wet chemical etching or reactive ion etching in glass or silicon. Structures as small as 30 nm can currently be fabricated in microelectronics; however, two to three orders of magnitude larger structures are more common in microfluidics. Precision injection molding can be used for replication in plastic materials.

The advantages of the new technologies are clear and hold strong even in the current period of the diminished interest of the venture capital. The potential applications are endless, and, although it may take some time for the full deployment, the recent instrument design improvements of the analytical instrumentation strongly benefit from the technology trends.

Acknowledgements. Supported by the Grant Agency of the Czech Republic 203/06/1685.

REFERENCES

[1] S. C. Terry, G. H. Jerman, J. B. Angell, A gas chromatographic air analyser fabricated on silicon wafer using integrated circuit technology. IEEE Trans. Electron Devices, 1979, 26, 12, 1880–1886.

[2] P. S. Dittrich, A. Manz, Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. Nat. Rev. Drug Discov. 2006, 5, 210-218.

[3] I. M. Lazar, J. Grym, F. Foret, Microfabricated devices: A new sample introduction approach to mass spectrometry. Mass Spec. Rev., 2006, 25, 573-594.

* * *

Metabolómica y Cromatografía

Ana Cristina Soria
Department of Chemistry. University of York. York (Reino Unido)

Desde finales del siglo pasado, ha sido notable la expansión en la utilización de la terminología -ómica (del inglés *-omics*) en el estudio e investigación de las ciencias de la vida. Se ha llegado incluso a comentar que, para convertirse instantáneamente en experto en un determinado campo, aunque éste haya sido estudiado desde antiguo, basta con acuñar un nuevo término para él [1] Esta tendencia actual ha dado lugar a la creación hasta la fecha de más de 100 neologismos para la familia "–ómica" [2], que incluye entre los más conocidos los términos genómica, proteómica y, más recientemente, metabolómica.

METABOLÓMICA O EL ESTUDIO DE METABOLITOS

Mientras que la genómica hace referencia al estudio de los genes y la proteómica al de las proteínas, la **metabolómica** (en inglés *metabolomics*) ha sido definida como la medida cuali- y cuantitativa del **metaboloma**. Se entiende como metaboloma el conjunto de metabolitos de bajo peso molecular (lo que excluye a las proteínas) sintetizados por un sistema biológico dado, sea éste una célula, tejido, fluido, órgano, organismo, etc, en un determinado estado fisiológico [3-7] Dado que la información genética contenida en el ADN, y transcrita a través del ARN, determina la síntesis de una proteína, y ésta a su vez la de los metabolitos presentes en un cierto sistema biológico (p.ej. la activación de una enzima puede dar lugar a la síntesis o degradación de diversos metabolitos), el metaboloma representa la expresión final del genoma, transcriptoma y proteoma, dando cuenta de la interrelación existente entre los distintos niveles del **flujo de información** en biología (figura 1).

Al igual que el ADN, el ARN y las proteínas comparten bloques de construcción comunes, el metabolismo de la mayoría de los organismos comparte muchos atributos fundamentales. Pero del mismo modo que un organismo tiene su único perfil de ADN, también presenta un único perfil metabólico.

Mientras se ha dedicado un considerable esfuerzo hasta el momento a la determinación de genoma y proteoma para varios sistemas, se ha prestado mucha menos atención al conocimiento de los productos finales de la expresión genética, los metabolitos. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios se han dirigido a la cuantificación de un número predefinido de "metabolitos diana" o a producir "huellas" de los cambios metabólicos en distintas poblaciones, más que a un conocimiento en profundidad del funcionamiento bioquímico de las rutas metabólicas.

Como se ha mencionado previamente, la metabolómica incluye en su objetivo, además de la determinación cualitativa y cuantitativa de los metabolitos de un sistema, sus variaciones dinámicas y sus implicaciones bioquímicas, por lo que requiere un enfoque multidisciplinar. En este contexto, la colaboración junto a expertos en técnicas de separación y espectrometría de masas de especialistas en otras áreas resulta imprescindible. Así, muchos de los trabajos que en la actualidad se encuadran en el análisis cromatográfico podrían englobarse en metabolómica si se pretende un enfoque bioquímico integrado, siendo entonces necesaria la colaboración con expertos en bioquímica (en cuanto a objetivo e interpretación), en informática (para el procesado previo y posterior de los datos) y en estadística (para la validación de resultados).

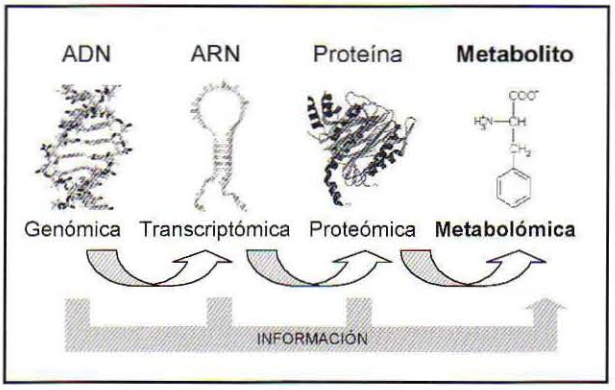


Figura 1. Flujo de información en biología.

¿QUÉ PODEMOS APRENDER DEL ESTUDIO DE METABOLITOS?

Dado que el metaboloma de una muestra es reflejo directo del estado bioquímico de un organismo, intrínsecamente relacionado con su estado fisiológico, el estudio de metabolitos constituye una medida indirecta de la fisiología de la célula, resultando muy sensible e indicativo de la naturaleza de cualquier cambio a nivel celular.

Tabla 1. Dificultades del análisis del metaboloma [7]

METABOLOMA
• Todas las moléculas de bajo peso molecular en un sistema biológico.
• Más de 40.000 metabolitos identificados en muestras biológicas.
• Identidad desconocida de muchos metabolitos.
• Estructura, funcionalidad, concentraciones y propiedades fisicoquímicas muy diferentes.
• Compuestos pertenecientes a una amplia variedad de rutas metabólicas.

El metaboloma refleja los efectos combinados de muchas influencias (fármacos, factores ambientales, estado de salud, nutrición, modificaciones genéticas, etc) sobre el estado fisiológico y el fenotipo, por lo que su determinación contribuye también a mejorar el conocimiento de la bioquímica a nivel celular. Pero el estudio del metaboloma es complejo (tabla 1), viéndose condicionada su expansión por el avance en las tecnologías analíticas e informáticas.

TERMINOLOGÍA

Si bien la mayoría de investigadores parece coincidir, con ligeras variaciones, en lo que se entiende por metaboloma, la definición de otros términos comúnmente empleados para referirse al estudio de metabolitos es, sin duda, menos precisa. Tanto la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) como la recientemente creada Sociedad de Metabolómica (www.metabolomicssociety.org), consultadas al respecto, no parecen haber encontrado todavía la forma de clarificar la definición de estos términos, por lo que las definiciones abajo mencionadas han sido tomadas de un limitado número de referencias bibliográficas [3,4] en las que se ha planteado resolver esta cuestión.

Con el fin de simplificar la terminología, se ha pretendido en este artículo utilizar una nomenclatura basada en la finalidad del estudio, sin referirla a la amplia variedad de muestras cuyos metabolitos pueden ser objeto de análisis. Se incluye también la terminología inglesa que ha servido de base para dichas definiciones.

La determinación de metabolitos puede encuadrarse en cuatro áreas generales (figura 2):

- **Análisis de metabolitos específicos** (*Metabolite target analysis*): Hace referencia a la determinación de uno o unos pocos compuestos de interés para la investigación que se pretende (p.ej. búsqueda de biomarcadores de enfermedades). En el caso de compuestos cuyo análisis requiere gran sensibilidad, y con el fin de mejorar la relación señal-ruido, es frecuente en este tipo de estudios el empleo de protocolos de purificación exhaustivos, que eliminen las posibles interferencias asociadas a la matriz de la muestra.

- **Perfil metabólico** (*Metabolite / Metabolic profiling*): Permite la cuantificación de una serie de metabolitos conocidos y relacionados, bien por su semejanza estructural o funcional, bien por estar implicados en una ruta metabólica específica. La preparación de la muestra y la adquisición de datos pueden focalizarse en las propiedades químicas de estos compuestos, con la ventaja de reducir las interferencias asociadas a efectos matriz y proporcionar elevada sensibilidad. En el contexto de la investigación farmaceútica, este tipo de estrategias se utiliza frecuentemente para describir el destino metabólico de un medicamento.

- **Huella metabólica** (*Metabolic fingerprinting*): Hace referencia al análisis de metabolitos en una muestra con fines de clasificación; es decir, se pretende la diferenciación entre muestras correspondientes a distintas poblaciones o la clasificación de

Figura 2. Clasificación del análisis de metabolitos (3, 4)

muestras desconocidas en grupos identificables. El estudio de huellas metabólicas tiene gran potencial de aplicación en investigación biomédica y farmacéutica (p.ej. diferenciación entre individuos enfermos y sanos o entre enfermos sometidos o no a tratamiento) y en control de calidad.

En este enfoque es primordial el obtener una gran cantidad de información cuantitativa fiable, aunque el hecho de obtener señales para un número muy elevado de metabolitos dificulte, e incluso impida, su identificación: toda la información contenida en la huella metabólica es utilizada para la clasificación (estudios no sesgados). Estos análisis generalmente requieren un mínimo pretratamiento de la muestra; robustez y reproducibilidad experimentales son sus características analíticas más importantes.

- **Metabolómica** *(Metabolomics)*: Su objetivo es el análisis cualitativo y cuantitativo de todos los metabolitos de un sistema biológico, es decir, de su metaboloma. Tanto el tratamiento de muestra, como la adquisición de datos en metabolómica, deben estar orientados a cubrir el mayor intervalo, en cuanto a tipo y número, de compuestos presentes en la muestra, asegurando al mismo tiempo una elevada recuperación para todos ellos. El método analítico debe ser, además, lo suficientemente sensible, independiente de la matriz y rápido. Con el fin de describir la respuesta del sistema biológico y, dado que la información generada es compleja, se necesitan también adecuadas herramientas informáticas para manejar, almacenar, normalizar y evaluar los datos adquiridos.

Con un significado similar al de metabolómica, la utilización del término metabonómica *(metabonomics)* ha sido también frecuente en el contexto de la determinación de la toxicidad de fármacos [8] y en estudios mediante Resonancia Magnética Nuclear (NMR) de las huellas metabólicas dinámicas de biofluidos y tejidos, en respuesta a estímulos patofisiológicos o modificaciones genéticas [9-11]. En la actualidad no existe acuerdo sobre las diferencias entre ambos términos, por lo que por el momento parece razonable el evitar el empleo del último de ellos.

Otro de los términos recientemente acuñados en relación al estudio de metabolitos es **biología de sistemas** *(Systems Biology)*. Su empleo surge del reto de integrar el conocimiento en genética, transcriptómica, proteómica, metabolómica y bioinformática, en un intento de describir las rutas metabólicas y modelizar el comportamiento del sistema entero, desde la célula al organismo [12] El objetivo final de la biología de sistemas es utilizar el conocimiento de dichas rutas metabólicas para ayudar a entender cómo trabaja la célula, avanzar en el entendimiento de enfermedades y conocer qué modificaciones precisas pueden llevarse a cabo mediante ingeniería genética de células.

TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS DE METABOLITOS

El conjunto de metabolitos presentes en un sistema biológico es una mezcla compleja de compuestos de muy diversa funcionalidad y polaridad, presentes en un amplio intervalo de concentraciones. Las técnicas a utilizar en su análisis deben por tanto ser las de separación (cromatografía de gases GC, cromatografía de líquidos LC y electroforesis capilar CE) de elevado poder de resolución, las espectroscópicas (NMR y espectrometría de masas MS) de alta sensibilidad y selectividad [13], y los acoplamientos de ambas.

La espectroscopía de NMR ha liderado durante muchos años el análisis metabolómico, gracias a la posibilidad que ofrece esta técnica de obtener simultáneamente señales para una gran variedad de compuestos, y de proporcionar al mismo tiempo información estructural. Sin embargo, posee una desventaja importante que es su baja sensibilidad con respecto, por ejemplo, al acoplamiento de técnicas cromatográficas-espectrometría de masas (8). De ahí que en este artículo nos centraremos fundamentalmente en la aplicación de las técnicas de separación y la espectrometría de masas al análisis de metabolitos.

- **GC, LC, CE**

La **cromatografía de gases** proporciona separaciones de alta resolución y sensibilidad para un elevado número de metabolitos volátiles. Sin embargo, muchos compuestos de interés (p. ej. algunos metabolitos en extractos de plantas) son poco volátiles para su análisis directo por GC y requieren una etapa previa de derivatización química, en la que dichos compuestos se transforman en derivados menos polares y más volátiles. Pese a los eficaces métodos de derivatización disponibles, es precisamente esta etapa de pretratamiento de la muestra la que constituye el principal inconveniente en GC, pues condiciona el elevado número de muestras a analizar que es frecuentemente requerido en metabolómica. La **cromatografía de líquidos** contribuye a expandir el rango de aplicación de las técnicas cromatográficas en metabolómica, especialmente en el estudio de perfiles metabólicos de familias de compuestos. La LC, comparada con la GC, tiene menor

resolución, pero permite la separación con excelente sensibilidad de compuestos de mayor peso molecular y polaridad que en GC, sin necesidad de una etapa de derivatización previa. La **electroforesis capilar** resulta ventajosa para la separación de metabolitos con elevada resolución, en tiempos de análisis cortos y con pequeñas cantidades de muestra. Su aplicación en metabolómica se encuentra en la actualidad mucho menos extendida que la de GC o LC.

El empleo de detectores generales (FID en GC; UV-Vis en LC y CE) en el estudio de **huellas metabólicas**, permite la obtención en un tiempo razonable de gran cantidad de información para un número de muestras estadísticamente representativo de cada una de las poblaciones comparadas. La asequibilidad de dicha instrumentación, en cuanto a inversión inicial y gastos de mantenimiento, constituye una ventaja adicional en este tipo de estudios.

• MS

Otra posibilidad para el análisis de metabolitos **con fines de clasificación** es la inyección directa de la muestra en la fuente de un espectrómetro de masas, a ser posible de alta resolución [14-16]. La ionización por electrospray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica (APCI) generan principalmente moléculas protonadas ($[M+H]^+$), desprotonadas ($[M-H]^-$) o aductos ($[M+cation]^+$) para cada especie presente en la muestra, con poca o ninguna fragmentación. Los instrumentos de Resonancia Iónica Ciclotrónica por Transformada de Fourier (FT-ICRMS) proporcionan una resolución que permite determinar la masa exacta del metabolito con una precisión de hasta 4 ó 5 cifras decimales, lo que posibilita la asignación de su fórmula empírica. Las **huellas de masas metabólicas** *(metabolic mass fingerprinting)* obtenidas por MS, presentan para cada metabolito un espectro característico con uno o varios picos, separado de los otros metabolitos de acuerdo con su masa molecular exacta, aunque no de isómeros de la misma composición elemental.

• GC-MS, LC-MS, CE-MS

La utilización de la **espectrometría de masas** como sistema de detección en el acoplamiento con diversas técnicas de separación **(GC-MS, LC-MS, CE-MS)** presenta como principales ventajas en el estudio de metabolitos una mayor fiabilidad y un aumento de sensibilidad con respecto a los detectores universales, así como la posibilidad de obtener información estructural sobre los compuestos separados.

Tanto si el enfoque es el desarrollo de nuevas metodologías como la aplicación a la caracterización cuali- y cuantitativa de muestras, el estudio de metabolitos específicos generalmente requiere el acoplamiento de una técnica de separación a la espectrometría de masas (GC-MS, LC-MS y CE-MS). El acoplamiento con masas permite confirmar las identificaciones basadas en tiempos de retención cromatográfica (o migración) y coinyección de patrones. Este tipo de enfoque es frecuente en estudios clínicos, toxicológicos, etc, donde se pretende la determinación exacta de biomarcadores de enfermedades, agentes tóxicos, etc. Similarmente, GC-MS, LC-MS y CE-MS se emplean frecuentemente en la caracterización de un mayor (entre 5 y 30) número de metabolitos, estructural o funcionalmente similares, en muestras diversas (p.ej. perfiles metabólicos de flavonoides en frutas, catecolaminas en orina, etc). El encuadre de ambos enfoques (estudio de metabolitos específicos y perfiles metabólicos) dentro de metabolómica no es todavía frecuente, por lo que para la designación de este tipo de estudios es todavía común el empleo de la nomenclatura tradicional (no –ómica).

La aplicación de este tipo de acoplamientos a la obtención de huellas metabólicas con fines de clasificación es mucho más frecuente y presenta una ventaja adicional, ya que una vez determinadas las señales del metabolito (o metabolitos) responsables de la diferenciación entre muestras, la información proporcionada por los datos de MS junto con el empleo de bibliotecas de espectros (p.ej. en el caso de GC-MS), facilitan su caracterización estructural.

• Otras (LC-MS/MS, LC-MS^n, GCxGC, GCxGC-MS, MS-MS, etc)

El empleo de sistemas tándem de espectrometría de masas **(LC-MS/MS, LC-MS^n, MS-MS, GC-MS-MS, CE-MS-MS)** contribuye adicionalmente a la elucidación estructural, resultando de gran utilidad en la identificacion de nuevos o inusuales metabolitos, o en la caracterización de metabolitos conocidos en casos donde existe ambigüedad. El elevado número de metabolitos presentes en muestras complejas, así como las posibles interferencias asociadas a la matriz dificultan el empleo de MS-MS sin una etapa previa de separación en la caracterización cualitativa de metabolitos. En todos los casos mencionados, los analizadores de masas utilizados incluyen cuadrupolos, trampas iónicas, analizadores de tiempo de vuelo (TOF), de Transformada de Fourier (FT), y espectrómetros de masas híbridos [17]. La elección de uno u otro de estos sistemas vendrá dada por un compromiso entre exactitud, robustez y sensibilidad.

El reciente desarrollo de la cromatografía de gases multidimensional **(GCxGC)** permite, gracias a la utilización en un único análisis de dos fases estacionarias de distinta naturaleza (p.ej. una apolar y otra polar), multi-

plicar la resolución cromatográfica y aumentar en gran medida el número de metabolitos separados con respecto a GC convencional, lo que la confiere una gran utilidad en el estudio de **huellas metabólicas**. Su acoplamiento con espectrometría de masas **(GCxGC-MS)** incrementa el grado de certeza con respecto a GC-MS en la identificación de analitos.

La dificultad práctica y los costes de análisis asociados al empleo de estas técnicas limitan su aplicación en metabolómica.

TRATAMIENTO DE DATOS

El tratamiento de los complejos datos obtenidos en metabolómica generalmente comprende una etapa de **preprocesado** de la información (tratamiento del ruido, corrección de la línea base, normalización, alineamiento entre cromatogramas o electroforegramas, etc), y otra posterior de **análisis estadístico** de los resultados.

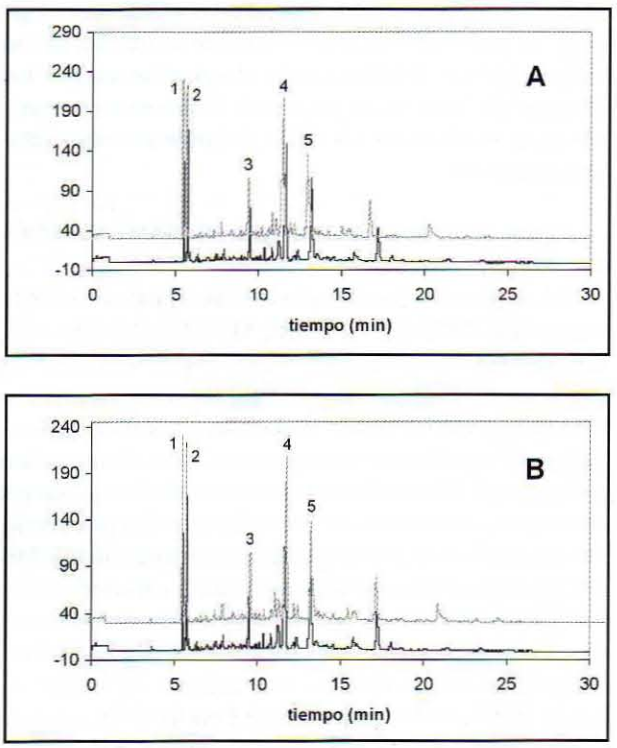


Figura 3. Electroforegramas correspondientes al análisis por MECC de dos muestras de orina (A) previo al alineamiento y (B) después del alineamiento de datos haciendo uso de los patrones internos 1-5. Las condiciones experimentales empleadas fueron: capilar no recubierto (50 cm x 50 µm d.i.), buffer (25 mM borato sódico / 75 mM SDS / 6,25 mM _-ciclodextrina sulfatada; pH 9,50), 18 kV, 20ºC, inyección: 0,5 psi durante 5 s, detección: 195 nm).

Cuando se estudian huellas metabólicas, el alineamiento entre cromatogramas (o electroforegramas) es una etapa necesaria, dado que las variaciones en los tiempos de retención (o migración) son una limitación en el empleo de las técnicas de separación. La calidad del alineamiento condiciona en gran medida los resultados obtenidos en la aplicación del análisis estadístico con fines de clasificación.

El preprocesado automatizado del gran volumen de datos generado en el estudio de metabolitos ha hecho imprescindible el desarrollo y comercialización de diferentes paquetes informáticos (ver apartado "Algunos sitios web de interés"). La mayoría de los métodos computacionales sugeridos para el alineamiento de datos se basan en el empleo de patrones internos con elución similar a la de los picos de interés. Dichos patrones pueden añadirse a la muestra, o ser elegidos de entre algunos de sus componentes, cuya presencia sea común a la totalidad de las muestras. Generalmente, cuantos más patrones internos se empleen, mejor será el alineamiento. Este procedimiento presenta como principales ventajas el que los patrones están sometidos exactamente a las mismas condiciones cromatográficas que el resto de picos y la rapidez en el procesado de datos (segundos). Su principal limitación consiste en la dificultad para encontrar dichos marcadores en los casos de desplazamiento significativo de la señal.

A modo de ejemplo, la figura 3 muestra los electroforegramas correspondientes al análisis por CE-UV-Vis de dos muestras de orina, donde muchos de los picos de la segunda muestra se han desplazado significativamente con respecto a la primera y, por tanto, requieren un alineamiento. Como puede observarse, después del alineamiento empleando como patrones internos cinco de los componentes de la orina, dicho desplazamiento ha sido prácticamente eliminado.

Recientemente, se han utilizado diversos algoritmos multivariantes de alineamiento *(external pattern matching)* para el preprocesado de señales cromatográficas [18,19]. En este caso, el algoritmo alinea la muestra a un cromatograma modelo, previamente seleccionado, maximizando la correlación de un cromatograma con el otro. La aplicación de este procedimiento requiere, por tanto, que la muestra y el cromatograma modelo sean razonablemente similares. Esta metodología presenta la ventaja de no requerir ni la coinyección, ni incluso la identificación de picos individuales en el cromatograma previo al alineamiento. Son desventajas la requerida similitud entre los cromatogramas a alinear, y el aumento en el tiempo de procesamiento (desde unos pocos segundos a minutos) para desplazamientos cromatográficos extremos.

La mayoría de las muestras objeto de estudio en metabolómica son muy complejas en composición, y si tienen que examinarse muchas muestras, su comparación a simple vista resulta difícil. Los métodos de análisis estadístico multivariante resultan extremadamente útiles en este sentido, al ser capaces de reducir la dimensionalidad de los datos sin perder información.

El análisis multivariante es prácticamente esencial en el estudio de huellas metabólicas, al permitir visualizar con fines de clasificación la similitud de una muestra dada con otras de diferentes grupos, pero es también útil en todo tipo de estudios donde se lleve a cabo la cuantificación de metabolitos individuales.

Las técnicas de análisis multivariante generalmente empleadas en metabolómica son el análisis de componentes principales (PCA) (figura 4), el análisis discriminante (PLS-DA), el análisis de agrupaciones jerárquico (HCA), el modelado blando independiente de analogía de clases (SIMCA), etc.

ALGUNAS APLICACIONES

Una revisión bibliográfica entre 2000-2005 en cuanto a mención de términos -ómicos *(metabolomics, metabolite/metabolic profiling, metabolic fingerprinting*, etc) en el título, palabras clave y resumen de las revistas internacionales indexadas en la base de datos ISI Web of Science, pone de manifiesto la frecuente utilización de la terminología -ómica para designar trabajos cromatográficos en aplicaciones diversas. Como curiosidad, las revistas relacionadas con el análisis de plantas y alimentos ocupan las primeras posiciones en la mención de los términos metabolite fingerprinting *(Phytochemistry:* 33%) y *metabolite profiling (Journal of Agricultural and Food Chemistry:* 7%), seguidas por aquéllas con un claro interés biológico *(Analytical Biochemistry:* aprox. 2% de las menciones *metabolic/metabolite profiling y metabolomics)*. La mención de estos términos en revistas fundamentalmente cromatográficas es escasa, aunque la identificación de componentes específicos, la determinación de series de compuestos con características comunes y el empleo de la caracterización con fines de clasificación, tareas analíticas básicas en metabolómica, son también los objetivos más comunes en el empleo de las técnicas cromatográficas y electroforéticas. A continuación se indican algunos ejemplos en los que la orientación de dichos trabajos ha conducido a sus autores a incluirlos en el campo de la metabolómica.

Estudio de metabolitos en plantas y alimentos

Las plantas han sido objeto de amplia investigación en metabolómica, ya que el entendimiento de su metabolismo podría conducir a avances económicamente rentables, como la obtención de alimentos de mayor calidad o de variedades vegetales con mayor producción [20] Los productos obtenidos de las plantas pueden, además, utilizarse en áreas tan diversas como la medicina, la industria de fragancias y aromas, la remediación de la biodegradación, etc.

Dado que la respuesta bioquímica de un organismo a una perturbación puede caracterizarse por el efecto de la acumulación diferencial de compuestos individuales [21, 22], el estudio de metabolitos es una excelente herramienta para determinar las consecuencias fenotípicas de modificaciones genéticas y/o ambientales [12, 23]. Robinson y col. evaluaron el potencial de los perfiles metabólicos obtenidos por GC-MS y sometidos a posterior análisis estadístico (PCA), como herramienta para la discriminación de

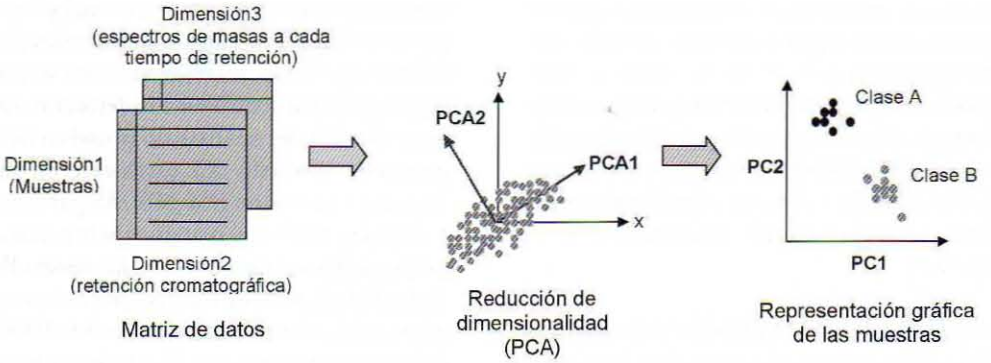


Figura 4. Esquema de aplicación del análisis de componentes principales (PCA) a los resultados (matriz de datos multidimensional) obtenidos en el acoplamiento técnica cromatográfica-espectrometría de masas.

genotipos de álamo con distinto fenotipo: la variedad silvestre *Populus tremula x alba* y dos variedades transgénicas cuya composición en el monómero lignina ha sido genéticamente modificada. Curiosamente, los carbohidratos, que presentan sólo una relación indirecta con la lignina, y no los metabolitos fenólicos, mostraron un mayor poder discriminante en la diferenciación de genotipos. La fiabilidad de estos resultados, verificada por comparación con los datos obtenidos mediante la técnica de referencia (LC), pone de manifiesto la utilidad del estudio de metabolitos volátiles en la selección de variedades genéticas de árboles con propiedades de su madera relevantes para su cultivo con fines de explotación industrial [24]

El estudio de los cambios en el fenotipo asociados a modificaciones de genes conocidos puede ser suficiente objetivo en sí mismo [20, 25, 26], pero también es interesante la posibilidad de predecir la función de genes desconocidos a partir del estudio de las perturbaciones metabólicas causadas por eliminación/modificación de dichos genes. El elevado número de metabolitos presentes en plantas constituye un reto para la determinación de su metaboloma, por lo que tales estudios se han centrado principalmente en organismos modelo sencillos tales como *Arabidopsis thaliana* debido, entre otras características, a su remarcablemente pequeño genoma y al rápido crecimiento de esta planta [27]. En este sentido, merece la pena mencionar el trabajo publicado en 2000 por el grupo del Dr. Oliver Fiehn del Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, uno de los primeros en especificar en detalle la metodología seguida en el estudio de perfiles metabólicos de *Arabidopsis* en genómica funcional [28] El empleo de los perfiles metabólicos de extractos de hojas de *Arabidopsis thaliana* obtenidos por GC-MS, permitió la cuantificación relativa de 326 metabolitos, así como la determinación estructural de la mitad de dichos metabolitos. La comparación en este estudio de cuatro genotipos de *Arabidopsis* mediante técnicas de análisis multivariante, mostró que las diferencias genéticas de cada planta daban lugar a perfiles metabólicos únicos. La investigación con el fin de correlacionar genes con la producción de metabolitos específicos ofrece una interesante perspectiva para la genómica funcional en plantas y es previsible que en un plazo breve este tipo de estudios se extienda a cosechas significativamente más complejas y de mayor interés económico como el maíz, soja, trigo, etc.

Los estudios de metabolitos tienen también su aplicación en el campo de los alimentos procesados. Goodacre y col. abordaron la necesidad del desarrollo de métodos analíticos para la determinación de adulteraciones en aceite. El empleo de la infusión directa por masas (ESI-MS), sin separación cromatográfica previa, junto con la aplicación de técnicas quimiométricas, demostró ser un método rápido, reproducible y adecuado para la elucidación de las diferencias metabólicas entre aceites de distinto origen vegetal [29]. El análisis estadístico de los espectros de masas obtenidos por ESI-MS permitió la discriminación entre aceite de oliva y aceite de avellana, diferenciación esta última que constituye un reto desde el punto de vista analítico dada la similitud entre ambos aceites.

Perfiles y huellas metabólicos: aplicación en toxicología y medicina

Los perfiles y las huellas metabólicos (especialmente de muestras de orina o sangre) pueden utilizarse para detectar los cambios fisiológicos causados como respuesta a una sustancia química, sea ésta una toxina o un fármaco. Accorsi y col. llevaron a cabo la determinación simultánea de sevoflurano, un anestésico de uso frecuente, y de su metabolito hexafluoroisopropanol en orina. Tras la preconcentración mediante extracción por adsorción del espacio de cabeza (HSSE) y posterior desorción térmica, el análisis por vaporización a temperatura programada (PTV)-GC-MS permitió la monitorización de ambos compuestos halogenados en la orina de profesionales relacionados con la cirugía como consecuencia de la exposición ambiental [30]

La aplicación en medicina de las huellas metabólicas se centra principalmente en la búsqueda de biomarcadores para la predicción de enfermedades [31] y la monitorización de su progreso en respuesta a una terapia dada, así como para la detección precoz de enfermedades de nacimiento. Deng y col. desarrollaron un método basado en el fraccionamiento por microextracción con fibra capilar (SPME) y posterior análisis por GC-MS para la búsqueda de marcadores volátiles de cáncer de pulmón en muestras de sangre [32]. La comparación con el grupo control mostró una mayor concentración de hexanal y heptanal en la sangre de enfermos de cáncer. Los niveles de estos biomarcadores en aliento, relacionados con su concentración en sangre, podrían contribuir a la detección de cáncer de pulmón a través del análisis no invasivo del aliento de los pacientes. Rashed y col. establecieron un método automatizado basado en ESI-MS/MS para el diagnóstico de acidemias orgánicas o aminoacidopatías en muestras de sangre de recién nacidos (33). El desarrollo de una eficaz metodología para la preparación por lotes de las muestras permitió la adquisición de entre 500-1000 perfiles metabólicos/día/instrumento. El empleo de un algoritmo computacional para la comparación de diversos parámetros de diagnóstico entre grupos control y con desórdenes

metabólicos conocidos, permitió establecer rangos de referencia y valores de corte para ciertos pares de metabolitos, de utilidad en la discriminación de perfiles anormales de carnitina, acilcarnitinas y aminoácidos.

El estudio de metabolitos en muestras biológicas resulta también de particular interés para las compañías farmaceúticas a la hora de probar la toxicidad de un potencial fármaco: si un compuesto puede descartarse antes de alcanzar los ensayos clínicos en base a su toxicidad, esto ahorraría los enormes costes que suponen este tipo de ensayos [8]. La cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas [34, 35] y, más recientemente el acoplamiento LC-NMR/MS, constituyen las técnicas cromatográficas más empleadas en la actualidad en el desarrollo de nuevos fármacos. El efecto de un potencial fármaco sobre el organismo y sus posibles efectos secundarios se investigan mediante el estudio de los cambios en las huellas metabólicas con el tiempo transcurrido tras la administración de dicho fármaco. La utilización de técnicas de análisis multivariante permite identificar las relaciones masa/carga (m/z) de los metabolitos responsables de la diferenciación entre el grupo control y al que se le ha administrado el fármaco. La identificación de dicho metabolito no es sin embargo esencial, ya que la principal utilidad de este tipo de estudios es la de proporcionar huellas metabólicas de referencia con las que contrastar las correspondientes a nuevos fármacos en desarrollo.

Si bien las muestras de orina, plasma, etc presentan la ventaja de conectar varios sistemas celulares, proporcionando así una respuesta integral de todo el organismo, la variabilidad natural, así como la limitada existencia de bases de datos con los metabolitos comúnmente presentes en dichas muestras y sus propiedades fisicas (e.g. espectros de masas), constituyen las principales dificultades para su análisis. Para una ciencia todavía en desarrollo, el potencial futuro de la metabolómica en estudios médicos viene dado por la extensión de su aplicación más allá de los biofluidos tradicionales, a otros menos estudiados como el sudor, lágrimas, líquido cerebroespinal, etc.

ALGUNOS SITIOS WEB DE INTERÉS PARA LA METABOLÓMICA

www.metabolomicssociety.org (Sociedad de Metabolómica).

www.springeronline.com/sgw/cda/frontpage/0,11855,5-40109-70-34409863-0,00.html (Sitio web de la revista científica Metabolomics, revista oficial de la la Sociedad de Metabolómica).

www.genomicglossaries.com/content/omes.asp (Glosario de términos -ómicos).

www.metabolomics-nrp.org.uk (Norwich Research Park – Metabolomics and plants).

www.metabolomics.bbsrc.ac.uk (Rothamsted: The National Centre for Plant and Microbial Metabolomics).

www.jic.bbsrc.ac.uk (John Innes Centre: research centre in plant and microbial science -Metabolomics).

www.mpimp-golm.mpg.de (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology / Department of Molecular Physiology / Metabolomic Analysis / Oliver Fiehn Group).

www.noble.org (Noble Foundation / Plant Biology / The Sumner group).

www.infometrix.com (Diversos paquetes informáticos para alineamiento de datos cromatográficos y espectroscópicos y análisis multivariante: PCA, SIMCA, etc).

www.expasy.org/MSight/ (Msight: software gratuito diseñado para el alineamiento y visualización de datos en LC-MS).

www.metalign.nl (Software para pretratamiento suavizado, estimación del ruido, corrección de la línea base, alineamiento, etc de datos en GC y LC)

www.umetrics.com (Software para quimiometría)

http://metacyc.org (La base de datos MetaCyc incluye información sobre las rutas metabólicas, sustratos, reacciones, enzimas, etc de más de 150 organismos diferentes).

BIBLIOGRAFÍA

[1] Colquhoun D. Too many 'Omics (2005). *The Scientist* **19**, 8.

[2] www.genomicglossaries.com/content/omes.asp

[3] Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis and biochemical modelling to understand metabolic networks (2001). *Comp Funct Genom* **2**, 155-168.

[4] Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes (2002). *Plant Molec Biol* **48**, 155-171.

[5] http://gepasi.dbs.aber.ac.uk/dbk/metabol.htm (Douglas Kell, Metabolomics in Aberystwyth, University of Wales, Aberystwyth, UK)

[6] http://www.aber.ac.uk/~mpgwww/Metabol/Metabol.html (Parasitology Group, University of Wales, Aberystwyth, UK)

[7] http://plantsci.arabidopsis.info/pg/barratt.pdf (Dave Barrett, Centre for Analytical Bioscience, School of Pharmacy, University of Nottingham, UK)

[8] Griffin JL. The potential of metabonomics in drug safety and toxicology (2004). *Drug Discovery Today* **1**, 285-293.

[9] G Keun HC, Beckonert O, Griffin JL, Richter C, Moskau D, Lindon JC, Nicholson JK. Cryogenic probe 13C NMR spectroscopy of urine for metabonomic studies (2002). *Anal Chem* **74**, 4588-4593.

[10] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data (1999). *Xenobiotica* **29**, 1181-1189.

[11] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function (2002). *Nature Reviews: Drug Discovery* **1**, 153-161.

[12] Felton MJ. GC and systems biology (2004). *Today's chemist at work* **June**, 26-29.

[13] Beecher C. Metabolomics: a new "omics" technology (2002). *American Genomics / Proteomics Technology* **May/June** (feature article).

[14] Marshall AG, Hendrickson CL. Fourier transform ion cyclotron resonance detection: principles and experimental configurations (2002). *Int J Mass Spectrom* **215**, 59-75.

[15] Aharoni A, Ric de Vos CH, Verhoeven HA, Maliepaard CA, Kruppa G, Bino R, Goodenowe DB. Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry (2002). *OMICS* **6**, 217-234.

[16] Goodacre R, Vaidyanathan S, Bianchi G, Kell DB. Metabolic profiling using direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry for the characterisation of olive oils (2002). *Analyst* **127**, 1457-1462.

[17] Choi BK, Hercules DM, Zhang T, Gusev AI. Comparison of quadrupole, time-of-flight and Fourier transform mass analyzers for LC-MS applications (2001). *LC·GC* **19**, 514-520.

[18] Nielsen NP, Carstensen JM, Smedsgaard J. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping (1998). *J Chromatogr A* **805**, 17-35.

[19] Pravdova V, Walczak B, Massart DL. A comparison of two algorithms for warping of analytical signals (2002). *Anal Chim Acta* **456**, 77-92.

[20] Roessner U, Luedemann A, Brust D, Fiehn O, Linke T, Willmitzer L, Fernie AR. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems (2001). *Plant Cell* **13**, 11-29.

[21] Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh M, Berden JA, Brindle KM, Kell DB, Rowland JJ, Westerhoff HV, van Dam K, Oliver SG. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations (2001). *Nat Biotechnol* **19**, 45-50.

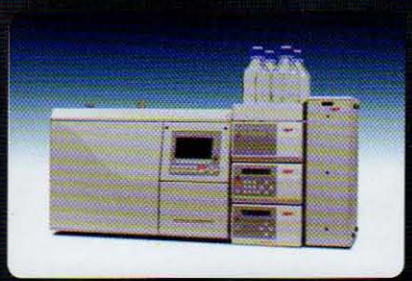
[22] Benning C, Stitt M. Physiology and metabolism reacting to the full complexity of metabolic pathways in a post-genomic era (2004). *Curr Opin Plant Biol* **7**, 231-234.

[23] Sauer U. High-throughput phenomics: experimental methods for mapping fluxomes (2004). *Curr Opin Biotech* **15**, 58-63.

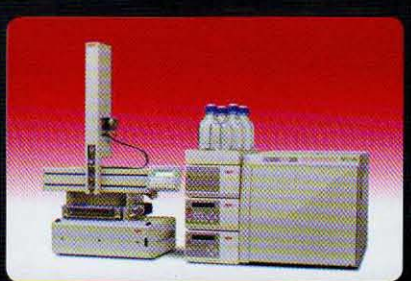
HPLC+HRGC/MS
KONIK K2 Q12®

El universo de las moléculas... el mundo de KONIK
más de 25 años de INNOVACIÓN

KONIK MSQ12® GC-MS
4-1500 amu
Cambio rápido de fuentes



KONIK K2® HPLC+GC
Multidimensional
Patentado



KONIK LC/MS
Flexibilidad total

KONIK GC+ROBOKROM®
AS, HS, P&T, SPμE, THD
Multimodal

la nueva dimensión en análisis molecular

KONIK - TECH®
KROM+MASS
www.konik-group.com

BARCELONA
Av. Cerdanyola, 73, 08172 Sant Cugat, Barcelona
T (+34) 93.590.28.40 F (+34) 93.590.28.44
e-mail: ventas@konik-group.com

MADRID
Corregidor José de Pasamonte, 31, L1, 28030 Madrid
Tel. (+34) 91.328.25.26 Fax (+34) 91.328.36.54
e-mail: madrid@konik-group.com

MIAMI
6065 NW, 167th St., Suite B-20, Miami, Florida 33015
Tel. (+1) 305.557.22.12 Fax (+1) 305.556.47.21
e-mail: miami@konik-group.com

Agentes y distribuidores en 70 países

LINEA COMPLETA

KONIK 2006

Descubra las ventajas de todos los acoplamientos

www.konik-group.com

KONIK MS Q12®

4-2000 amu
Cambio rápido de fuentes

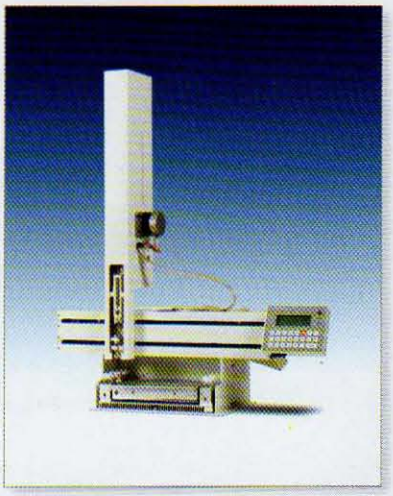
Máxima sensibilidad y resolución

El sistema combinado HRGC/HPLC+MS incorpora opcionalmente:
Fuente para acoplamiento HRGC: permite ionización por impacto electrónico e ionización química; iones positivos y negativos.
En el modo IQ (-) es el sistema más sensible del mercado.
Fuente para acoplamiento HPLC: optimizada para ionización a presión atmosférica (API) y electrospray (ESI).
Permite fácil análisis de péptidos y compuestos de alto peso molecular.

KONIK ROBOKROM®

AS, HS, P&T, SPμE. Multimodal

Flexibilidad inigualada



Sistema totalmente innovador exclusivo de KONIK. Puede configurarse a voluntad para siete modos operativos: (1) P&T: Purga y Trampa, (2) Espacio de Cabeza Estático, (3) μ-Extracción en Fase Sólida, (4) Desorción Térmica, (5) Inyección de Líquidos HRGC, (6) Inyección de Líquidos HPLC, (7) Micro-concentrador.
Opciones: Microagitación, evaporación controlada, microdosificación, microreacción. Estación de microquímica completa (derivatización precolumna, concentración, spiking,...).
Soluciones combinadas con HRGC únicas: TOGA, BTX, EPA,...

KONIK HRGC 4000

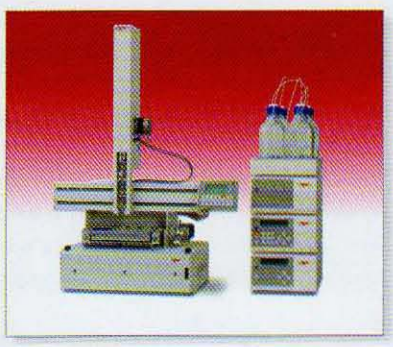
Horno ±0.1°C / Inyector Estanco / Neumática Digital

Máxima productividad

Cromatografía ultra-rápida: Horno de alta precisión y muy baja inercia térmica. Neumática digital (EPC y EMC). Temperatura de 25°C a 490°C en incrementos y visualización de 0.1°C.
Inyector estanco con septum frío (sin purga de septum): garantiza la máxima integridad de la muestra para compuestos de alto y bajo peso molecular. Ahorro de gas.
Todas las opciones de inyección disponibles para cualquier tipo de columna.
Gama completa de detectores, inclusive masas.

KONIK HPLC 550

6 Disolventes
Programación Temperatura



KONIK HPLC 550 TORRE y HPLC 600 MONOBLOQUE

Línea completa en HPLC: Isocrático, Gradientes, Biocompatible, Semi-preparativo, Iónico, etc. Detectores Fluorescencia, PDA, UV-VIS, Índice de Refracción, Conductividad, Electroquímico, Masas, EVLSD, etc. La solución óptima para su laboratorio con la mejor relación calidad/precio.

KONIK HPLC+HRGC K2 MULTIDIMENSIONAL

Único sistema comercializado HPLC+HRGC MULTIDIMENSIONAL (patentado US,6,402,947 B1).
Análisis de Pesticidas, PAH's, PCB's, ... por inyección directa de la muestra (aceites, concentrados, etc) en el HPLC.

Automatización total

SYSTEM CERTIFICATION ISO 9001:2000 SGS

[24] Robinson AR, Gheneim R, Kozak RA, Ellis DD, Mansfield SD. The potential of metabolite profiling as a selection tool for genotype discrimination in Populus (2005). *J Experim Botany* **56**, 2807-2819.

[25] Jonsson P, Gullberg J, Nordström A, Kusano M, Kowalczyk M, Sjöström M, Moritz T. A strategy for identifying differences in large series of metabolomic samples analyzed by GC/MS (2004). *Anal Chem* **76**, 1738-1745.

[26] Tolstikov VV, Fiehn O. Analysis of highly polar compounds of plant origin: combination of hydrophilic interaction chromatography and electrospray ion trap mass spectrometry (2002). *Anal Biochem* **301**, 298-307.

[27] Rohloff J, Bones AM. Volatile profiling of Arabidopsis thaliana – putative olfactory compounds in plant communication (2005). *Phytochemistry* **66**, 1941-1955.

[28] Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics (2000). *Nat Biotechnol* **18**, 1157-1161.

[29] Goodacre R, Vaidyanathan S, Bianchi G, Kell DB. Metabolic profiling using direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry for the characterisation of olive oils (2002). *Analyst* **127**, 1457-1462.

[30] Accorsi A, Morrone B, Benzo M, Gandini C, Raffi GB, Violante FS. Simultaneous determination of unmodified sevoflurane and of its metabolite hexafluoroisopropanol in urine by headspace sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry (2005). *J Chromatogr A* **1071**, 131-134.

[31] Yang J, Xu G, Hong Q, Liebich HM, Lutz K, Schmülling RM, Wahl HG. Discrimination of type 2 diabetic patients from healthy controls by using metabonomics method based on their serum fatty acid profiles by GC (2004). *J Chromatogr B* **813**, 53-58.

[32] Deng C, Zhang X, Li N. Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography – mass spectrometry (2004). *J Chromatogr B* **808**, 269-277.

[33] Rashed MS, Bucknall MP, Little D, Awad A, Jabob M, Alamoudi M, Alwattar M, Ozand PT. Screening blood spots for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry with a microplate batch process and a computer algorithm for automated flagging of abnormal profiles (1997). *Clin Chem* **43**, 1129-1141.

[34] Plumb RS, Stumpf CL, Gorenstein MV, Castro-Perez J, Dear GJ, Anthony M, Sweatman BC, Connor SC, Haselden JN. Metabonomics: the use of electrospray mass spectrometry coupled to reversed-phase liquid chromatography shows potential for the screening of rat urine in drug development (2002). *Rapid Commun Mass Spectrom* **16**, 1991-1996.

[35] Plumb RS, Stumpf CL, Granger JH, Castro-Perez J, Haselden JN, Dear GJ. Use of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and multivariate statistical analysis shows promise for the detection of drug metabolites in biological fluids (2003). *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**, 2632-2638.

* * *

Desarrollo de métodos analíticos avanzados para el estudio de organismos modificados genéticamente. Combinación de técnicas de PCR y técnicas electroforéticas capilares

Laura Sánchez[1], Antonio Crego[2], Ramón González[1], Alejandro Cifuentes[1]
[1] Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid
acifuentes@ifi.csic.es
[2] Dep. Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Alcalá de Henares, Crtra. Madrid-Barcelona km 33.600, 28071 Alcalá de Henares, Madrid

1. INTRODUCCIÓN

La superficie mundial cultivada con variedades modificadas genéticamente ha aumentado considerablemente durante los últimos años, pasando de 1,7 millones de hectáreas en 1996 a 81 millones de hectáreas en el 2004. Esta evolución ha sido consecuencia del gran desarrollo tecnológico del sector agroalimentario y, en particular, de la biotecnología vegetal que ha permitido, mediante técnicas de manipulación genética, introducir un fragmento de DNA *(inserto)* dentro del genoma de una planta. Los organismos modificados de esta forma se denominan "transgénicos" o "modificados genéticamente" (GMOs del término anglosajón "Genetically Modified Organism"), y los alimentos que los contienen se conocen también como alimentos transgénicos. En la actualidad, la mayor parte de las variedades transgénicas han sido diseñadas para mejorar la resistencia a plagas o la tolerancia a algunos herbicidas, lo cual puede conducir a la reducción del uso de pesticidas, mejorando adicionalmente las cualidades nutricionales del producto y el rendimiento de la producción agraria. En definitiva, los GMOs pueden ofrecer beneficios tanto para la agricultura, como para la calidad de los alimentos, la nutrición y la salud [1]

Ahora bien, toda nueva tecnología lleva asociada riesgos potenciales y, la tecnología de modificación genética no es ajena a este principio. Los riesgos que se mencionan con más frecuencia son: la transferencia de secuencias transgénicas a cultivos no transgénicos o a plantas silvestres; los efectos indirectos sobre especies no diana (por ejemplo insectos beneficiosos); o efectos potencialmente negativos sobre la salud de los consumidores (por ejemplo reacciones alérgicas).

Estos riesgos han creado desconfianza tanto en los consumidores como en las organizaciones ecologistas. Como consecuencia de ello, la mayor parte de los gobiernos han optado por elaborar normativas que permitan controlar la inocuidad de estos nuevos productos, su desarrollo, su dispersión, o su comercialización. Así, los alimentos o ingredientes alimentarios que contengan o consistan en GMOs, o bien, que estén producidos a partir de éstos, están regulados por el Reglamento 258/97 de la UE relativo a nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. Este reglamento, además de establecer medidas de evaluación de la seguridad de estos productos, también determina las condiciones para su etiquetado. La normativa europea sobre trazabilidad y etiquetado se completa posteriormente con los reglamentos 1139/98, 49/2000 y 1830/2003. Por otra parte, el Reglamento Europeo 50/2000 establece la obligatoriedad del etiquetado de aromas y aditivos alimentarios obtenidos a partir de GMOs [2]

La normativa de la UE (Directiva 2001/18/CE), define como GMOs a aquellos organismos cuyo material genético haya sido modificado de una manera no natural (p.e., que no se produce naturalmente durante el apareamiento ni en la recombinación natural), y en concreto mediante técnicas de DNA recombinante, ocasionando la incorporación directa de material hereditario a un organismo, y fusión celular o hibridación mediante métodos no naturales. La controversia sobre el uso de los GMOs ha sido mayor en Europa que en otros países, donde esta tecnología es más aceptada. Así, el valor umbral de etiquetado en Europa está fijado en un 0,9% según el reglamento 1830/2003, en un 3% en Corea y un 5% en Japón. Estos límites se establecen considerando que puede ser técnicamente imposible evitar contaminaciones accidentales. En Estados Unidos y Canadá el etiquetado no es obligatorio.

El ámbito reglado exige el desarrollo de métodos de análisis validados para la detección y cuantificación de

GMOs en alimentos. La presencia de GMOs en un alimento se puede demostrar mediante métodos basados en el análisis de proteínas o de ácidos nucleicos. Ahora bien, la relativa estabilidad térmica del DNA, unido al hecho de estar presente en casi todos los tejidos biológicos, hace de éste un analito más adecuado para el control de la presencia de transgénicos. En este campo, la detección de secuencias de DNA específicas mediante su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido primordial, mejorando en un alto grado la sensibilidad de los métodos analíticos basados en la detección de DNA. Por otra parte, entre las diferentes técnicas analíticas que de forma general pueden ser empleadas para analizar alimentos, el uso de la Electroforesis Capilar (CE) ha surgido como una buena alternativa por su capacidad de proporcionar separaciones rápidas y eficientes de los fragmentos de DNA amplificados por técnicas de PCR[3,4]. A continuación se describen de forma general los procedimientos que se han desarrollado para el análisis de GMOs empleando técnicas de PCR.

2. ANÁLISIS DE GMOs POR TÉCNICAS DE PCR

Los procedimientos de análisis de DNA mediante PCR permiten la amplificación exponencial de fragmentos específicos de DNA a partir de mezclas complejas. De esta manera es posible revelar la presencia de secuencias concretas que previamente a la amplificación no eran detectables o eran indistinguibles del resto de los ácidos nucleicos presentes en la muestra. El proceso analítico completo consta de cuatro etapas: muestreo, purificación de DNA, amplificación de secuencias específicas, y detección de los productos de amplificación.

La estrategia del **muestreo** es uno de los pasos críticos en el análisis del contenido de GMOs en alimentos [5] El objetivo del muestreo es poder alcanzar conclusiones válidas sobre un lote a partir del análisis de una pequeña cantidad representativa del mismo. Por ejemplo, el diseño de programas de muestreo con herramientas estadísticas apropiadas es especialmente importante para el análisis de materiales crudos que presenten un alto grado de heterogeneidad.

Otra etapa crucial de los procedimientos analíticos basados en PCR es la **extracción y purificación** del DNA, ya que la detección depende de la calidad e integridad del DNA extraído [5] Varios son los factores que pueden afectar a la integridad del DNA durante el procesado industrial del alimento o durante el propio proceso de extracción (p.ej., variaciones de pH y temperatura, actividades nucleasa, etc.) reduciendo el tamaño medio de los fragmentos de DNA [6]. Por otro lado, contaminantes de la matriz alimenticia o de las sustancias químicas empleadas en la extracción del DNA pueden inhibir las reacciones de PCR. Todos estos factores dependen de la muestra, del procesado específico del alimento, y del método de extracción utilizado.

Hasta el momento se han publicado diversos protocolos de extracción de DNA para el análisis de GMOs, pudiéndose realizar bien mediante kits de purificación comerciales [7-9] incluyendo el método Wizard [6, 9-16] o mediante métodos validados tales como el de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) [9, 11, 14, 16-20], SDS/proteinasa K [9], o el método de acetato potásico [21], entre otros. Dada la gran variedad de matrices alimentarias y de tipos y grados de procesamiento de los alimentos, suele ser necesario llevar a cabo un proceso de selección y optimización del procedimiento de extracción específico para cada tipo de muestra, no siendo posible establecer un procedimiento rutinario universal [8]

En el trabajo de Zimmermann y col. [9] se muestra una comparación entre nueve métodos de extracción de DNA. En este trabajo [9] se concluye que el empleo de CTAB, así como la utilización de una resina (método de Wizard y *kits* de purificación como "DNeasy" y "Nucleon Phytopure") conduce a un índice de recuperación menor del 20%. En el caso del método Wizard, el DNA extraído representaba el 90% aproximadamente de la capacidad total para extraer DNA de la minicolumna, mientras que para el *kit* de purificación "DNeasy", el DNA extraído representaba el 20% de su capacidad total. Asimismo, la baja recuperación de los protocolos que utilizan CTAB y el *kit* de purificación "Nucleon Phytopure" se justificó con la pérdida de DNA durante la extracción con cloroformo o por la baja eficacia de la precipitación específica realizada. En otro estudio comparativo, Peano y col. [6] evaluaron el efecto de cuatro *kits* de purificación para extracciones de DNA en diferentes alimentos. Aunque se utilizaron las mismas parejas de cebadores (*primers*) en las diferentes muestras y con el mismo *kit*, los resultados tras la electroforesis en placa permitieron distinguir las diferentes bandas correspondientes al DNA genómico, gracias a que los tamaños amplificados diferían considerablemente entre sí. Algunos de los alimentos estudiados fueron: granos de maíz, harina de maíz estándar, harina de soja estándar, galletas de maíz, tacos, etc. Recientemente, Margarit y col. [18] describieron que el DNA aislado mediante el método CTAB aplicado a muestras de maíz y otras matrices "poco procesadas", tenía buena calidad. Sin embargo, la extracción a partir de productos muy

procesados (tales como *corn flakes*, maíz inflado y croquetas para animales monogástricos como pollos, perros y gatos) rindió DNA de peor calidad en cuanto a la presencia de inhibidores y el rendimiento de la extracción.

La etapa más característica de los procedimientos analíticos basados en PCR es la **amplificación**. Ésta se produce mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y es posible gracias a las propiedades del DNA y sus polimerasas. En primer lugar, la complementariedad de las cuatro bases nitrogenadas en los desoxirribonucleótidos es responsable de la fidelidad del proceso de replicación que se obtiene por PCR. Así, dos moléculas de DNA de doble cadena pueden ser obtenidas de forma que la segunda sea completamente idéntica a la original (con un bajo índice de errores) [5]. Asimismo, esta complementariedad es responsable de la especificidad de la interacción entre las moléculas de simple cadena que, bajo condiciones apropiadas, sólo hibridarán para dar lugar a una molécula de doble cadena si las secuencias son totalmente complementarias. Finalmente, las polimerasas son capaces de catalizar la reacción de replicación en una sola dirección (generando una cadena complementaria a una molécula de cadena simple), pero siempre desde un fragmento de doble cadena ya existente. Este fragmento de doble cadena está normalmente constituido por un oligonucleótido (cebador o *primer*) hibridado sobre una molécula molde de una cadena simple.

La reacción de amplificación por PCR consta de entre 20 y 40 repeticiones (ciclos) de tres pasos consecutivos a diferentes temperaturas (ver **Figura 1**). La separación de las cadenas de la doble hebra del DNA molde (desnaturalización) se lleva normalmente a cabo a 94-95ºC. El apareamiento del primer con su secuencia complementaria (hibridación) suele tener lugar a temperaturas de 50-60ºC. Y la síntesis de una cadena complementaria a la original (extensión) a la temperatura óptima de la polimerasa que se utilice, normalmente 72ºC. La sensibilidad de la amplificación se debe al hecho de que la nueva secuencia sintetizada puede ser usada como molde en el siguiente ciclo, de forma que en condiciones ideales, se espera un incremento exponencial en la cantidad de dicha secuencia [5]. Hoy en día, la disponibilidad de termocicladores, donde tiene lugar la reacción de amplificación de PCR; y de polimerasas termoestable, capaces de soportar más de 40 ciclos como el descrito anteriormente conservando gran parte de la actividad inicial; ha hecho posible automatizar el proceso entero y, como resultado, popularizar esta tecnología en la investigación de alimentos [3]

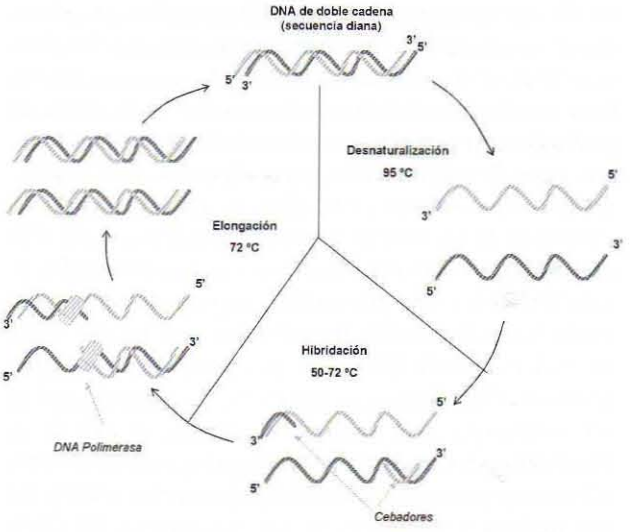


Figura 1. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa. Redibujado de la referencia [22]

La especificidad de la amplificación se consigue mediante un diseño adecuado de los primers. En la **Figura 2** se muestra un esquema del DNA exógeno (transgén o inserto) que se ha integrado en el genoma de una planta transgénica, y sirve para ilustrar las diferentes estrategias utilizadas para diseñar los primers utilizados en la detección de OMGs. El promotor sirve para dar la señal de comienzo a la RNA polimerasa y determina cuál de las dos cadenas de DNA será copiada, mientras que el terminador indica el punto final de la transcripción [1] Hasta el momento, muchas de las plantas modificadas genéticamente que se explotan comercialmente han sido con construcciones que contienen el promotor de la subunidad 35S del RNA ribosómico del virus mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador del gen nopalina sintasa (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens*.

Los *primers* deben ser elegidos en cadenas complementarias, de forma que la secuencia de DNA a amplificar (secuencia diana) esté en el camino de la polimerasa que inicia el DNA desde el otro primer [5]. En la **Figura 2** se muestran también las cinco estrategias que se pueden utilizar para desarrollar diferentes procedimientos de identificación de GMOs basados en la amplificación por PCR, según el grado de especificidad que se quiera alcanzar en el análisis de los mismos. Todas estas estrategias requieren el conocimiento previo de la secuencia transgénica, y en algunos casos del punto de inserción en el genoma de la planta receptora. El método de screening, se basa en la detección de secuencias de promotores o terminadores. Estos métodos son los que tienen más riesgo de falsos positivos, por contaminación con los microorga-

nismos de los que derivan las secuencias que se detectan (virus CaMV o bacteria *Agrobacterium tumefaciens*); y falsos negativos cuando, a pesar de ser transgénica, la variedad concreta presente en la muestra no contiene estas secuencias. E. Gachet y col. [10] utilizaron un método para la detección del promotor de la subunidad 35S del RNA ribosómico del virus mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador del gen nopalina sintasa (NOS) de "*Agrobacterium tumefaciens*" (P35S y TNOS).

Por su parte, los métodos de identificación de la secuencia codificante del transgén y los de identificación de la construcción son más selectivos pero también pueden dar lugar a falsos positivos cuando los mismos genes o construcciones son usados en otros GMOs. S.B. Ronning y col. [23] describen métodos basados en la detección del gen que codifica el enzima 3'Enolpiruvil-Silkimato-5-Fosfato-Sintasa (EPSPS) y que proporciona resistencia a herbicidas, o en la del gen sintético *cryIA(b)* que codifica la endotoxina Bt de *B.thuringiensis* utilizado en variedades de maíz transgénico resistente al taladro.

Finalmente, los métodos de identificación del evento, sí permiten resolver estos problemas de especificidad. Con este método se obtiene una única señal positiva en el material modificado genéticamente, siendo posible identificar el origen de esta modificación del DNA. E. Margarit y col. [18] describen *primers* para la detección específica de evento de maíz MON810, o Bt176. Otros métodos específicos de evento se han descrito para soja Roundup Ready [17, 24-27], maíz MON810 [28-31], maíz MON863 [7], maíz Bt11 [23, 32, 33] y maíz NK603 [30, 34]

Además de las secuencias transgénicas mencionadas más arriba, la validez de los resultados obtenidos debe confirmarse mediante la amplificación de secuencias comunes

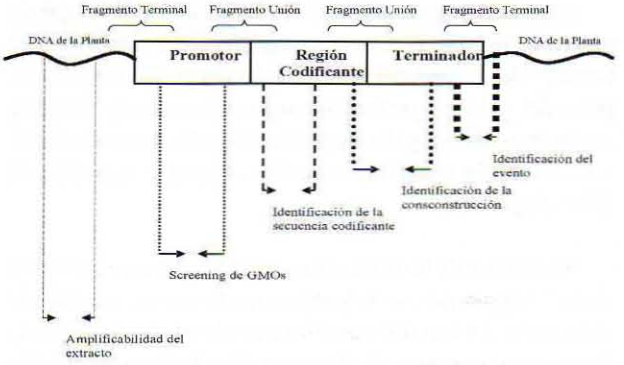


Figura 2. Esquema de una inserción en el genoma de una planta transgénica y las estrategias basadas en PCR para la detección de GMOs. Redibujado de la referencia [22]

a todas las variedades (transgénica y no transgénica) de la especie que se detecta. Esto evita por ejemplo falsos negativos debidos a la baja calidad o cantidad del DNA extraído. La última etapa del procedimiento de análisis por PCR consiste en la **detección** de los productos de amplificación, que puede llevarse a cabo mediante diferentes métodos que se discuten en los apartados siguientes.

2.1. El Método Clásico (PCR y Electroforesis en Gel de Agarosa)

Según se ha descrito, la etapa final en la mayoría de los análisis basados en PCR (excepto para PCR en tiempo real, técnica que será tratada más adelante) es la separación y detección de los fragmentos de DNA amplificados. Para ello, la estrategia clásica y más habitual en los laboratorios de biología molecular es combinar la técnica de PCR con la AGE en placa. En la **Tabla 1** se muestran algunos de los principales trabajos realizados mediante procedimientos de PCR junto con AGE aplicados a GMOs.

Tabla 1. GMOs analizados mediante la técnica de PCR y AGE.

GMOs	Ref
Maíz transgénico MON810, Bt176, Bt11, GA21, T25, MON863 y TC1507	[7]
Maíz transgénico MON810, Bt176, Bt11, GA21 y Soja Roundup Ready	[13]
Maíz transgénico MON810, Bt176, Bt11, T25 y Soja Roundup Ready	[14,15]
Maíz transgénico MON810 y Bt176	[18]
Soja Roundup Ready	[11, 12, 16, 17, 25]
Maíz transgénico MON810 y NK603	[30]
Maíz transgénico Bt176 y Soja Roundup Ready	[8, 19, 20, 35, 36]

La migración de los fragmentos de DNA en un **gel de agarosa** sometido a un campo eléctrico depende del tamaño del DNA, del voltaje aplicado y del tamaño de poro del gel de agarosa. La separación puede llevarse también a cabo en geles de poliacrilamida, que es la técnica de elección cuando se trata de resolver fragmentos de DNA pequeños.

Transcurrida la electroforesis, la localización relativa de los fragmentos se determina mediante un método de detección. La tinción con bromuro de etidio, una sonda fluorescente, es un método generalizado de detección de fragmentos de DNA, ya que la sonda se intercala entre la doble hélice de DNA aumentando el rendimiento cuántico de fluorescencia. Este método presenta como principales ventajas su sencillez y bajo coste. Sin embargo, su baja sensibilidad y resolución, junto con las dificultades para obtener buenos resultados cuantitativos, así como para su automatización, han forzado al desarrollo de otras alternativas para la detección. El uso de cámaras CCD (del inglés *charge-coupled device*) en lugar de fotografía tradicional, o de marcadores isotópicos de los productos de PCR seguidos de un programa informático que analiza las imágenes, son dos ejemplos de métodos de detección alternativos [5]

Las **Figuras 3 y 4** muestran un ejemplo de aplicación de la técnica de PCR combinada con AGE para el análisis de DNA en alimentos transgénicos (Soja Roundup Ready y Maíz Bt176) [8] El tamaño del amplicón es en ambos casos de 162 pares de bases. Como se puede ver en estas figuras este procedimiento PCR-AGE no permite llevar a cabo análisis cuantitativos de forma adecuada (por ejemplo las señales obtenidas para un 2% y un 0.1% de GMO, correspondiendo a las calles 1 y 3, son indistinguibles).

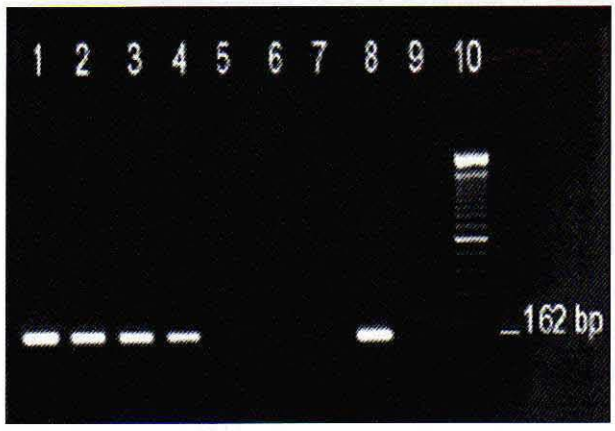


Figura 3. Soja Roundup Ready, 35SP-PCR. Línea 1, 2% GMO; línea 2, 0.5% GMO; línea 3, 0.1% GMO; línea 4, 0.01% GMO; línea 5, 0.001% GMO; línea 6, 0% GMO; línea 7, control negativo de soja; línea 8, control positivo de soja; línea 9, blanco; línea 10, patrón de 100 pb. Redibujado de la referencia [8]

Figura 4. Maíz Bt176, 35SP-PCR. Línea 1, 2% GMO; línea 2, 0.5% GMO; línea 3, 0.1% GMO; línea 4, 0.01% GMO; línea 5, 0.001% GMO; línea 6, 0% GMO; línea 7, control negativo de maíz; línea 8, control positivo de maíz; línea 9, blanco; línea 10, patrón de 100 pb. Redibujado de la referencia [8]

La dificultad para obtener resultados cuantitativos fiables mediante PCR-AGE se debe a varios factores. Por un lado, el uso de PCR en la que la eficiencia de amplificación nunca es del 100%. Así, la ecuación teórica que describe la relación entre el número de copias inicial (No) y final (N) de una secuencia diana en una PCR: $N = No \cdot (2)^n$, se convierte en realidad en $N = No \cdot (1+E)^n$, donde "n" es el número de ciclos de amplificación y "E" la eficiencia real del proceso de amplificación. El valor E depende de la composición de la muestra, la secuencia diana y las de los cebadores (*primers*), y el número de ciclos. En concreto, el efecto del número de ciclos es especialmente relevante, siendo el responsable de que las reacciones de PCR alcancen una fase en la que no existe un aumento significativo de la cantidad de producto con cada nuevo ciclo (fase de "*plateau*"). Esto es consecuencia de la inactivación progresiva de la polimerasa, el consumo de los reactivos y la competición creciente, en la fase de hibridación, de las moléculas de DNA recién sintetizadas con los cebadores. La consecuencia de todo ello es que no se puede establecer una relación directa entre el número de copias de la secuencia diana en la muestra y la cantidad de producto de amplificación obtenido. Por otro lado los resultados proporcionados por AGE son en el mejor de los casos sólo semi-cuantitativos independientemente del método de detección empleado. Un inconveniente adicional de los métodos PCR-AGE es la necesidad de realizar dos pasos (amplificación por PCR y Electroforesis en geles de agarosa) para llevar a cabo el análisis, lo que implica largos tiempos de análisis y va en detrimento de la exactitud y precisión de los resultados.

2.2. Alternativas al Método Clásico

Para solventar las limitaciones del método clásico se han desarrollado métodos cuantitativos que permiten paliar esta y otras deficiencias como la escasa reproducibilidad interlaboratorios de los métodos de PCR, destacando entre ellos la PCR en tiempo real (RT-PCR) y la PCR competitiva cuantitativa (QC-PCR).

2.2.1. PCR con detección en tiempo real (RT-PCR)

La PCR con detección en tiempo real (RT-PCR) es actualmente la herramienta cuantitativa más fiable para la determinación del contenido de GMOs en alimentos; esta técnica ha revolucionado la cuantificación del DNA y RNA al permitir controlar el progreso de la PCR en sus distintos ciclos [6]

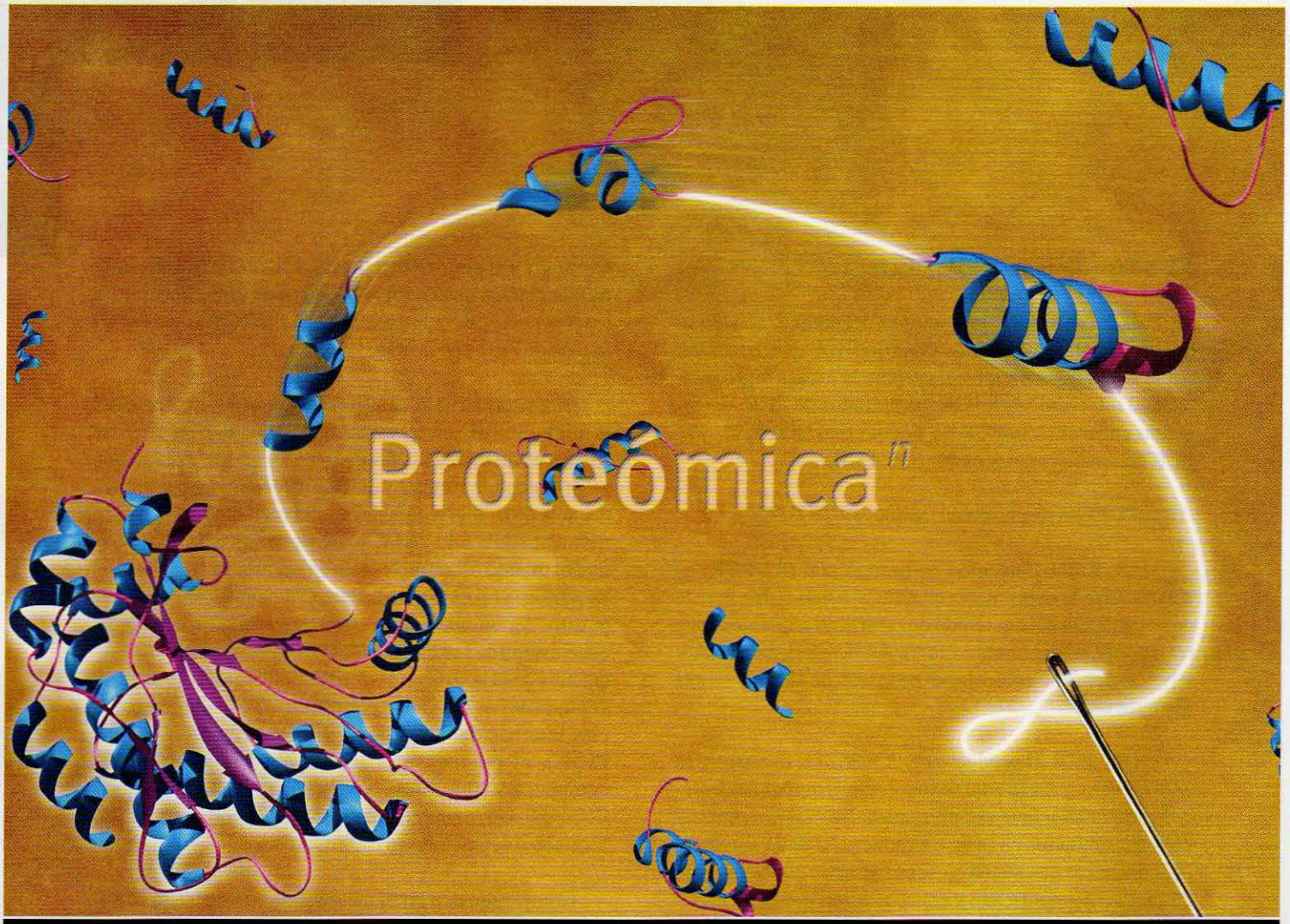
En RT-PCR el producto de la reacción se cuantifica ciclo a ciclo, para lo cual se requieren sistemas de detección suficientemente sensibles para detectar la acumulación de productos en la fase exponencial de la reacción, cuando existe una buena correlación entre concentración de producto amplificado y concentración inicial de moléculas diana. El parámetro que se emplea para la cuantificación es el ciclo umbral (Ct), definido como el número de ciclos necesarios para generar una señal estadísticamente significativa por encima de la señal de ruido. Con esta técnica, la cuantificación se basa en el hecho de que cuanto mayor sea la concentración inicial de secuencia diana, antes se alcanzará el Ct. Los valores de Ct obtenidos con cantidades conocidas de la secuencia diana se usan para establecer una recta de calibrado (Ct frente al logaritmo del número de copias iniciales), la cual permite calcular la concentración inicial de secuencia diana en la muestra problema por interpolación en la misma.

En su protocolo más sencillo, las reacciones de RT-PCR utilizan agentes intercalantes fluorescentes que funcionan como se ha descrito más arriba para el bromuro de etidio. Inicialmente se utilizó precisamente el bromuro de etidio como agente intercalante, y posteriormente YOPRO-1 y SYBR Green I, siendo este último el más utilizado actualmente para esta aplicación. Este fluoróforo se une con gran afinidad al DNA aumentando su fluorescencia unas 1000 veces. La detección con SYBR-Green I es muy sensible y produce resultados muy precisos en la cuantificación del producto. Este formato de detección necesita una puesta a punto previa para que la PCR no amplifique productos inespecíficos que también contribuyen al incremento en la fluorescencia, introduciendo errores en el posterior análisis de los resultados. De hecho el problema de estos protocolos basados en el empleo de intercalantes es la dificultad de diferenciar los productos específicos de amplificación de los inespecíficos, aumentando por ello el riesgo de asignación de falsos positivos.

Una alternativa al empleo de agentes intercalantes es la utilización de sondas específicas de secuencia [37]. Estas sondas están marcadas fluorescentemente de manera que se produce un aumento de fluorescencia como consecuencia de la interacción de la sonda con el DNA en algún momento del ciclo de PCR. La situación más común es que el mismo oligonucleótido (*primer*) sea portador del fluoróforo utilizado para la detección junto con otro compuesto (denominado *quencher*) que apantalla la fluorescencia emitida por el fluoróforo. Así, ya sea como consecuencia de la actividad 5'-3' exonucleasa de la polimerasa (sondas TAQMAN), o por la hibridación entre secuencias internas del amplicón y la sonda (sondas SCORPION), al producirse la separación física de los dos compuestos (fluoróforo y *quencher*) se incrementa la fluorescencia, permitiendo la cuantificación del producto formado o acumulado en cada ciclo [2]

Comparado con otros métodos de cuantificación, RT-PCR ofrece: un riesgo mínimo de contaminación ya que la amplificación y detección se realizan en el mismo tubo, un rango dinámico linear amplio, una alta capacidad de procesamiento, y tiempos de análisis cortos, resultados reproducibles y buena especificidad y sensibilidad. Ahora bien, debido a la alta sensibilidad de la técnica, es importante asegurar que el DNA está puro y libre de inhibidores de PCR [6]

Los ensayos de RT-PCR aplicados al análisis de GMOs en alimentos utilizan como control interno una secuencia específica de la especie vegetal. De este modo se obtiene la concentración de GMO normalizada en función de la concentración de DNA amplificable de la especie vegetal en la muestra, que suele expresarse como porcentaje de GMO en peso [2] Los resultados son más fiables si la amplificación simultánea de la secuencia diana y del control interno se lleva a cabo en la misma reacción, lo que implica el diseño de sondas con fluoróforos distintos. Peano y col. [6] cuantificaron mediante RT-PCR el DNA de Soja Roundup Ready y maíz MON810 con un contenido del 0, 0.1, 0.5, 1, 2 y 5 % de material transgénico. Para ello se utilizó una sonda complementaria al promotor CaMV 35S presente en las dos construcciones transgénicas consideradas. Los valores absolutos de la cuantificación de secuencias específicas de GMO y de los genes endógenos de la planta se correlacionaron para obtener una cuantificación relativa al contenido transgénico.



Cónsiguelo todo: Prestaciones superiores para Proteómica.

El nuevo espectrómetro de masas híbrido LTQ Orbitrap™ de Thermo te da la flexibilidad y el poder de detección de hasta las más sutiles diferencias en secuencias de péptidos y modificaciones post-transducionales (PTMs).

El LTQ Orbitrap ofrece la seguridad de la masa exacta con la funcionalidad MS^n que le permite alcanzar fácilmente exactitud de masa mejor de 2 ppm. Además, el Orbitrap ofrece excelente rango dinámico y sensibilidad sin igual para conseguir detectar péptidos en matrices complejas. Y gracias a su excepcional estabilidad frente a condiciones ambientales, descubrirás que el LTQ Orbitrap ofrece masa exacta de forma rutinaria y fiable.

Para descubrir más sobre el poder del Nuevo LTQ Orbitrap para análisis de péptidos y estudio de proteínas, visita www.thermo.com/proteomics, o contacta con nosotros.

LTQ Orbitrap, ganador del prestigioso premio 2006 Pittcon Editors' Gold Award

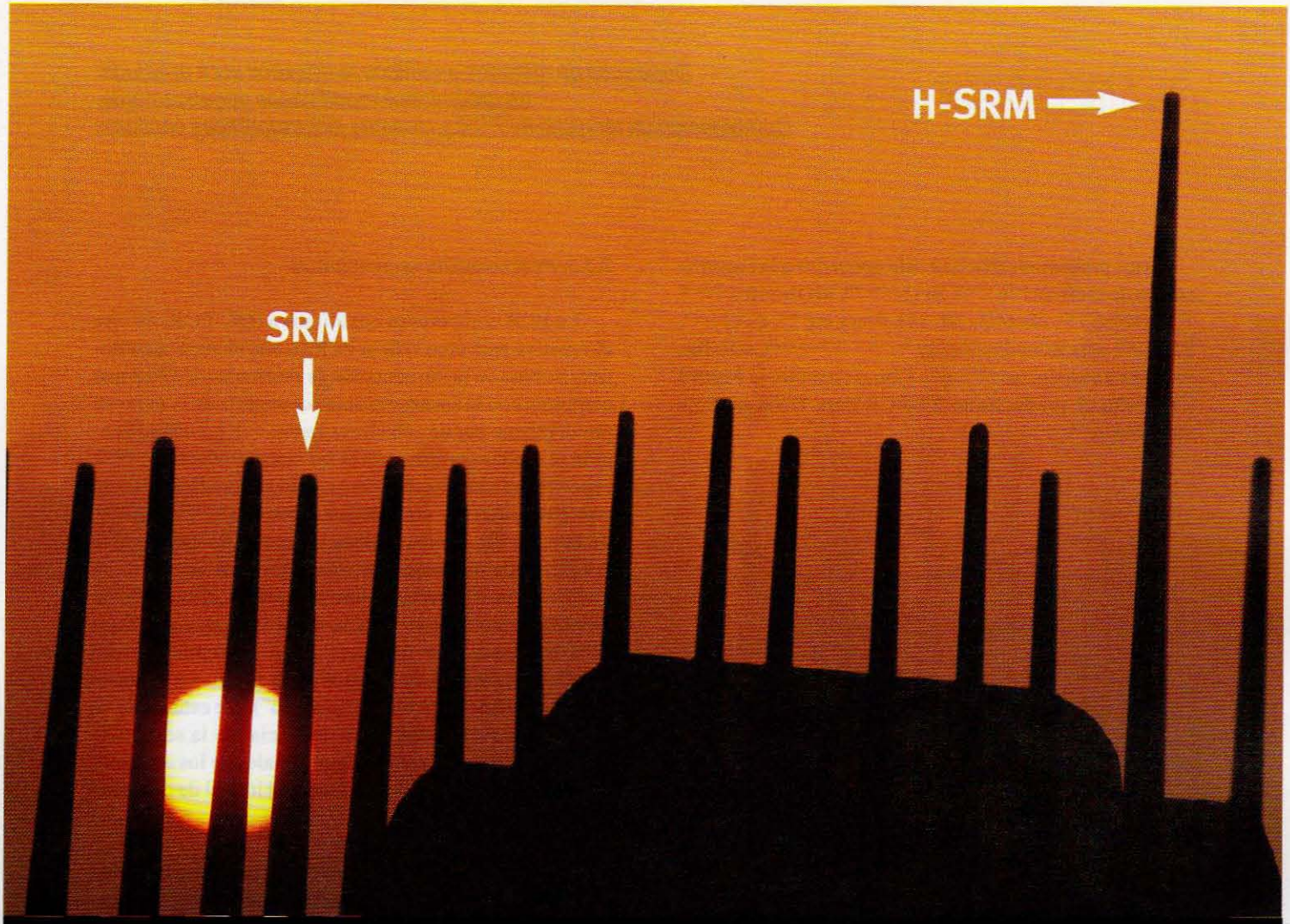
Thermo Electron, S.L.
Madrid: Sepúlveda, 7 A - 28108 Alcobendas Tel. 916 574 930 - Fax 916 615 572
Barcelona: Acero, 30-32, Plta. 2 Mód 3 08038 Barcelona Tel. 932 230 918 Fax 932 230 982
www.thermo.com analyze.es@thermo.com

Acércate a nuestras soluciones

Analyze • Detect • Measure • Control™

Thermo
ELECTRON CORPORATION

©2005 Thermo Electron Corporation. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Electron Corporation and its subsidiaries.



Escápate del Ruido.

Consigue los niveles más bajos en bioanálisis cuantitativos, con H-SRM y la nueva sonda H-ESI con tecnología de Zona de Desolvatación Dual, disponible sólo en los Espectrómetros de Masas de Triple Cuadrupolo de Thermo.

Sin la capacidad exclusiva de los triples cuadrupolos Finnigan™ TSQ Quantum™ para realizar, con alta resolución, Monitorización de Reacciones de Iones (H-SRM), no tendrás todos los recursos que necesitas para analizar muestras biológicas complejas.

Gracias al diseño de cuadrupolo hiperbólico patentado por Thermo para H-SRM los cuadrupolos HyperQuad™ ofrecen mayor eficacia de transmisión de iones, minimizando los falsos positivos y maximizando la sensibilidad con una relación señal-ruido superior a cualquier otro instrumento. Además, el TSQ Quantum ofrece en exclusiva la nueva sonda ESI termostatizada con tecnología de Zona de Desolvatación Dual para mejorar todavía más sus prestaciones.

Visita www.thermo.com/tsq para ver el vídeo de todo lo que puede hacer el TSQ Quantum, o contacta con nosotros para más información.

Thermo Electron, S.L.
Madrid: Sepúlveda, 7 A 28108 Alcobendas Tel. 916 574 930 Fax 916 615 572
Barcelona: Acero, 30-32, Plta. 2 Mód 3 08038 Barcelona Tel. 932 230 918 Fax 932 230 982
www.thermo.com analyze.es@thermo.com

Acércate a nuestras soluciones

Analyze • Detect • Measure • Control™

Thermo
ELECTRON CORPORATION

Estos procedimientos han sido aplicados a la cuantificación de maíz Bt176 [38-40], Bt11 [23, 32, 39], MON810 [6, 28-30, 39, 41], MON863 [7], NK603 [30, 34], StarLink [42], GA21 [37], T25 [39, 43], soja Roundup Ready [6, 24, 26, 17, 12, 38, 41, 44-47], semillas de colza transgénicas [48-50], etc. Como ejemplo, la **Figura 5** muestra el producto de RT-PCR para DNA de Soja transgénica [38]

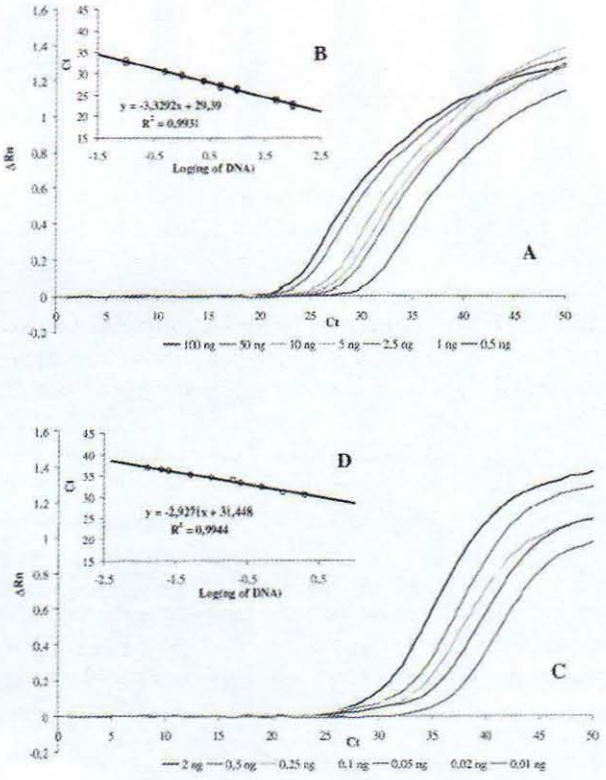


Figura 5. Cuantificación de soja transgénica: (A) amplificación generada a partir de cantidades conocidas de DNA con un sistema de PCR endógeno; (B) recta de calibrado correspondiente de los datos en (A); (C) amplificación generada a partir de cantidades conocidas de DNA con un sistema de PCR transgénico; (D) recta de calibrado correspondiente de los datos en (C). Redibujado de la referencia [38]

A pesar de las ventajas y aplicaciones citadas, RT-PCR tiene el inconveniente de un elevado coste del equipamiento y de las sondas que se emplean, así como el hecho de que la técnica no está suficientemente perfeccionada para abordar la detección de varios GMOs mediante sistemas de PCR multiplex [2]. Por otro lado, la reproducibilidad de los métodos RT-PCR determinada mediante ensayos inter-laboratorio a veces no es demasiado buena, habiéndose obtenido coeficientes de variación de hasta un 40% en la determinación de GMOs empleando esta técnica [51]

2.2.2. PCR competitiva cuantitativa

La PCR competitiva cuantitativa (QC-PCR) es otra alternativa para convertir la PCR en una técnica cuantitativa. Se basa en la introducción de moléculas de DNA que compiten con la secuencia diana contenida en la muestra por el mismo par de cebadores (*primers*). La cuantificación se realiza comparando la señal del producto de PCR específico de la muestra con la señal generada a partir de concentraciones de competidor conocidas [2]. El principio de la cuantificación se puede presentar de una manera simplificada diciendo que, si se cumplen una serie de condiciones, fundamentalmente que la eficiencia de amplificación de la secuencia diana y de su competidor sean iguales o muy similares, las proporciones de los amplicones correspondientes se mantendrán a lo largo de la reacción (incluida la fase "plateau"). De este modo se puede deducir la concentración inicial de la secuencia diana a partir de las proporciones finales de los amplicones y del conocimiento de la cantidad inicial de competidor añadida a la reacción.

El diseño del DNA competidor es un aspecto importante en el desarrollo de QC-PCR, ya que como se ha mencionado antes, la cuantificación depende de que la secuencia diana y la secuencia competidora se amplifiquen con la misma eficiencia a lo largo de todo el tiempo de reacción. Las dos condiciones básicas que es necesario tener en cuenta en el diseño de una secuencia competidora son: que se amplifique con los mismos cebadores y que contenga alguna diferencia con la secuencia diana original para facilitar la detección diferencial. Existen varios métodos publicados que emplean QC-PCR para la cuantificación de maíz o soja transgénicos en alimentos [32, 46, 52-55]

La técnica usada para detectar y cuantificar los productos de amplificación también es determinante para la calidad de los resultados, ya que un dato fundamental para la cuantificación es la proporción molar de los amplicones obtenidos. Lo más frecuente es realizar una electroforesis en placa AGE y teñir el gel con bromuro de etidio. A continuación se enumeran algunas de las limitaciones más conocidas de esta tecnología, que en parte derivan de la utilización de AGE como método para separar y cuantificar los productos de amplificación. El uso de la doble escala logarítmica disminuye la exactitud y precisión del ensayo porque es probable que pequeñas variaciones puedan pasar desapercibidas. El desarrollo de los análisis supone un tiempo considerable comparado con PCR en tiempo real y está poco automatizada. Alternativamente también se han desarrollado procedimientos que consisten en la captura de los productos de PCR en microplacas para la posterior cuantifi-

cación del material capturado. Cuenta con una baja capacidad de procesamiento. Sin embargo, se están diseñando sistemas como por ejemplo, el uso combinado de QC-PCR con la tecnología MAGDE (Microplate Array Diagonal Gel Electrophoresis) [56] con la intención de paliar esta limitación. A pesar de que diversos ensayos inter-laboratorios han demostrado que el sistema de PCR competitivo da lugar a resultados más reproducibles que los sistemas basados en PCR estándar para el análisis de GMOs en alimentos, se sigue observando gran variabilidad que se atribuye a la insuficiente homogenización de las muestras y a las diferencias en la determinación de la concentración de DNA. Esto se explica porque la cantidad de molécula competidora es fácil de medir, mientras que la estimación de la cantidad de DNA de la muestra está sujeta a un gran número de errores incluyendo la presencia de varias moléculas como lípidos y polisacáridos que interfieren en la PCR y por tanto en la cuantificación final. Por otro lado, también se ha observado que la falta de reproducibilidad en algunas determinaciones de la concentración de DNA se debe fundamentalmente a los métodos utilizados para determinar la concentración del competidor en las múltiples diluciones [57].

2.2.3. Combinación de PCR y electroforesis capilar en geles

La separación en Electroforesis Capilar (CE) se basa en la distinta movilidad electroforética de las sustancias en disolución bajo la acción de un campo eléctrico. Las principales características de CE son su alta velocidad de análisis, gran versatilidad de aplicaciones, automatización, resultados cuantitativos, elevada eficacia y resolución y todo ello unido a un consumo reducido de muestra y disolventes. Estas características han contribuido al rápido desarrollo de CE. Así, por ejemplo, una búsqueda rápida en la base de datos *Food Science and Technology Abstract* (FSTA) con el término "capillary electrophoresis" y en el periodo de 1990-1996 reflejó la presencia de 156 trabajos publicados sobre este tópico; en el siguiente periodo de siete años de 1997-2003, la búsqueda arrojó la presencia de 482 publicaciones, demostrándose con ello el rápido crecimiento que ha experimentado el empleo de la CE en el análisis de alimentos [4]. Asimismo, aunque comparada con GC o HPLC, la CE es una técnica relativamente nueva en el análisis de alimentos, una gran variedad de los mismos (frutas, verduras, leche, carnes, cereales, etc.) ha sido ya estudiada por CE [3]. Además, la versatilidad de esta técnica queda demostrada con su capacidad para el control de cambios producidos en alimentos tales como oxidación, racemización de aminoácidos, u otros cambios en la composición química durante el cocinado, tratamiento, almacenamiento, contaminación microbiana, etc. [3]

Por tanto, al combinar el aumento de la selectividad y la sensibilidad que proporcionan algunas de las técnicas de PCR, junto con las ventajas ya mencionadas de CE se obtiene una potente herramienta analítica que puede ser de gran utilidad para la detección de bacterias y patógenos en alimentos [58] o para la identificación de especies, cuando se sospecha que pueda haber una sustitución fraudulenta, una adición, o una contaminación en alimentos, y por supuesto para la detección de GMOs [3]

Ahora bien, los fragmentos de DNA no se pueden separar mediante el modo de trabajo más empleado en CE, la electroforesis capilar en zona libre, debido a que los fragmentos de DNA por encima de 20 pares de bases presentan la misma relación carga/masa con independencia del tamaño, es decir, una misma movilidad electroforética. La electroforesis capilar en gel (CGE) es una alternativa muy útil para resolver esta limitación ya que consiste en utilizar geles o redes poliméricas que producen un efecto tamiz al paso de moléculas de DNA de distinto tamaño. Los fragmentos de menor tamaño pasarán más rápido por el tamiz, presentando tiempos de migración más cortos que los fragmentos de mayor tamaño. Actualmente hay una clara tendencia a utilizar polímeros hidrófilos en el tampón de separación que han sustituido a los antiguos geles anclados covalentemente a la pared del capilar. Dentro de estos polímeros, los más empleados son la poliacrilamida lineal, polietilenglicol, derivados de celulosa (hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, etc.), polivinilalcohol, etc. [4]

Hasta el momento, se han publicado varios trabajos que combinan el uso de PCR y CGE para el análisis de GMOs [4, 5, 21, 57, 59-64], los cuales aparecen recogidos en la **Tabla 2**.

El primer trabajo publicado sobre el uso de CGE para detectar alimentos transgénicos lo realizó nuestro grupo de investigación en 2002 [60], desarrollando para ello un nuevo método de CGE en el que se utilizaban polímeros disponibles comercialmente junto con capilares de sílice fundida sin modificar. El método consistió en un lavado rutinario del capilar con ácido clorhídrico 0.1 M y el paso de una solución al 1% de polivinil alcohol. Además, se utilizó un tampón que contenía 2-hidroxietil celulosa (HEC). El método proporciona separaciones rápidas y eficaces de fragmentos de DNA en el rango de 80-500 pb. La separación de estos fragmentos de DNA se consiguió en 20 minutos con eficacias mayores de $1.8 \cdot 10^6$ platos/m y buena reproducibilidad para un mismo día, entre días y entre capilares.

Tabla 2. Trabajos publicados sobre el análisis de GMOs mediante el uso combinado de PCR y CGE

GMOs	Ref
Maíz transgénico Bt176	[21, 57, 60]
Maíz transgénico Bt176, Bt11, GA21, MON810 y T25	[59]
Maíz transgénico Bt176 y Soja Roundup Ready	[61]
Soja Roundup Ready	[62]
Maíz transgénico Bt176, Bt11, MON810, MON863, GA21, TC1507, NK603 y T25	[63]
Maíz transgénico Bt	[64]
Trabajos de revisión	[4, 5]

La diferencia de sensibilidad obtenida en CGE empleando detección por absorción UV y por fluorescencia inducida por láser (LIF) [21] para el análisis de DNA queda claramente reflejada en las separaciones recogidas en las **Figuras 6 y 7**. En la **Figura 6** se muestra el electroforegrama CGE-UV de DNA de maíz donde (A) y (B) se obtuvieron con DNA procedente de harina de maíz que contenía 1% de maíz transgénico; concretamente la Figura 6A corresponde a la amplificación del DNA por PCR empleando la pareja de *primers* MSS-S/MSS-A la cual da idea de la adecuada calidad del DNA extraido. Por otro lado la Figura 6B corresponde a la amplificación del DNA por PCR empleando la pareja de *primers cryIA(b)-V3/cryIA(b)-V4*. Esta PCR es la que permite diferenciar la existencia o no de DNA transgénico en la muestra. La Figura 6C corresponde a DNA de maíz convencional (0% transgénico) amplificado empleando la pareja de *primers cryIA(b)-V3/cryIA(b)-V4*; y (D) la reacción control de amplificación sin DNA pero con la pareja de primers cryIA(b)-V3/cryIA(b)-V4. Como se puede ver comparando las Figuras 6B y la 6C se demuestra que el sistema permite diferenciar aquellas muestras conteniendo 1% de maíz transgénico (Fig 6B) de aquellas libres de transgénico (Fig 6C). Sin embargo, la relación señal/ruido es muy baja por lo que se procedió a emplear como detector LIF junto con un intercalante de DNA. La **Figura 7** recoge el electroforegrama CGE-LIF de las mismas muestras de la Figura 6, mostrando el importante aumento en sensibilidad, lo que supone en el caso (B) pasar de una relación señal-ruido de 2.6 con CGE-UV a 2633 con CGE-LIF. Además, en la Figura 7C aparece un pico (*) que en el caso anterior no se detectaba. Este pico fue debido a una contaminación en la harina de maíz convencional, según se demostró en el mencionado trabajo [21]

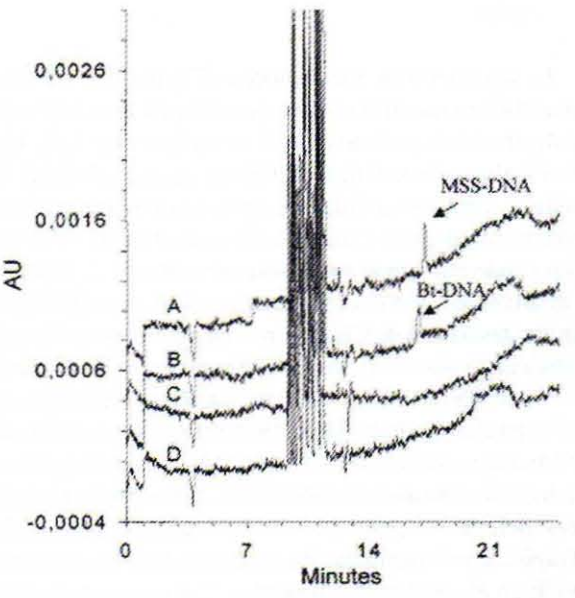


Figura 6. Electroforegrama CGE-UV obtenido de las reacciones de amplificación por PCR. Redibujado de la referencia [21]

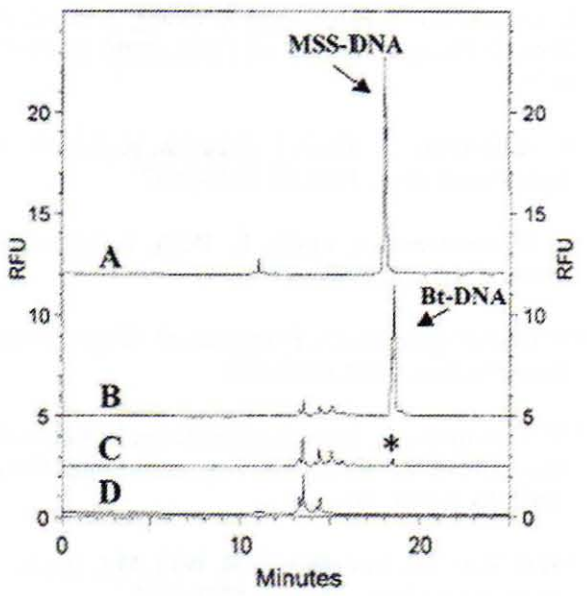


Figura 7. Electroforegrama CGE-LIF obtenido de las mismas muestras de la Figura 6. Redibujado de la referencia [21]

En el año 2002, nuestro grupo de investigación demostró que es posible la detección ultrasensible de DNA de maíz modificado genéticamente [64]. Para ello se empleó CGE con detección por LIF estudiando diferentes agentes intercalantes fluorescentes, y comprobando que YOPRO-1 proporcionaba condiciones óptimas en términos de sensibilidad, eficacia, rapidez de análisis, reproducibilidad y coste por ensayo. Asimismo, con el uso de este intercalante fluorescente, la señal de fluorescencia varió linealmente con la concentración de DNA en el rango estudiado, lo cual es una buena indicación de las posibilidades cuantitativas de este procedimiento analítico. Con esta información se desarrolló un nuevo procedimiento basado en la co-amplificación de secuencias específicas de DNA de maíz transgénico Bt junto al uso de estándars internos aplicando QC-PCR [57] Los productos de QC-PCR se analizaron cuantitativamente mediante CGE-LIF. Además, se demostró que los ensayos multiplex (PCR en la que se amplifican más de una secuencia en una misma reacción) mediante procedimientos de PCR-CGE-LIF presentan una serie de ventajas frente al empleo de PCR-AGE incluyendo sensibilidad, resolución, eficacia, y reproducibilidad para análisis de PCR multiplex. Estas ventajas hacen de CGE-LIF una técnica muy apropiada para la optimización de reacciones de PCR multiplex e incluso adecuada para la detección de varias líneas de maíces transgénicos a la vez (Bt11, T25, MON810, GA21 y Bt176) [59] Similar procedimiento fue aplicado por Corbisier y col. [62] a distintas muestras de Soja Roundup Ready.

En la **Figura 8** aparecen los electroforegramas mediante CGE-LIF de una serie de reacciones QC-PCR para DNA de maíz Bt176 [57]. En dicha figura, se muestran cinco amplificaciones (de B a F) llevadas a cabo usando 50 ng de DNA procedentes de una muestra conteniendo 1% de maíz Bt176 y variando las cantidades de estándar interno *pBTIS*: (A) 0, (B) 0.03, (C) 0.08, (D) 0.22, (E) 0.47, y (F) 1.45 fg; (G) electroforegrama de la reacción de PCR usando 1.45 fg de *pBTIS* como estándar interno en ausencia de DNA de maíz transgénico. Los resultados obtenidos demuestran que el método de CGE permite alcanzar una buena separación de los dos fragmentos de DNA de interés (el DNA objetivo tiene un tamaño de 213 pares de bases y el estándar interno de 223 pares de bases).

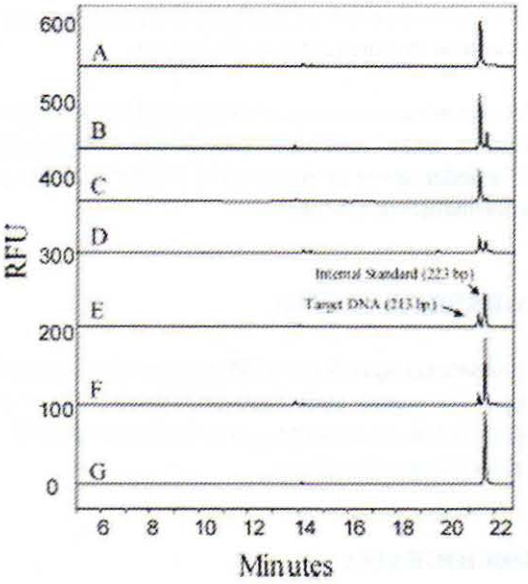


Figura 8. Electroforegramas de una serie de reacciones QC-PCR para DNA de maíz Bt176. Redibujado de la referencia [57]

Giovannoli y col. [61] realizaron poco después un análisis de fragmentos de DNA de maíz transgénico Bt176 y soja Roundup Ready modificando el método CGE-LIF desarrollado por García-Cañas y col. [57]. En concreto, el polímero 2-hidroxietil celulosa fue sustituido en el tampón de separación por hidroxipropil celulosa. Este procedimiento les proporcionó buena reproducibilidad en todos los casos por lo que concluyeron que este recubrimiento, descrito hasta ahora solo para proteínas, podía ser aplicado también a la separación de fragmentos de DNA.

Onishi y col. [63] llevaron a cabo la detección cualitativa mediante una PCR multiplex de ocho eventos de maíz modificado genéticamente y compararon después este procedimiento con el de electroforesis capilar. Se concluyó que la electroforesis capilar podía separar fragmentos de manera más clara y más rápida que la electroforesis en gel de agarosa. Además, la alta capacidad de separación de la electroforesis capilar permitía la separación de más productos amplificados.

Cabe esperar que en un futuro próximo algunos de los nuevos desarrollos técnicos o metodológicos de CE encuentren aplicaciones en el área del análisis de alimentos transgénicos. Así lo demuestra la utilización reciente de CE en microchips en el área del análisis de alimentos [65-80] y en concreto su aplicación para detectar GMOs [66, 76-80]. Es de suponer que debido al bajo coste y la elevada velocidad de análisis que se puede obtener con el empleo de estos microchips será posible generalizar su uso en un corto periodo de tiempo.

Otras nuevas tecnologías como la aplicación de sistemas "microarray" para análisis de DNA [81] y/o biosensores [82] pueden tener un interesante futuro también en el área del análisis de GMOs.

3. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Educación y Ciencia (proyecto AGL2005-05320-C02-01) y a la Comunidad de Madrid (proyecto S-505/AGR-0153) la financiación de este trabajo.

4. BIBLIOGRAFÍA

[1] A.K. Deisingh, N. Badrie, *Food Res. Int.*, **2005**, 38, 639-649

[2] V.García-Cañas, A. Cifuentes, R. González, *Alimentaria*, **2002**, 11-19

[3] A. Cifuentes, *Electrophoresis*, **2006**, 27, 283-303

[4] V. García-Cañas, R. González, A. Cifuentes, *Trends Anal. Chem.*, **2004**, 23, 637-643

[5] V.García-Cañas, A. Cifuentes, R. González, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2004**, 44, 425-436

[6] C. Peano, M. C. samson, L. Palmieri, M. Gulli, N. Marmiroli, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 6962-6968

[7] L.Yang, S. Xu, A. Pan, C. Yin, K. Zhang, Z. Wang, Z. Zhou, D. Zhang, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 9312-9318

[8] S. Vollenhofer, K. Burg, J. Schmidt, H. Kroath, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 5038-5043

[9] A. Zimmermann, J. Lüthy, U. Pauli, Z. Lebensm. Unters. *Forsch. A*, **1998**, 207, 81-90

[10] E. Gachet, G.G. Martin, F. Vigneau, G. Meyer, *Trends Food Sci.Tech.*, **1999**, 9 380-388

[11] R. El Sanhoty, H. Broll, L. Grohmann, B. Linke, A. Spiegelberg, K.-W. Bögl, J. Zagon, *Nahrung Food*, **2002**, 46, 5, 360- 363

[12] M.E. Rott, T.S. Lawrence, E.M. Wall, M.J. Green, J. *Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 5223-5232

[13] A. Germini, A. Zanetti, C. Salati, S. Rossi, C. Forré, S. Schmid, R. Marchelli, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 3275-3280

[14] R. Greiner, U. Konietzny, A. L.C.H. Villavicencio, *Food Control*, **2005**, 16, 753–759

[15] V.T. Forte, A. Di Pinto, C. Martino, G.M. Tantillo, G. Grasso, F.P. Schena, *Food Control*, **2005**, 16, 535-539

[16] L.Yi-Ching, L. Shin-Huang, L. Hsi-Mei, J. Shih-Tong, Eur. *Food Res. Technol.*, **2005**, 221, 725-730

[17] Chia-Chia Huang, Tzu-Ming Pan, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 3833-3839

[18] E. Margarit, M.I. Reggiardo, R.H. Vallejos, H.R. Permingeat, *Food Res. Int.*, **2006**, 39, 250-255

[19] A. Jankiewicz, H. Broll, J. Zagon, *Eur. Food Res. Technol.*, **1999**, 209, 77-82

[20] P. Hübner, E. Studer, D. Häfliger, M. Stadler, C. Wolf, M. Looser, *Accred. Qual. Azur.*, **1999**, 4, 292-298

[21] V. García-Cañas, R. González, A. Cifuentes, J. Agric. Food Chem., 2002, 50, 1016-1021

[22] V. García-Cañas. Tesis Doctoral: *Análisis de organismos modificados genéticamente en alimentos mediante el uso combinado de reacción en cadena de la polimerasa y Electroforésis capilar*. Universidad Autónoma de Madrid. **2004**

[23] S.B. Rønning, M. Vaïtilingom, K.G. Berdal, A. Holst-Jensen, *Eur. Food Res. Technol.*, **2003**, 216, 347-354

[24] K.G. Berdal, A. Holst-Jensen, Eur. *Food Res. Technol.*, **2001**, 213, 432-438

[25] VP. Windels, I. Taverniers, A. Depicker, E. Van Bockstaele, M. de Loose, *Eur. Food Res. Technol.*, **2001**, 213, 107-112

[26] C.F. Terry, N. Harris, *Eur. Food Res. Technol.*, **2001**, 213, 425-431

[27] M. Burns, D. Shanahan, H. Valdivia, N. Harris, *Eur. Food Res. Technol.*, **2003**, 216, 428-433

[28] A. Holck, M. Va, L. Didierjean, K. Rudi, *Eur. Food Res. Technol.*, **2002**, 214, 449-453

[29] M. Hernández, M. Pla, T. Esteve, S. Prat, P. Puigdomènech, A. Ferrando, *Transgenic Res.*, **2003**, 12, 179-189

[30] Hsin-Ying Huang, Tzu-Ming Pan, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 3264-3268

[31] F. Moreano, A. Ehlert, U. Busch, K-H. Engel, *Eur. Food Res. Technol.*, **2006**, 222, 479–485

[32] A. Zimmermann, J. Lüthy, U. Pauli, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **2000**, 33, 210- 216

[33] I. Taverniers, P. Windels, M. Vaïtilingom, A. Milcamps, E. Van Bockstaele, G. van den Eede, M. De Loose, J. Agric. *Food Chem.*, **2005**, 53, 3041-3052

[34] C.R. Nielsen, K.G. Berdal, A. Holst-Jensen, *Eur. Food Res. Technol.*, **2004**, 219, 421-427

[35] C.D. Hurst, A. Knight, I.J. Bruce, *Molecular Breeding*, **1999**, 5, 579-586

[36] R. Meyer, *Food Control*, **1999**, 10, 391-399

[37] M. Hernández, T. Esteve, S. Prat, M. Pla, *J. Cereal Sci.*, **2004**, 39, 99-107

[38] M. Vaïtilingom, H. Pigneburg, F. Gendre, P.Brignon, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 5261-5266

[39] PD. Brodmann, EC. Ilg, H. Berthoud y col., *J. AOAC Int.*, **2002**, 85, 646-653

[40] M. Hernández, M-N. Duplan, G. Berthier, M. Vaïtilingom, W. Hauser, R. Freyer, M. Pla, Y. Bertheau, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 4632-4637

[41] T Yoshimura, H. Kuribara, T. Matsuoka y col., *J. Agr. Food Chem.*, **2005**, 53, 2052-2059

[42] P. Windels, S. Bertrand, A. Depicker, W. Moens, E. Bockstaele, M. Loose, *Eur. Food Res. Technol.*, **2003**, 216, 259-263

[43] F. Weighardt, C. Barbati, C. Paolleti y col., *J. AOAC Int.*, **2004**, 87, 1342-1355

[44] R. Alary, A. Serin, D. Maury y col., *Food Control*, **2002**, 13, 235-244

[45] CF. Terry, DJ. Shanahan, DL. Ballam y col., *J. AOAC Int.*, **2002**, 85(4), 938-944

[46] A. Holst-Jensen, S. B. Rønning, A. Løvseth, K. G. Berdal, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, 375, 985-993

[47] N. Foti, R. Onori, E. Donnarumma, B. de Santis, M. Miraglia, *Eur. Food Res. Technol.*, **2006**, 222, 209-216

[48] R. Zeitler, K. Pietsch, H-U. Waiblinger, *Eur. Food Res. Technol.*, **2002**, 214, 346-351

[49] HU. Waiblinger, M. Ohmenhauser, K. Pietsch y col., *Deut. Lebensm-Rundsch*, **2005**, 101, 543-549

[50] HB. Weng, LT.Yang, ZL. Liu y col., *J. AOAC Int.*, **2005**, 88, 577-584

[51] M. Höhne, C. R. Santisi, R. Meyer, *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, 215, 59-64

[52] E. Studer, C. Rhyner, J. Lüthy, P. Hübner, Z. *Lebensm. Unters. Forsch. A*, **1998**, 207, 207-213

[53] P. Hübner, E. Studer, J. Lüthy, *Food Control*, **1999**, 10, 353-358

[54] M. Hardegger, P. Brodmann, A. Herrmann, *Eur. Food Res. Technol.*, **1999**, 209, 83–87

[55] A. K. Mavropoulou, T. Koraki, P. C. Ioannou, T. K. Christopoulos, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 4785-4791

[56] S. Rodriguez, X.H. Chen, I.N.M. Day, *Electrophoresis*, **2004**, 25, 975-979

[57] V.García-Cañas, A. Cifuentes, R. González, *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 2306-2313

[58] B. Alarcón, V. García-Cañas, Alejandro Cifuentes, R. N González, R. Aznar, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 7180-7186

[59] V. García-Cañas, R. González, A. Cifuentes, *Electrophoresis*, **2004**, 25, 2219-2226

[60] V. García-Cañas, R. González, A. Cifuentes, *J. Sep. Sci.*, **2002**, 25, 577-583

[61] C. Giovannoli, L. Anfossi, C. Tozzi, G. Giraudi, A. Vanni, *J. Sep. Sci.*, **2004**, 27, 1551-1556

[62] P. Corbisier, S. Trapmann, D. Gancberg, L. Hannes, P. Van Iwaarden, G. Berben, H. Schimmel, H. Emons, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 383, 282–290

[63] M. Onishi, T. Matsuoka, T. Kodama, K. Kashiwaba, S. Futo, H. Akiyama, T. Maitani, S. Furoi, T. Oguchi, A. Hino, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 9713-9721

[64] V. García-Cañas, R. González, A. Cifuentes, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 4497-4502

[65] G. Feriotto, S. Gardenghi, N. Bianchi, R. Gambari, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 4640-4646

[66] Y-J. Kim, J-S. Chae, J. Keun Chang, S. Ho Kang, S. Ho Kang, *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1083, 179–184

[67] J.W. Hong, T. Fujii, M. Seki, T. Yamamoto, I. Endo, *Electrophoresis*, **2001**, 22, 288–333

[68] J. Tanyanyiwa, PC. Hauser, *Anal. Chem.*, 2002, 74 6378-6382

[69] M. Masar, M. Zuborova, D. Kaniansky, J. Sep. Sci., 2003, 26 647-652

[70] M. Kato, Y. Gyoten, K. Sakai-Kato, *J. Chromatogr. A*, **2003,** 1013 183-189

[71] M. Masar, M. Dankova, E. Olvecka, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1026 31-39

[72] J. Wang, G. Chen, M. Wang, *Analyst*, **2004**, 129, 512-515

[73] M. Scampicchio, J. Wang, S. Mannino, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1049, 189-194

[74] H. Gardeniers, A. Van den Berg, Int. J. Environ. *Anal. Chem.*, 2004, 84, 809-819

[75] M. Masar, K. Poliakova, M. Dankova, *J. Sep. Sci.*, **2005**, 28 905-914

[76] L. Birch, C.L. Anchard, H.C. Parkes, D.G. McDowell, *Food Control*, **2001**, 12, 535-540

[77] P.J. Obeid, T. K. Christopoulos, P.C. Ioannou, *Electrophoresis*, **2004**, 25, 922–930

[78] A Germini, A. Mezzelani, F. Lesignoli y col., *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 4535-4540.

[79] XD. Xu, YC. Li, H. Zhao y col., *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 3789-3794

[80] R. Bordoni, A. Germini, A. Mezzelani y col., *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53(4), 912-918.

[81] X.M. Lian, S.P. Wang, J.W. Zhang y col. *Plant Mol. Biol.* **2006**, 60, 617-631

[82] E.Mariotti, M. Minunni, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 453, 165-172

* * *

Si desea hacerse socio de la SECyTA rellene y envíe el siguiente boletín de inscripción, acompañado de la correspondiente autorización bancaria a:

Dra. Mercedes Torre
Departamento de Química Analítica e Ingeniería Química
Facultad de Química. Universidad de Alcalá
28871-Alcalá de Henares, Madrid
E-mail: mercedes.torre@uah.es

Cuota año 2006: 30 €

- Señale la casilla ☐ correspondiente a la dirección en la que desea recibir la correspondencia.
- Puede efectuar el pago de la cuota del primer año mediante cheque bancario (adjuntándolo a esta solicitud) o mediante ingreso/transferencia a la Cuenta Corriente de "la Caixa" 2100/3739/11/2200059715 (Sociedad Española de Cromatografía y Afines). Debe figurar en el ingreso o transferencia: "ALTA SECYTA + nombre y primer apellido del Socio"
- ¿Autoriza a incluir su correo electrónico en la página Web de la SECyTA? SI NO (Tache lo que NO proceda)

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES

HOJA DE INSCRIPCION

Apellidos ..... Nombre .....
DNI .....
☐ Domicilio particular:
Calle ..... Núm. .....
Municipio ..... Provincia.....
Código postal .....
Teléfono ..... Correo electrónico .....
☐ Industria u organización .....
.....
Calle ..... Núm. .....
Municipio ..... Provincia.....
Código postal .....
Teléfono ..... FAX ..... Correo electrónico .....

DATOS BANCARIOS

Banco/Caja de Ahorros .....
Sucursal .....
Dirección ..... Ciudad.....
D. .....
Con domicilio en .....
Y con cta. cte. / libreta de ahorro núm. / _ _ _ _ / _ _ _ _ / _ _ / _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ /
Entidad Oficina D.C. Número de cuenta

en esta Sucursal, ruega a usted se digne dar las órdenes oportunas para que con cargo a dicha cuenta sean abonados los recibos de mi cuota anual de socio que les serán presentados al cobro por la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines.
Atentamente le saluda,

En..... a.....de.....de 2006

Firma:

EMPRESAS colaboradoras

PROTECTORAS

- AGILENT TECHNOLOGIES SPAIN, S.L.
  Ctra. N-VI, km 18,200
  28230 LAS ROZAS (Madrid)

- PERKIN ELMER ESPAÑA, S.L.
  Avda. Encuartes, 19
  28760 TRES CANTOS (Madrid)

- THERMO ELECTRON CORPORATION
  Sepúlveda, 7 - A
  28108 ALCOBENDAS (Madrid)

- WATERS CROMATOGRAFÍA, S.A.
  Ronda Can Fatjo, 7-A, 24
  Parc Tecnologic del Vallés
  08290 CERDANYOLA DEL VALLES (Barcelona)

- KONIK-TECH, S.A.
  Avda. Cerdanyola, 73
  08190 SANT CUGAT DEL VALLÉS (Barcelona)

ASOCIADAS

- AL AIR LIQUIDE ESPAÑA, S.A.
  Paseo de la Castellana, 35
  28046 MADRID

- BRUKER ESPAÑOLA, S.A.
  Av. de Castilla, 2 (P. E. San Fernando)
  28830 SAN FERNANDO DE HENARES (Madrid)

- GILSON INTERNATIONAL B.V.
  Apartado de Correos, 1075
  28830 SAN FERNANDO DE HENARES (Madrid)

- GOMENSORO, S.A.
  Aguacate, 15
  28044 MADRID

- INGENIERÍA ANALÍTICA, S.L.
  Carretera de Cerdanyola, 73
  08190 SANT CUGAT DEL VALLÉS
  (Barcelona)

- IZASA, S.A.
  Aragoneses, 13
  Polígono Industrial Alcobendas
  28100 ALCOBENDAS (Madrid)

- MILLIPORE IBÉRICA, S.A.
  Avda. Llano Castellano, 13
  28034 MADRID

- SCHARLAB, S.L.
  La Jota, 86
  08016 BARCELONA

- Servicio y Mantenimiento de Técnicas Analíticas, S.A.L. (SYMTA, S.A.L.)
  San Máximo, 31
  28041 MADRID

- S.I.A. Enginyers, S.A.
  Monturiol, 16, baixos
  08018 BARCELONA

- S. E. DE CARBUROS METÁLICOS, S.A.
  Av. Matapiñonera, 9
  28700 S. SEBASTIÁN DE LOS REYES (Madrid)

- SUGELABOR
  Sicilia, 36
  28038 MADRID

- TEKNOKROMA
  Camí de Can Calders, 14
  08190 SANT CUGAT DEL VALLÉS
  (Barcelona)

- VARIAN-IBÉRICA, S.L.
  Avda. Pedro Díez, 25, 3º
  28019 MADRID

- VERTEX TECHNICS, S.L.
  Comercio, 12-14 bajos
  08902 HOSPITALET DE LLOBREGAT
  (Barcelona)

- VWR International - EUROLAB, S.L.
  Polígono Merck
  08100 MOLLET DEL VALLÉS
  (Barcelona)

NOTICIAS DE LA SECyTA

PRÓXIMA REUNIÓN CIENTÍFICA DE LA SECyTA

VI Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (SECyTA), que se celebrará en Vigo, del 8 al 10 de Noviembre de 2006, organizada por la Universidad de Vigo y el Colegio Oficial de Químicos de Galicia

Invitación

En nombre del Comité Organizador nos gustaría invitar a la comunidad científica a asistir a la 6ª Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines que tendrá lugar en Vigo (Auditorio del Centro Cultural Caixanova, C/ Marqués de Valladares, s/n), del 8 al 10 de Noviembre de 2006.

El Simposio cubrirá los aspectos fundamentales y aplicaciones de la cromatografía de gases, cromatografía de líquidos, electroforesis capilar y otras técnicas microanalíticas, analíticas y preparativas de separación, incluyendo la detección y preparación de muestras. Las aplicaciones se centrarán especialmente en:

- Análisis de alimentos
- Análisis de fármacos
- Desarrollos instrumentales
- Análisis ambiental
- Bioanálisis
- Fundamentos/Quimiometría
- Nuevas tendencias/Miniaturización

El programa científico incluirá sesiones plenarias, conferencias invitadas y presentaciones orales y en forma de póster; asimismo, se organizarán mesas de discusión dirigidas por líderes de los sectores correspondientes.

Comité Científico

Ana Gago Martínez, Univ. de Vigo, Colegio Of. Químicos de Galicia, Vigo (España)
José Antonio Rodríguez Vázquez, Univ. de Vigo, Colegio Of. Químicos de Galicia, Vigo (España)
Darío Prada Rodríguez, Univ. de La Coruña, Colegio Of. Químicos de Galicia, Vigo (España)
José Carlos Díez-Masa, CSIC, Madrid (España)
Mª Luisa Marina Alegre, Univ. de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid (España)
Mercedes de Frutos Gómez, CSIC, Madrid (España)
Jordi Mañes i Vinuesa, Univ. Valencia, Valencia (España)
A. L. Burlingame, Univ. California (UCSF), San Francisco (EEUU)
Coral Barbas, Univ. San Pablo-CEU, Madrid (España)
Jacob de Boer, Institute for Fisheries Research (Holanda)
Juan Santiago, Stanford University, Standford, CA (EEUU)
Jonas Berquit, Biomedical Centre, Uppsala Univ., Uppsala (Suecia)
Francisco Tomás Barberán, CEBAS-CSIC, Murcia (España)
Cees Gooijer / Freek Ariese, Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam (Holanda)
Peter Schoenmakers, Van't Hoff Institute for Molecular Sciences, Univ. of Amsterdam, Amsterdam (Holanda)
Fátima Alpendurada, IAREN, Univ. Porto, Porto (Portugal)
(Otros miembros por confirmar)

Comité Organizador

Ana Gago Martínez (Presidenta), Univ. de Vigo, Colegio Of. Químicos de Galicia, Vigo (España)
Juan Prado Fernández, Univ. de Vigo, Vigo (España)
José Manuel Leão Martíns, Univ. Vigo, Vigo (España)
Celia Mª Fernández Permuy, Univ. de Vigo, Vigo (España)
Diana Mª Seijo Vila, Univ. de Vigo, Vigo (España)
Mª Isabel López Lago, Univ. de Vigo, Vigo (España)
Natividad García Vara, Univ. de Vigo, Vigo (España)
Laura Barbi Pérez, Univ. de Vigo, Vigo (España)
Luis Miguel Santos González, Univ. deVigo, Vigo (España)
Socorro Rivera Vila, Univ. de Vigo, Vigo (España)
Sandra Rellán Piñeiro, Univ. de Vigo, Vigo (España)
Pablo de la Iglesia González, Univ. de Vigo, Vigo (España)
Fátima Moscoso Díaz, Colegio Of. Químicos de Galicia, Vigo (España)
Begoña Jiménez Luque, CSIC, Madrid (España)
Mercedes Torre Roldán, Univ. Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid (España)
(Otros miembros por confirmar)

Inscripción

Antes 1 OCTUBRE 2006

Participantes[1]	420 €
Miembros SECyTA[1]	350 €
Estudiantes[1,2]	170 €
1 Día[3]	110 €

Después 1 OCTUBRE 2006

Participantes[1]	450 €
Miembros SECyTA[1]	380 €
Estudiantes[1,2]	200 €
1 Día[3]	130 €

[1] Libro de Resúmenes, cafés, comidas y cena de gala incluidos.
[2] Se deberá acreditar mediante carta del responsable del grupo de investigación.
[3] Libro de Resúmenes, cafés y comida incluidos.

Becas para estudiantes de tercer ciclo

Los estudiantes en fase de desarrollo de proyecto de Tesis Doctoral o trabajos de investigación en universidades o centros de investigación, que sean miembros de la SECyTA, podrán solicitar una Beca a la Organización del Congreso. El formulario de solicitud y los requisitos para pedir la Beca aparecen en la Página Web del Congreso.

Fechas clave

REGISTRO PREVIO:
15 de JUNIO de 2006
ADMISIÓN RESÚMENES:
30 de JULIO de 2006
Los resúmenes recibidos después del 30 de julio de 2006 se considerarán de última hora.
SEGUNDA CIRCULAR:
A partir de junio (en la página Web del Congreso y por correo electrónico a los preinscritos).

Viaje y Alojamiento

Para cualquier información con respecto al viaje y alojamiento, contactar con la agencia de viajes:
Abramar SL.
Persona de contacto:
Zaira Rodríguez & Iria Rodríguez
Teléfono: +34 986449153
Fax: +34 986449717
Correo electrónico: congresos@abramar.com

Contacte con los organizadores del Congreso

Correo electrónico: cromatografía_vigo@uvigo.es
Ana Gago Martínez, Teléfono: +34 986812284
Fátima Moscoso Díaz, Teléfono: +34 986437915

Página Web del Congreso:

http://vicongresosecyta.uvigo.es

Programa Preliminar
Conferencias plenarias e invitadas

8 de Noviembre

Dr. A. L. Burlingame, Univ. California (UCSF), San Francisco (EEUU).
Título: "On defining protein epigenetic signatures by mass spectrometry"
Dra. Coral Barbas, U. San Pablo-CEU, Madrid (España).
Título: "Metabolomics and Capillary Electrophoresis-What does urine tell us?"
Dr. Francisco Tomás Barberán, CEBAS-CSIC, Murcia (España).
Título: "HPLC-MS-MS para la identificación de polifenoles bioactivos de alimentos y sus metabolitos producidos in vivo"
Dr. Juan Santiago, Stanford Univ., Stanford, CA (EEUU).
Título: "Electrokinetic microfluidcs at extreme scales"

9 de Noviembre

Dr. Jonas Berquit, Biomedical Centre, Uppsala Univ., Uppsala (Suecia).
Título: "Clinical neuroproteomics- From patient to single cell"
Dr. Freek Ariese / Dr. Cees Gooijer, Vrije Univ. Ámsterdam, Amsterdam (Holanda).
Título: "Cavity Ring Down Spectroscopy as a novel method of absorption detection in Liquid Chromatography"
Dra. Fátima Alpendurada, IAREN. Univ. Porto, Porto (Portugal)

10 de Noviembre

Dr. Jacob de Boer, Institute for Fisheries Research (Holanda).
Título: "Comprehensive two-dimensional Gas Chromatography for the analysis of dioxins and the other complex mixtures of persistent organic pollutants"
Dr. Peter Schoenmakers, Van't Hoff Institute for Molecular Sciences (HIMS), Univ. Amsterdam, Amsterdam (Holanda).
Título: "Comprehensive two-dimensional separations: more peaks and more information"

ESTATUTOS DE LA SECyTA

ESTATUTOS DE LA "ASOCIACIÓN SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES" (SECyTA)

(Adaptados a la Ley Orgánica 1/2002, de 22 de marzo, reguladora del derecho de Asociación e inscritos en el registro Nacional de Asociaciones, según resolución de 14 de diciembre de 2005)

Capítulo Primero.- Denominación, fines, ámbito y domicilio.

Artículo 1°: La "ASOCIACIÓN SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES", que se haya constituida al amparo del artículo 22 de la Constitución Española como una asociación científica sin ánimo de lucro, se rige por la Ley Orgánica 1/2002, de 22 de marzo, reguladora del Derecho de Asociación y sus disposiciones complementarias, así como por los presentes Estatutos y los acuerdos válidamente adoptados por sus órganos directivos dentro de sus respectivas competencias.

Artículo 2°: Los fines de la Asociación son promover, fomentar y difundir el conocimiento, progreso y aplicaciones de la Cromatografía y otras técnicas de separación en todos sus ámbitos y aplicaciones, y asesorar en materia científica y docente a las instituciones y entidades que lo requieran. Para el cumplimiento de sus fines, la Asociación podrá:

a) Organizar reuniones, cursos, conferencias y congresos para la exposición y discusión de trabajos científicos, tecnológicos o aplicados que le sean propios, así como organizar cualquier actividad educativa o recreativa que quieran hacer los socios.
b) Editar y distribuir cuantas publicaciones se consideren oportunas.
c) Crear comisiones, comités y grupos de estudio y de trabajo.
d) Cooperar con sociedades científicas análogas, así como con instituciones internacionales que le sean afines o que estén involucradas en el desarrollo de cualquier aspecto de la Cromatografía y de las técnicas de separación y sus aplicaciones.

Capítulo Segundo.- De los Miembros.

Artículo 3°: La Asociación, que realizará sus actividades en el ámbito de todo el territorio nacional por tiempo indefinido, goza de personalidad jurídica propia y plena capacidad de obrar, y podrá realizar actividades en el extranjero de acuerdo con la legislación vigente. El domicilio de la Asociación queda fijado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Barcelona, calle Martí i Franqués 1-11, 08028 Barcelona.

Artículo 4°: Podrán ser miembros las personas físicas o jurídicas, individuales o colectivas, cualquiera que sea su nacionalidad. Para ello los solicitantes habrán de ser presentados por dos miembros, y ser aceptados por la Junta de Gobierno y abonar la cuota anual. La condición de miembro les será reconocida mediante un certificado firmado por el Presidente y el Secretario de la Asociación.

Artículo 5°: Los miembros, en número ilimitado, son de las siguientes clases: Miembro ordinario: aquellas personas físicas que hayan sido admitidas en la Asociación. Miembro colectivo: aquellas sociedades, entidades, instituciones y empresas que hayan sido admitidas en la Asociación que estarán representadas por un solo miembro. Tendrán los mismos derechos y obligaciones que un miembro ordinario. Miembro de honor: Lo serán aquellas personas o entidades que por los méritos que en ellas concurran, sean designadas como tales miembros de honor por la Asamblea General, a propuesta de la Junta de Gobierno, o de al menos veinte miembros. El acuerdo por el que se designe algún miembro de honor, deberá ser adoptado por dos tercios de los asistentes a la Asamblea General. Los Miembros de honor podrán participar en las actividades realizadas por la Asociación y estarán exentos de pagar cualquier tipo de cuota social.

Artículo 6°: Son derechos de los miembros ordinarios y colectivos:

a) Participar en las actividades que organice la Asociación,
b) Asistir con voz y voto a las Asambleas Generales,
c) Ser nombrado miembro de cualquier órgano de gobierno de la Asociación, en la forma prevista en estos Estatutos,

d) Formar parte de las comisiones, comités y grupos de trabajo,
e) Recibir las publicaciones y revistas que la Asociación pueda publicar,
f) Proponer a la Junta de Gobierno la realización de las actividades que consideren convenientes para la mejor consecución del fin de la Asociación,
g) Ser informados de la composición de los órganos de gobierno y representación de la Asociación, de su estado de cuentas y del desarrollo de su actividad, e
h) Impugnar los acuerdos de los órganos de gobierno de la Asociación que estime contrarios a la Ley o a los Estatutos.

Artículo 7°: Son deberes de los miembros ordinarios y colectivos:
a) Observar y cumplir los presentes Estatutos y los acuerdos válidamente adoptados por los órganos de gobierno de la Asociación,
b) Abonar las cuotas que se determinen,
c) Colaborar al mayor éxito y difusión de la Asociación y de las actividades por ella organizadas, y
d) Desempeñar fielmente las obligaciones inherentes al cargo que desempeñen, así como ejecutar debidamente las responsabilidades concretas que se les encomienden.

Artículo 8°: Los miembros perderán dicha condición en la Asociación por las siguientes causas: a) A petición propia. b) Por impago de tres cuotas consecutivas o alternas. c) Por decisión de la Asamblea General, a propuesta de la Junta de Gobierno, que adoptará su decisión previo expediente resuelto por una Comisión disciplinaria nombrada al efecto por la Junta del Gobierno, y en todo caso, con audiencia del interesado.

Capítulo Tercero.- Los Órganos de la Asociación.

Artículo 9°: Los Órganos de gobierno de la Asociación son:
a) La Asamblea General.
b) La Junta de Gobierno.

Título I - De la Asamblea General

Artículo 10°: La Asamblea General es el órgano supremo de la Asociación y estará compuesta por todos sus miembros.

Artículo 11°: La Asamblea General se reunirá necesariamente con carácter ordinario una vez al año, y con carácter extraordinario cuantas veces la convoque al efecto el Presidente a propuesta de la Junta de Gobierno, o cuando lo propongan por escrito el 20 por ciento de los miembros, con expresión concreta de los asuntos a tratar.

Artículo 12°: Las convocatorias de las Asambleas Generales, sean ordinarias o extraordinarias, serán hechas por escrito expresando el lugar, día y hora de la reunión así como el orden del día. Entre la convocatoria y el día señalado para la celebración de la Asamblea en primera convocatoria habrán de mediar al menos quince días, pudiendo así mismo hacerse constar si procediera la fecha en que se reunirá la Asamblea en segunda convocatoria.

Artículo 13°: Las Asambleas Generales, tanto ordinarias como extraordinarias, quedaran válidamente constituidas en primera convocatoria cuando concurran a ella la mayoría de los asociados, y en segunda convocatoria cualquiera que sea el número de asociados.

Artículo 14°: Corresponde a la Asamblea General:
a) Aprobar el plan de actuación y las cuentas anuales. Fijar las cuotas ordinarias y extraordinarias. Aprobar la gestión de la Junta de Gobierno,
b) Elegir y cesar a los miembros de la Junta de Gobierno, en la forma prevista en los presentes Estatutos,
c) Cesar a los socios, a propuesta de la Junta de Gobierno,
d) Acordar la promoción o integración en una Federación de asociaciones,
e) Acordar la modificación de los Estatutos,
f) Acordar la disolución de la Asociación,
g) Decidir sobre todos los asuntos que someta a su consideración la Junta de Gobierno, y
h) Decidir sobre cualesquiera otros asuntos que la legislación vigente le atribuya expresamente.

Los acuerdos de la Asamblea General ordinaria se adoptarán –según el principio de democracia interna- por mayoría de votos de los miembros presentes o representados.

Los acuerdos comprendidos en los apartados d), e), y f) deberán ser adoptados en Asamblea General extraordinaria, convocada al efecto, con el voto favorable de las dos terceras partes de los miembros presentes o representados.

Título II - De la Junta de Gobierno

Artículo 15°: La Junta de Gobierno es el órgano de representación, al cual compete gestionar y representar los intereses de la Asociación, de acuerdo con las disposiciones y directivas de la Asamblea General. La Junta de Gobierno estará formada por un Presidente, dos Vicepresidentes, un Secretario, un Tesorero y un máximo de diez vocales. Todos los cargos que componen la Junta de Gobierno serán no remunerados y serán designados por la Asamblea General. Su mandato tendrá una duración de cuatro años, pudiendo ser reelegidos por sucesivos mandatos. La renovación de la Junta de Gobierno se hará alternativamente en dos mitades: el Presidente, un Vicepresidente y el Secretario pertenecerán a una mitad y el otro Vicepresidente y el Tesorero a la otra. Las candidaturas para la renovación de la Junta de Gobierno podrán ser propuestas por diez o quince de los miembros de la Asociación, según que el número de estos sea inferior o superior a cien, respectivamente, y por la propia Junta de Gobierno.

Artículo 16°: La Junta de Gobierno se reunirá cuantas veces lo determine su Presidente, a iniciativa propia o a petición de tres de sus miembros. Quedará constituida cuando asista la mitad más uno de sus miembros, y para que sus acuerdos sean válidos deberán ser tomados por mayoría de votos de los asistentes. En caso de empate, el voto del Presidente será de calidad.

Artículo 17°: Son facultades de la Junta de Gobierno:

a) Ostentar la representación de la Asociación en toda clase de relaciones, actos y contratos, ante toda clase de personas y entidades públicas o privadas.
b) Ejercer, en general, todas las facultades relativas a la adquisición –onerosa o gratuita, "intervivos" o "mortis causa"- gestión, administración, enajenación –onerosa o gratuita- y gravamen de todos los bienes que integran el patrimonio de la Asociación.
c) Resolver sobre la admisión de nuevos miembros, así como la expulsión provisional de un miembro, hasta que no se resuelva definitivamente en la correspondiente Asamblea General.
d) Organizar y dirigir el funcionamiento interno y externo de la Asociación, así como establecer los reglamentos internos de todo tipo que considere conveniente.
e) Convocar las reuniones de la Asamblea General y determinar el Orden del día.
f) Elaborar los planes de actuación y las cuentas anuales, así como determinar las cuotas ordinarias y extraordinarias, y proponer su aprobación a la Asamblea General.
g) Delegar alguna o algunas facultades en uno o varios de sus miembros, constituyendo en este último caso un Comité ejecutivo; así como otorgar poderes generales o especiales a las personas que estime conveniente.
h) Ejercer todas las demás funciones que no se atribuyen expresamente en estos Estatutos a la Asamblea General.

Artículo 18°: El Presidente representará legalmente a la Asociación ante toda clase de organismos públicos o privados; convocará, presidirá y levantará las sesiones que celebre la Asamblea General y la Junta de Gobierno; dirigirá las deliberaciones de una y otra; autorizará con su firma los documentos, actas y correspondencia; adoptará cualquier medida urgente que la buena marcha de la Asociación aconseje o que para el desarrollo de sus actividades resulte necesaria o conveniente, sin perjuicio de dar cuenta posteriormente a la Junta de Gobierno.

Artículo 19°: Un Vicepresidente, por orden de antigüedad sustituirá al Presidente en ausencia de éste, ya por enfermedad o por otra causa, y tendrá las mismas atribuciones que él.

Artículo 20°: El Secretario tendrá a su cargo la dirección de los trabajos puramente administrativos de la Asociación; expedirá certificaciones; llevará los ficheros y custodiará la documentación de la Sociedad.

Artículo 21°: El Tesorero será el responsable de preparar el presupuesto, de recaudar y custodiar los fondos pertenecientes a la Asociación y de dar cumplimiento a las órdenes de pago que expida el Presidente.

Artículo 22°: La Asociación dispondrá de los libros y registros contables previstos en la Ley Orgánica 1/2002, de 22 de marzo, reguladora del Derecho de Asociación y sus disposiciones complementarias, y llevará su contabilidad conforme a las normas específicas que resulten de aplicación en razón a las actividades que realice en el cumplimiento de sus fines específicos. Los miembros podrán acceder a la documentación social a través de la Junta de Gobierno, en los términos previstos en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal.

Capítulo Cuarto.- Recursos Económicos.

Artículo 23°: Los recursos económicos previstos para el desarrollo de los fines y actividades de la sociedad serán los siguientes:

a) Las cuotas de entrada, periódicas o extraordinarias.
b) Las subvenciones, donaciones, legados y herencias que pudiera recibir de forma legal por parte de los asociados, de empresas colaboradoras o de terceras personas.
c) Cualquier otro recurso lícito.

Artículo 24°: La Asociación carece de Patrimonio Fundacional. El ejercicio económico comenzará el día 1 de julio y se cerrará el 30 de junio del año siguiente. Cada año, dentro de los seis primeros meses del ejercicio, la Junta de Gobierno remitirá a la Asamblea General las cuentas anuales para su aprobación.

Capítulo Quinto.- Disolución.

Artículo 25°: La Asociación se disolverá, bien por acuerdo adoptado por las dos terceras partes de los socios que, presentes o representados, asistan a la reunión extraordinaria de la Asamblea General que al efecto se convoque bien cuando concurra alguna de las causas establecidas en el artículo 39 del Código Civil, así como por sentencia judicial.

Artículo 26°: En caso de acordarse la disolución de la Asociación, se nombrará por la Asamblea General en la reunión en que se haya acordado la disolución, una Comisión Liquidadora que una vez liquidadas las deudas, si existiese un saldo líquido favorable, lo destine a las entidades que, teniendo como objeto la persecución de fines de interés general análogos, hubiese designado la Asamblea General al adoptar el acuerdo de disolución.

DILIGENCIA:

El presente texto de los Estatutos de la ASOCIACIÓN SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES ha quedado redactado con la inclusión de las modificaciones acordadas para adaptarlos a la Ley Orgánica 1/2002, de 22 de marzo, reguladora del Derecho de Asociación, aprobadas en la reunión extraordinaria de la Asamblea General celebrada al efecto el día 6 de octubre de 2004.

NUEVOS SOCIOS

Enriqueta Anticó Daró
Departamento de Química, Facultad de Ciencias
Universidad de Girona
Campus Motilivi s/n
17071 GIRONA

INFORMACIONES

CONGRESOS CELEBRADOS

20th International Symposium on Microscale Bioseparations (formerly HPCE conference series)

Amsterdam (Holanda), 22 - 26 enero de 2006

La vigésima edición del International Symposium on Microscale Bioseparations, organizado por la Royal Dutch Chemical Society, se celebró en el RAI Congress Centre de Amsterdam (Holanda) entre el 22 y el 26 de enero de 2006, siendo ésta la segunda vez que este Congreso ha sido acogido en la ciudad de Amsterdam (también se celebró allí en 1992). El comité organizador estuvo presidido por el Dr. G. Rozing de Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania. El comité científico estuvo formado por investigadores de reconocido prestigio internacional procedentes de diversos países.

Previamente a la inauguración del congreso se ofrecieron 2 breves cursos y 6 sesiones de trabajo en diferentes campos de las técnicas de separación. Después de la ceremonia de apertura, a cargo del presidente del comité organizador, se presentaron dos conferencias plenarias tituladas "Systems Biology: Simbiosis between analytical sciences, biostatistics and biology" a cargo de el Profesor J. van der Greef (Zeist and Leiden University, Holanda) y "Post-genomic systems integration as an opportunity to build better drugs" ofrecida por el Profesor I. Humphery-Smith (Biosystem Informatics Institute, Reino Unido). Estas dos conferencias plenarias se complementaron con otras 8 que versaron sobre "Bioseparaciones en microescala", "Microfluidos" y "Proteómica". Además de estas 10 conferencias plenarias, se presentaron 73 comunicaciones orales y 197 comunicaciones en cartel, de forma que se realizaron un total de 280 presentaciones en las que se abordaron temas diversos englobados bajo los títulos:

- Desarrollos en bioseparaciones a escala micro
- Fundamentos de las bioseparaciones a escala micro
- Proteómica
- Tecnología de columnas y fases estacionarias
- Metabolómica
- Microfluidos
- Análisis farmacéutico
- Nuevas técnicas instrumentales
- Diagnóstico clínico
- Análisis de biopolímeros
- Biomarcadores
- Últimos desarrollos y perspectivas de futuro en bioseparaciones a escala micro
- Análisis en células
- Acoplamiento de métodos de separación a escala micro con espectrometría de masas

En términos de participación, el Congreso contó con 390 participantes de 33 países. La participación española estuvo a cargo de las Universidades de Alcalá, Barcelona, Granada, Santiago de Compostela y Valencia, entre las cuales presentaron un total de 15 comunicaciones.

Otros puntos a destacar del congreso son: las exposiciones comerciales donde participaron diferentes empresas, algunas de las cuales ofrecieron diversos seminarios; la oportunidad ofrecida a jóvenes investigadores de presentar diariamente sus trabajos en sesiones científicas; y las mesas de discusión que permitían un amplio debate de las comunicaciones presentadas. Asimismo, se ofrecieron distintas recepciones, patrocinadas por las casas comerciales y por la ciudad de Amsterdam.

Finalmente, el Congreso fue clausurado a mediodía del jueves 26 de enero por el Dr. G. Rozing, que agradeció la asistencia a todos los participantes. Los Profesores R. Kennedy y A. Manz llevaron a cabo la presentación de las dos próximas ediciones del Congreso que se celebrarán en el 2007 en Vancouver (Canadá) y en 2008 en Berlín (Alemania).

20th International Symposium on Microscale Bioseparations (formerly HPCE conference series)

Amsterdam (The Netherlands), January 22 - 26, 2006

The 20th edition of the International Symposium on Microscale Bioseparations organized by the Royal Dutch Chemical Society took place in the RAI Congress Centre, Amsterdam (The Netherlands) from the 22nd to the 26th January, 2006. This was the second time that this symposium was held in Amsterdam (first time was in 1992). The president of the organizing committee was Dr. G. Rozing from Agilent Technologies, Waldbronn, Germany. Internationally well known researchers from several countries were part of the scientific committee.

Previously to the symposium, two short courses and six workshops in different separation fields were offered. After the Opening Ceremony by the president of the organizing committee, two plenary sessions were presented: "Systems Biology: Simbiosis betwe-en analytical sciences, biostatistics and biology" by Professor J. van der Greef (Zeist and Leiden University, The Netherlands) and "Post-genomic systems integration as an opportunity to build better drugs" offered by Professor I. Humphery-Smith (Biosystem Informatics Institute, United Kingdom). These plenary sessions were complemented with eight more dealing with "Microscale Bioseparation", "Microfluidics", and "Proteomics" In addition to these 10 plenary sessions, 73 oral communications and 197 posters were presented, so 280 communications were offered about different subjects:

- Developments in microscale bioseparation
- Fundamentals of microscale bioseparation
- Proteomics
- Stationary phases and column technologies
- Metabolomics
- Microfluidics
- Pharmaceutical analysis
- Novel instrumental techniques
- Clinical diagnostics
- Biopolymer analysis
- Biomarker discovery
- Latest developments in and futures perspectives of microscale bioseparations
- Single cell analysis
- Hyphenation of microscale separation methods with MS

390 participants from 33 countries took part in the Congress. Spanish participation consisted of the presentation of a total of 15 communications by researchers form the Universities of Alcalá, Barcelona, Granada, Santiago de Compostela, and Valencia.

Some other interesting points to be mentioned were the Technical Exhibition with the participation of different companies, some of which offered several seminars, the opportunity to young scientists to present daily their works in regular sessions, and the celebration of discussion tables to debate the communications. Several receptions sponsored by different companies and the city of Amsterdam were also offered.

The symposium was closed at noon of Thursday 26th January by Dr. G. Rozing who acknowledged the attendance of the participants. Professors R. Kennedy and A. Manz were in charge of the introduction of the next two symposiums that will be held in Vancouver (Canada) in 2007 and in Berlin (Germany) in 2008.

María Castro Puyana
Departamento de Química Analítica
Facultad de Química (Universidad de Alcalá)

8th International Symposium on Advances in Extraction Techniques 2006

York (Reino Unido), 6 - 8 febrero de 2006

La octava edición del Symposium on Advances in Extraction Techniques (Extech, 2006), celebrada entre el 6 y el 8 de febrero de 2006 en York (Reino Unido), fue organizada por la Royal Flemish Chemical Society (Belgium) bajo la presidencia del Dr. Robert Smits. El comité científico contó con 5 investigadores de reconocido prestigio internacional.

Al tratarse del principal congreso dedicado a las nuevas técnicas de extracción para análisis químico y bioquímico, tanto en laboratorio como in-situ, despertó un gran interés, lo que se tradujo en un elevado índice de participación.

Simultáneamente al desarrollo de este congreso tuvo lugar el Symposium on Hyphenated Techniques, siendo compatibles inscripción y asistencia a las sesiones de ambos congresos. Además, se llevaron a cabo paralelamente varios cursos específicos sobre temas relacionados, como los dedicados a aplicaciones de la microextracción en fase sólida (SPME), de nuevas tendencias en extracción en fase sólida de muestras líquidas de origen biológico o ambiental y de técnicas de preparación de muestras sólidas.

Los profesores Graham Mills y John Dean, miembros del comité científico, inauguraron el congreso con una breve presentación sobre los contenidos generales del mismo. El congreso se enfocó en las técnicas de preparación de muestras sin disolventes, incluyendo métodos para enriquecimiento rápido y selectivo previo al análisis y técnicas de microextracción. Se prestó especial atención al conocimiento fundamental de los procesos de extracción para obtener una mayor selectividad y rendimiento en el desarrollo de métodos, y a la racionalización en la selección del método para aplicaciones específicas.

El programa científico estuvo compuesto por 45 comunicaciones orales, en las que se prestó especial

atención al uso de polímeros de impresión molecular, de materiales absorbentes biológicamente modificados, y nuevos recubrimientos en general.

Se presentaron 230 comunicaciones escritas en forma de póster en 2 sesiones a lo largo del congreso, la mayoría dedicadas a aplicaciones concretas de las distintas técnicas. Destacó el gran número de aplicaciones de SPME, SPE, extracción acelerada con disolventes (ASE, PLE), extracción con membranas etc. También hubo un importante número de carteles dedicados a la implantación de nuevas técnicas.

Para terminar las jornadas de los días 6 y 7 de febrero tuvieron lugar 2 mesas redondas, la primera sobre la función de los materiales de referencia certificados en la extracción de muestra y la segunda acerca de la terminología usada en técnicas de extracción.

Alrededor de 30 casas comerciales colaboraron en este congreso, en el que mostraron sus productos y novedades. Además se llevaron a cabo varios seminarios por parte de Supelco, Dionex, Agilent, Thermo Electron, Shimadzu, Applied Biosystems and Waters.

El congreso fue clausurado el 8 de febrero y los asistentes convocados a participar en la próxima edición, Extech 2007, que tendrá lugar en Alesund, (Noruega) del 3 al 7 de junio de 2007.

8th International Symposium on Advances in Extraction Techniques 2006

York (United Kindom), February 6th - 8th, 2006

The 8th edition of the Symposium on Advances in Extraction Techniques (Extech, 2006), celebrated between 6th and 8th of February, 2006 in York (United Kindom), was organized by the Royal Flemish Chemical Society (Belgium) and chaired by Dr. Robert Smits. Five researchers of recognized international prestige were selected fot the scientific committee.

Since it is considered to be the main conference of new extraction technologies for chemical and biochemical analysis, in laboratory and in situ, it aroused a great interest, which resulted in a high participation index.

The Symposium on Hyphenated Techniques took place simultaneously being both registration and assistance to sessions compatible with the other event. Moreover, several specific courses were carried out in parallel, including courses on applications of solid phase microextraction, recent trends in solid-phase extraction of liquid biological or environmental samples and solid sample preparation techniques.

Professors Graham Mills and John Dean, members of the scientific committee, inaugurated the congress with a brief presentation about general contents. Solvent-free sample preparation including methods for rapid and selective enrichment prior to analysis and micro-sample preparation were the main focus of the conference. A great emphasis was placed on the basic understanding of extraction processes to obtain higher selectivity and efficiency in method development, and on a rationalisation of their selection for specific applications.

The scientific program was divided in 45 oral communications, which were especially devoted to the use of molecular imprinted polymers, biologically modified sorbents, novel coatings and sorbent materials.

230 posters were presented in 2 sessions along the congress, most of them dealt with specific applications. A great number of applications of SPME, SPE, accelerated solvent extraction (ASE, PLE), membrane assisted extraction, etc. were exhibited, as well as an important number of posters about the development of new techniques.

The closing sessions of Monday, 6th and Tuesday, 7th of February consisted of 2 discussion panels about the role of certified reference materials in sample extraction and terminology in sample extraction, respectively.

Approximately 30 sponsors cooperated in this congress and exhibited their products. Several Product seminars were organized by Supelco, Dionex, Agilent, Thermo Electron, Shimadzu, Applied Biosystems and Waters.

This symposium was closed on February 8th with a call for participation in the next edition, Extech 2007, which will be held in Alesund (Norway) between 3rd and 7th of June, 2007.

Esther de la Fuente García
Dpto. Análisis Instrumental y Química. Ambiental
Instituto de Química Orgánica General (CSIC)

INFORMACIÓN BIBLIOGRÁFICA

ARTÍCULOS DE INTERÉS

El gran interés actual en la obtención de carbohidratos que posean efectos beneficiosos para la salud humana, ha conducido al desarrollo de técnicas para su fraccionamiento y purificación, necesarias para su posterior caracterización y análisis por métodos cromatográficos y espectroscópicos.

Se han empleado técnicas tradicionales como columnas de adsorción de celita, carbón activo y columnas de exclusión molecular, técnicas basadas en la selectividad de las levaduras, y métodos de ultra- y nanofiltración. A continuación se revisan algunos artículos de interés en este campo:

"A simple method for fractionating debranched starch using a solid reversed-phase cartridge" Kanefumi Kitahara and Les Copeland. Journal of Cereal Science (2004) 39, 91-98.

En este trabajo se estudian las interacciones entre las moléculas de almidón y los cartuchos de fase sólida inversa C_8 y C_{18}. La amilosa y la amilopectina se adsorbieron en ambos cartuchos, siendo la adsorción en C_{18} tres veces mayor que en C_8. Asimismo, la adsorción de amilopectina fue superior a la de amilosa por tratarse de una molécula mayor y por tanto disponer de más grupos funcionales. La recuperación de amilosa y amilopectina de los cartuchos en fase sólida fue sólo parcial. Se ensayaron diversos disolventes, siendo el más eficaz 10% de metanol en agua. La glucosa y la maltosa no se adsorbieron en el cartucho C_{18}, mientras que (1-4)-a-glucanos se adsorbieron completamente: el cartucho C_8 presentó sin embargo una menor adsorción. La recuperación de estos glucanos del cartucho C_{18} empleando 10% metanol disminuyó al aumentar el grado de polimerización (DP) del glucano. Este resultado sugiere que el empleo de dicho cartucho permite fraccionar los (1-4)-a-glucanos en función del peso molecular.

Una solución de almidón de maiz sin ramificar se pasó a través del cartucho C_{18} y se eluyó con disoluciones de metanol del 0 al 10%. Las fracciones de menor peso molecular se obtuvieron con metanol 3%, mientras que el peso molecular de las fracciones recuperadas fue aumentando a medida que se incrementaba la proporción de metanol, obteniéndose las fracciones de mayor DP con metanol 10%.

Se trata en resumen de un método nuevo, simple y rápido para el fraccionamiento de almidón sin ramificar empleando cartuchos de fase sólida inversa.

"Purification of oligosaccharides by nanofiltration" Athanasios K. Goulas, Petros G. Kapasakalidis, Hyadn R. Sinclair, Robert A. Rastall and Alistair S. Grandison. Journal of Membrane Science (2002) 209, 321-335.

La evaluación de la posible aplicación de un proceso de nanofiltración en flujo cruzado a la purificación de oligosacáridos (sistema modelo y mezcla de galacto-oligosacáridos comerciales) es el objetivo central de este estudio. Para tal fin los autores emplean un sistema de filtración por diversas membranas en circuito cerrado, estudiando así los parámetros que influirán en la separación de los azúcares como presión, concentración de muestra y temperatura de filtración. El factor de rechazo de los azúcares presentes en la disolución aumenta al aumentar la presión debido a un incremento del flujo y a la compactación de las membranas, siendo este efecto mayor para los azúcares de menor peso molecular en la disolución. El aumento de la concentración de azúcares totales iniciales causa una disminución del factor de rechazo.

El proceso de purificación de los carbohidratos se llevó a cabo mediante diafiltración en continuo empleando las membranas NF-CA-50 y DS-5-DL, que habían mostrado buenos resultados en los experimentos anteriores para la separación de los monosacáridos. Se obtuvieron rendimientos de 14-18% para monosacáridos, 59-89% para disacáridos y de 81-98% para trisacáridos (oligosacáridos).

Este estudio indica que la nanofiltración en flujo cruzado puede emplearse para el fraccionamiento y la purificación de oligosacáridos a partir de mezclas que también contienen monosacáridos.

"Specifity of yeast (Saccharomyces cerevisiae) in removing carbohydrates by fermentation" Seung-Heon Yoon, Rupendra Mukerjea, John F. Robyt. Carbohydrate Research (2003) 338, 1127-1132.

Los autores ponen de manifiesto en este trabajo la alta selectividad de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*

en la eliminación de carbohidratos mediante procesos de fermentación, empleando levaduras inmovilizadas que se aplican a un gran número de carbohidratos.

Ciertos monosacáridos comunes como D-glucosa, D-fructosa, D-manosa y D-galactosa, se eliminan por completo en la fermentación, mientras que el ácido D-glucurónico y la D-ribosa lo hacen parcialmente y la D-xilosa, D-ramnosa y L-sorbosa resisten sin cambios la acción de las levaduras. De cuatro glicósidos, metil y fenil a y b-D-glucopiranósidos, tres se eliminaron en parte y el metil b-D-glucopiranósido no fue eliminado.

En cuanto a los disacáridos, la maltosa, la sacarosa y la turanosa se eliminan por completo, mientras que la celobiosa, lactosa y melibiosa fueron resistentes. Trisacáridos como maltotriosa y rafinosa se eliminan en parte, pero la isomaltotriosa y la melezitosa y tetrasacáridos como la maltotetraosa, la isomaltotetraosa y la acarbosa no fueron afectados. Además, el trabajo comprueba que las enzimas de las levaduras no alteran ninguno de los carbohidratos resistentes mediante reacciones de transgicosilación, condensación o cualquier otro tipo de reacción.

El interés de este trabajo desde un punto de vista analítico es la aplicación de esta selectividad en el fraccionamiento o enriquecimiento de mezclas complejas de carbohidratos, como paso previo a su posterior análisis.

M. Luz Sanz
Instituto de Química Orgánica (CSIC)

RESEÑA DE LIBROS

Understanding NMR Spectroscopy
James KEELER
John Wiley & Sons Ltd (The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England) 2005.
(ISBN: 0-470-01787-2)

La espectroscopía de RMN es una poderosa y, en principio, compleja herramienta analítica. Actualmente, la técnica está tan automatizada que permite llevar a cabo un experimento con una mínima intervención del operario. La introducción de los parámetros y comandos precisos puede realizarse sin necesidad de tener un conocimiento profundo de cómo funciona la técnica. Del mismo modo, es posible aprender a interpretar los espectros obtenidos en poco tiempo.

Sin embargo, es necesario profundizar en los aspectos teóricos de una técnica desde el momento en que, solo desde el entendimiento de qué es lo que está pasando podremos emplear un método menos común, modificar un experimento para adaptarlo a una nueva situación o conocer las limitaciones de una técnica en particular.

Este libro va dirigido hacia personas familiarizadas con el uso de la técnica de RMN para la elucidación estructural de compuestos, que busquen profundizar en la comprensión de cómo funciona un experimento. Para ello no se enfrasca en los fundamentos y aspectos teóricos de la técnica en sí, sino que desarrolla las ideas e interpretaciones teóricas más útiles para entender los experimentos de RMN que se llevan a cabo en la actualidad.

El libro se limita a tratar la RMN de muestras líquidas y núcleos de 1H y 13C, en una y dos dimensiones.

Una lectura ordenada del libro permite al lector ir adquiriendo, capítulo a capítulo, las ideas y conceptos necesarios para profundizar en la comprensión de la técnica. Está dividido en 12 capítulos, que comienzan con un recordatorio del lenguaje de la técnica y continúa por desarrollar estas ideas e ir introduciendo las menos familiares.

Niveles de energía, modelo de vectores, secuencias de pulsos, efecto NOE, transformada de Fourier, operadores producto y experimentos bidimensionales son algunos de los temas desarrollados.

Se proponen una serie de ejercicios al final de cada tema, cuya realización permite al lector entender más claramente las ideas expuestas. Las soluciones a los ejercicios, así como las figuras que aparecen en el libro se encuentran disponibles on-line. En la página web también se puede encontrar una aproximación al contenido del libro en forma de 9 capítulos en donde se recogen las notas de las conferencias dadas por el autor en la Universidad de California, así como un enlace a su correo personal para resolver cualquier duda sobre el tema.

Es un libro indicado para formar pareja con algún otro que abarque los aspectos prácticos de la espectroscopía de RMN y su aplicación en las elucidaciones estructurales.

Irene Rodríguez-Meizoso
Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)

NOVEDADES TÉCNICAS

Agilent Technologies
Innovating the HP Way

AGILENT TECHNOLOGIES PRESENTA UN NUEVO SISTEMA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA, SUCESOR DEL LÍDER DEL MERCADO HPLC 1100

PALO ALTO, Calif., 23 de enero, 2006. Agilent Technologies Inc. (NYSE: A) presentó hoy el sistema HPLC Agilent Serie 1200 (cromatografía líquida de alta eficacia) que sustituye al líder del mercado HPLC Serie 1100. Utilizado por más de 250000 clientes en todo el mundo en aplicaciones desde forense a seguridad alimentaria, investigación farmacéutica o de proteínas, la HPLC es una tecnología de medida utilizada para separar, identificar, cuantificar y purificar compuestos. Representa un mercado de 2000 millones de dólares y es una de las fuentes más grandes de ingresos para la división de biociencia y análisis químico de Agilent.

Desde la presentación del instrumento de la Serie 1100 en 1995, Agilent ha vendido más de 400000 módulos o aproximadamente 60000 sistemas LC, convirtiéndolo en el HPLC más popular de la industria. Para proteger la inversión de sus clientes, Agilent ha diseñado el 1200 compatible con el 1100. Los clientes pueden combinar módulos nuevos y ya existentes y pueden continuar utilizando sus métodos sin tener que volver a recurrir al costoso desarrollo, revalidación o reentrenamiento de sus empleados. Agilent incluso ofrece un Modo de Emula-ción 1100 para los clientes que utilizan software no-Agilent, hasta que aparezcan actualizaciones de estos.

El Agilent 1200 es el LC más completo actualmente disponible. Con más de 60 módulos, puede configurarse para todas las principales aplicaciones HPLC, incluyendo un nuevo formato de rápida resolución, además de preparativa, estándar, narrow, capilar, nanoflujo y la revolucionaria cromatografía líquida basada en chip de Agilent. Ahora puede disponer de HPLC-Chips para aplicar esta tecnología tanto a moléculas pequeñas como grandes, para separación cromatográfica o sólo para infusión de muestras. La tecnología HPLC-Chip/MS de nanospray puede proporcionar al usuario una mejora de sensibilidad de más de 1000 veces respecto a la LC/MS convencional.

El Sistema de Resolución Rápida Agilent 1200

El nuevo Sistema de Resolución Rápida 1200 ofrece análisis hasta 20 veces más rápidos y con un 60% de mayor resolución que la LC convencional, haciéndolo dos veces más rápido y tres veces más preciso que los mejores sistemas de la competencia. El sistema puede también ejecutar cualquier método LC tradicional, convirtiéndolo en el LC más flexible del mercado. Además, una configuración especial de alto rendimiento del sistema de Resolución Rápida 1200, permite la ejecución secuencial de más de 2000 muestras diarias en un solo sistema, sin perder calidad de datos o flexibilidad del método.

El sistema incluye más de 70 columnas de Resolución Rápida y Alto Rendimiento (RRHT) y una nueva bomba de alta eficacia que puede manejar flujos en el rango 0.05-5 ml/min y hasta 600 bar de presión. También incluye un nuevo desgasificador de alto rendimiento, inyector automático, compartimento de columna y detectores UV y MS. El sistema puede optimizarse para la más alta velocidad y resolución, tanto con detección UV como MS.

"El sistema de Resolución Rápida Agilent 1200 ha sido diseñado para desarrollar la mejor velocidad y resolución de la industria, sin aumentar drásticamente la presión," indicó Fred Strohmeier, director general del análisis en fase líquida de la división de biociencia y análisis químico de Agilent. "Optimiza el rendimiento al mismo tiempo que minimiza los riesgos de que una presión elevada pueda afectar a la fiabilidad y la duración del instrumento, así como el riesgo de cambios en las propiedades físicas y químicas de los compuestos. En resumen, proporciona a los clientes un vía segura de aumentar la productividad del laboratorio."

Nuevas Columnas ZORBAX RRHT de 1.8 Micras

Tras el éxito de las columnas de resolución rápida y alto rendimiento (RRHT) de 400 bar, Agilent presenta las columnas de rango extendido RRHT. Estas permiten velocidades de flujo más rápidas, mayores presiones y eficiencias más altas. El diámetro interno de las columnas RRHT varía de 1 mm a 4.6 mm y la longitud, de 20 a 150 mm, y pueden presentar más de seis fases ligadas con tamaños de partícula de 5, 3.5 y 1.8 micras.

Incluyen:

- ZORBAX Eclipse XDB (C8 y C18), fase ligada de propósito general para uso hasta 60 C.

- ZORBAX StableBond (C18, C8 y CN), buena para aplicaciones de bajo pH y alta temperatura para análisis más rápidos; resistente hasta temperatura de 90 C.

- ZORBAX Extend (C18), para pH elevado, hasta pH 11.5. Resistente hasta temperatura de 60 C.

El 1200: Un Enfoque Completo para el Rendimiento

El Agilent 1200 incluye mejoras en el diseño, fabricación, software y servicios asociados, para propocionar ganancias tangibles en rendimiento, facilidad de uso y tiempo de actividad. Las especificaciones del sistema dependen de la configuración completa adquirida, pero todas ellas tienen las ventajas de facilidad de uso y fiabilidad, que incluyen:

- Un nuevo controlador del sistema, 1200 Instant Pilot, con un visor en color altamente intuitivo y personalizable. Permite a los clientes monitorizar instantáneamente el estado del sistema, fijar parámetros para los métodos, además de realizar diagnósticos básicos.

- Nuevos softwares ChemStation y EZChrom de Agilent que proporionan mejor control del instrumento además de análisis, revisión y recuperación más rápidos de los datos. Los usuarios pueden ahora revisar rápidamente cientos de cromatogramas.

- Nueva función de diagnósticos para el instrumento independiente del sistema de datos que permite reducir el mantenimiento y el esfuerzo necesario para el diagnóstico.

- Mejores servicios que incluyen un botón "pulsar para obtener ayuda" Con sólo pulsar el ratón, todos los detalles de la configuración del instrumento, registros recientes e información de contacto del usuario, se transmiten bajo conexión segura al servicio de atención al cliente de Agilent. De este modo se reduce el tiempo que el usuario debe dedicar al diagnóstico y máximiza el tiempo de actividad del instrumento.

Agilent ofrece más de 900 columnas LC para la Serie 1200, con una gama de 0.075 a 50 mm de diámetro interno, 15 a 300 mm de longitud y 1.8 a 10 micras de tamaño de partícula. Ya están disponibles más de 65 fases ligadas, además de columnas especiales para aplicaciones.

Por favor, contacte con un representante de ventas de Agilent, el Servicio de Atención al Cliente (teléfono 901 11 68 90) o visite www.agilent.com/chem/1200pr.

AGILENT TECHNOLOGIES PRESENTA UNA NUEVA LÍNEA DE PRODUCTOS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS, ESPERANDO DOBLAR SU CUOTA DE MERCADO EN LC/MS

PALO ALTO, California, 30 de enero, 2006. Agilent Technologies Inc. (NYSE: A) ha anunciado hoy la presentación de un conjunto completo de sistemas de espectrometría de masas con base cromatográfica (LC/MS), que se espera prácticamente doblen su cuota de mercado en LC/MS antes de 2008. El objetivo es que los nuevos LC/MS Agilent Serie 6000 establezcan un nuevo estándar en la relación precio-rendimiento, fiabilidad y facilidad de uso, que transformarán la productividad del laboratorio.

La Serie Agilent 6000 incluirá cinco clases de instrumentos, entre los que se encuentran los primeros espectrómetros de masas de triple cuadrupolo (QQQ) y cuadrupolo de tiempo de vuelo (Q-TOF) de la compañía. Con estos nuevos equipos, Agilent podrá acaparar cerca del 70% de los 1300 millones de dólares del mercado de instrumentos LC/MS, doblando sus oportunidades actuales de mercado. La Serie 6000, también incluye versiones perfeccionadas de espectrómetros de masas de cuadrupolo simple, trampa de iones y tiempo de vuelo (TOF) de Agilent.

El Triple Cuadrupolo Agilent 6410 ofrece una sensibilidad a nivel de femtogramos, comparable a los instrumentos más costosos de esta clase, además de la fiabilidad de Agilent y un precio del 30 al 50% más bajo. Se utiliza principalmente para aplicaciones medioambientales, de seguridad alimentaria, forenses y farmacéuticas.

El Q-TOF Agilent 6510 proporciona un rendimiento analítico superior comparado con los instrumentos Q-TOF de más alto rendimiento y mayor coste. Ofrece al mismo tiempo una sensibilidad a nivel de atomoles, una exactitud de masas de rutina mejor de 3 ppm, y 3.5 órdenes de magnitud de rango dinámico en espectros. Permite una adquisición rápida de datos de 20 espectros/segundo o 1 MS y 5 MS/MS por segundo en modo dependiente de datos. Se espera que el Q-TOF de Agilent se convierta en el nuevo instrumento seleccionado por los laboratorios de proteómica.

Scharlab
THE LAB SOURCING GROUP

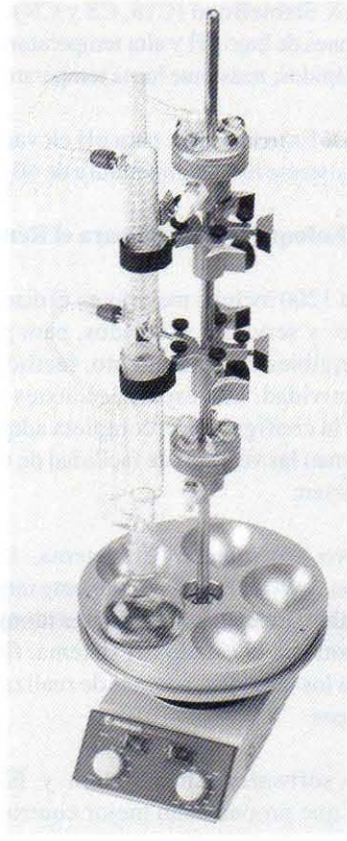
StarFish:
NUEVA ESTACIÓN DE TRABAJO DE RADLEYS AGITACIÓN, CALEFACCIÓN, SÍNTESIS, EXTRACCIÓN, CONCENTRACIÓN, DESTILACIÓN, DIGESTIÓN...

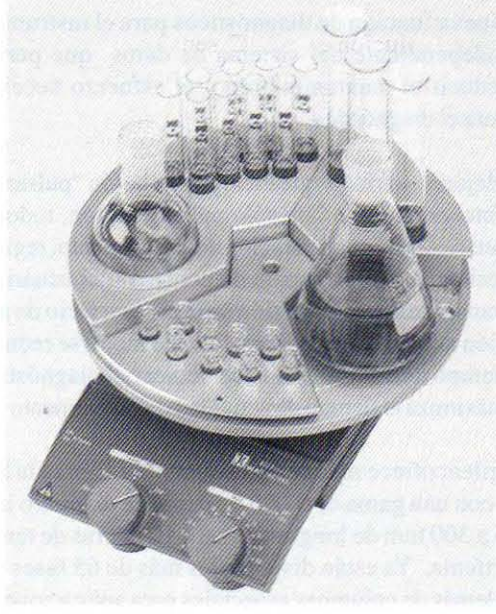
Con este nuevo sistema de Radleys, podrá calentar y agitar usando reactores y placas de agitación ya existentes en el laboratorio. Es un sistema muy versátil.
Su diseño modular acepta matraces de fondo redondo, tubos de ensayo y viales y puede ser usado con las marcas de placas de agitación más comunes. Permite agitar y calentar al mismo tiempo el contenido de diferentes tipos de reactores con la opción de un sistema de pinza que sostiene piezas de vidrio como refrigerantes o soxhlets. Ahorre espacio, tiempo y dinero con StarFish.

- Olvídese de los peligrosos baños de aceite
- Para matraces de: 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 250 ml
- Para tubos de: 12,16, 24 y 25 mm ø
- Para viales de: 12, 15, 17 y 21 mm ø
- Y para lo que Ud. quiera, ¡díganos las dimensiones de su recipiente! ¡Hacemos bloques a medida!

El sistema SPS es flexible y permite albergar columnas para la purificación simultánea de 2 a 7 disolventes distintos. Los más habituales son Éteres, THF, Hexanos, Diclorometano, Tolueno, Acetonitrilo, DMF y Metanol, pero no dude en consultarnos si desea purificar algún otro producto.

Para más información contacte con:
Scharlab, S.L.
Tel: +34 902170692
Fax: +34 937152765
E-mail: cromato@scharlab.com
Web: www.scharlab.com

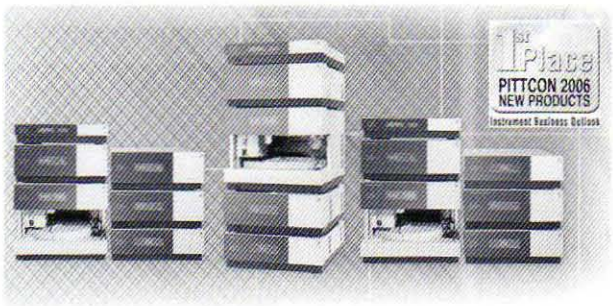




VERTEX
Technics S.L.

NUEVO HPLC DE DIONEX, EL ULTIMATE 3000: SOLUCIONES ÓPTIMAS PARA APLICACIONES LC.

Con más de 30 años de liderazgo en cromatografía, Dionex establece un nuevo referente dentro del rendimiento en HPLC con la nueva serie LC y LC/MS Ultimate 3000. Dionex nuevamente incrementa la productividad... consigue el equilibrio entre rendimiento, seguridad y facilidad de uso.



Mejor resolución en HPLC, sensibilidad, velocidad, precisión y seguridad. Se amplifica el análisis hasta un 100% trabajando en modo tandem o paralelo. La preparación de muestra se automatice usando la extracción en fase sólida en línea. Ultimate 3000 da soluciones óptimas para las aplicaciones LC.

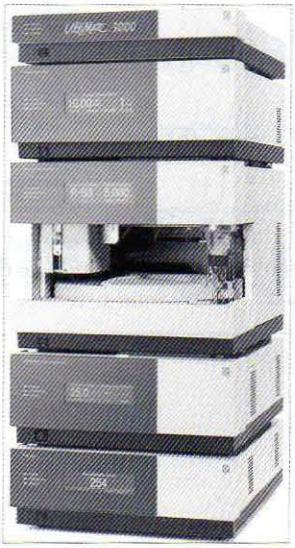
Soluciones Inteligentes

La nueva serie Ultimate 3000 opera en un gran rango dinámico de flujos, desde preparativo hasta micro para dar respuesta a aplicaciones como I+D o control de calidad. Con el nuevo Ultimate 3000 los usuarios tienen soluciones inteligentes para:

- Aumentar un 100% el análisis en métodos ya validados.
- Separaciones hasta 30 veces más rápido para nuevos métodos.
- Automatización de preparación de muestra.
- Mejoras en la selectividad y la resolución cromatográfica.
- El mayor nivel de versatilidad.

Rendimiento Óptimo para su aplicación

La diversidad de aplicaciones cromatográficas es inmensa. En un extremo las aplicaciones micro requieren la máxima sensibilidad y flujos precisos. En el otro extremo las purificaciones preparativas necesitan la máxima linealidad de los detectores, grandes flujos, inyecciones grandes y una precisa y robusta colección de fracciones. Ultimate 3000 soluciona esta gran diversidad de aplicaciones usando módulos intercambiables.



La tecnología SmartFlowTM garantiza siempre flujos exactos, precisos y libres de pulsaciones. En todos los casos la tecnología "dual-pump" asegura la mayor flexibilidad, eficiencia en la separación y productividad para su aplicación.

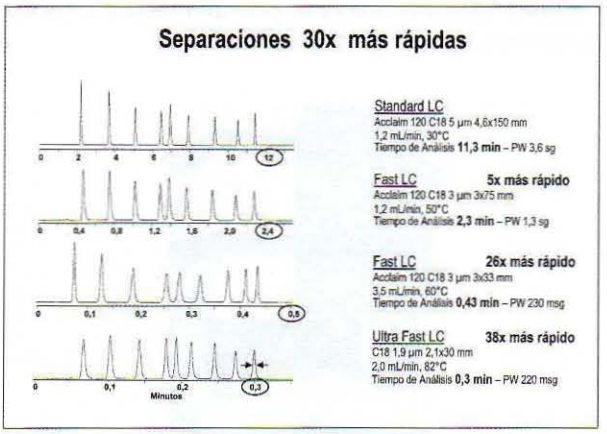
Confianza, una obligación en LC

Rendimiento sin confianza genera frustración. Sus muestras tienen que ser analizadas cada día sin interrupción. Dionex ha puesto el mayor esfuerzo en el diseño y fabricación de los componentes para asegurar su confianza, longevidad y calidad. Para cada módulo, indicadores predictivos del rendimiento identifican los fallos antes de que se produzcan. La cromatografía inteligente le permite evitar las interrupciones.

La cromatografía hecha fácil

Para hacer más trabajo en menos tiempo y requiriendo menos atención, Ultimate 3000 hace mucho más que automatizar el análisis de sus muestras. La cromatografía inteligente expende la facilidad de uso del sistema más allá de lo que era posible:

- El equilibrado y parada del equipo son tareas ahora del sistema, no del usuario.
- Nuevos asistentes reducen las configuraciones más complejas a unos sencillos pasos.
- El software monitoriza automáticamente todos los parámetros críticos y alerta al usuario de posibles errores.



Modelos Ultimate 3000

- Analítico (Binario o Cuaternario)
- Micro (Binario o Cuaternario)
- Semipreparativo
- Isocrático
- Dual Analitico (Binario o Ternario)
- Dual Micro (Binario o Ternario)
- Dual Semipreparativo (Sistema APS Autopurificación)

Contacte con **VERTEX Technics** para mayor información. **VERTEX Technics** es el distribuidor de **DIONEX** en España: www.vertex.es

Of. Barcelona:	93 223 33 33
Of. Madrid:	91 324 00 14
Of. Bilbao:	94 447 19 99
Of. Valencia:	96 135 21 91
Of. Vigo:	98 670 00 72

AIR LIQUIDE

La gama más completa de gases, materiales y servicios específicos para análisis e investigación.

Pensando en las necesidades específicas de los laboratorios, Air Liquide ofrece con la Gama Alphagaz, una oferta totalmente adaptada a los requerimientos de pureza de la cadena analítica.

Los gases puros y mezclas, los materiales e instalaciones, así como los servicios de la Gama Alphagaz, son la mejor solución para instrumentación analítica e investigación, a partir de la gestión, el mantenimiento y el control de todos los sistemas por parte de Air Liquide.

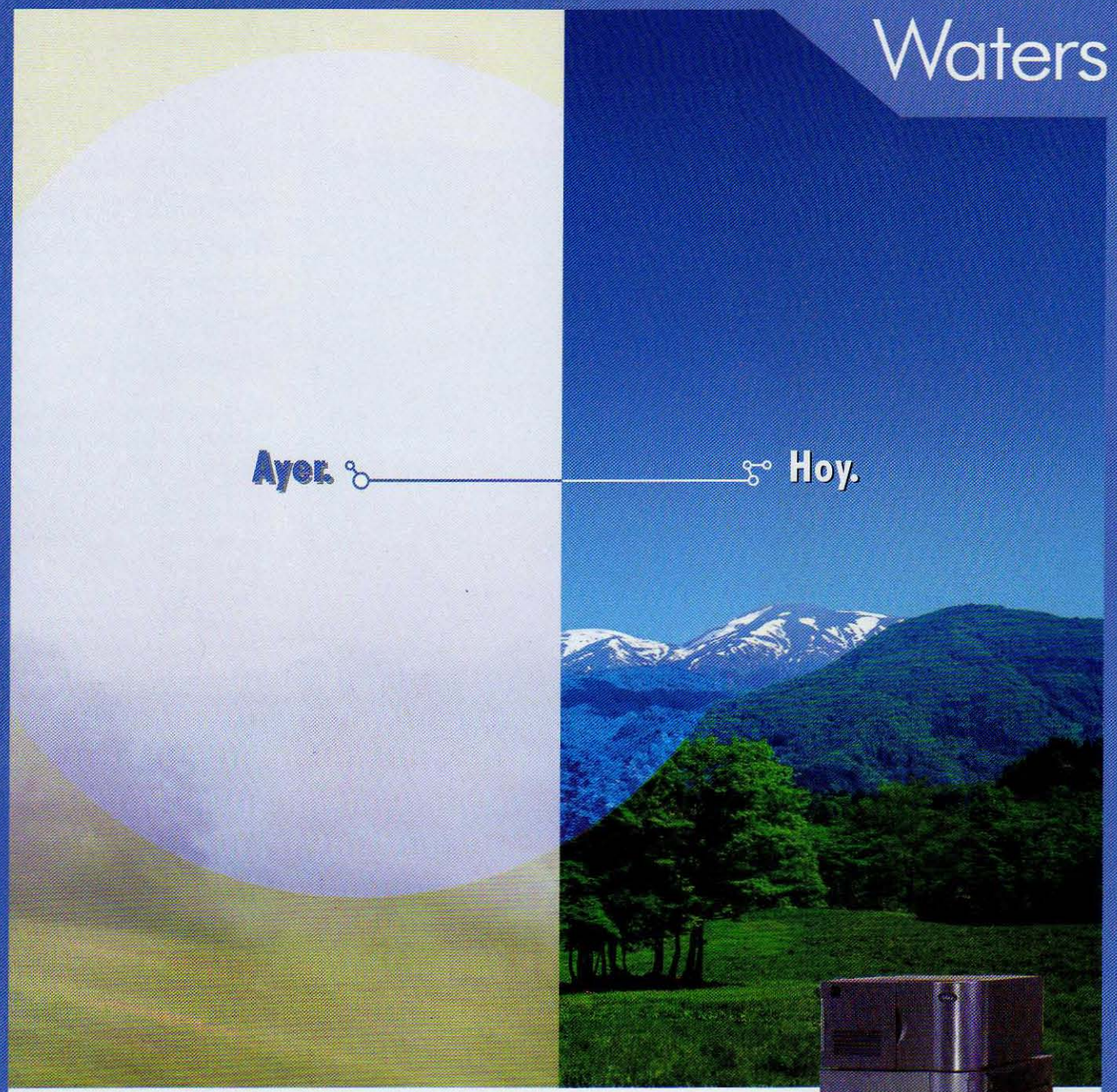
Air Liquide contribuye a la fabricación de múltiples productos de nuestro día a día y a la preservación de la vida, dentro de una gestión de desarrollo sostenible, gracias a soluciones innovadoras basadas en las últimas tecnologías.

Gases de pureza garantizada en su laboratorio

AL Air Liquide España, S.A.
Paseo de la Castellana, 35 / 28046 Madrid / Telfs.: 91 502 93 00 - Fax: 91 502 93 30 / www.airliquide.es

Waters

Ayer. Hoy.



Acquity

Ultra Performance LC

Presentamos el nuevo sistema Waters® ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography™ (UPLC™). Ultra rapidez, ultra sensibilidad y ultra resolución que rebasan los límites de la HPLC de hoy para entrar en un nuevo dominio de ultra productividad y ultra prestaciones. Basada en los mismos principios fundamentales que la HPLC la UPLC™ permite expandir las aplicaciones de la cromatografía líquida a extremos no imaginados hasta ahora. Ya es posible ver más claro. ACQUITY UPLC™ de Waters: más confianza en los resultados.

Visite www.ultraperformanceLC.com

For Complete Confidence

Waters Cromatografía, S.A.

Ronda de Can Fatjó 7A • Parc Tecnològic del Vallès • 08290 Cerdanyola del Vallès

Tel. 936 00 93 00 • Fax 936 00 93 60

Avenida de Europa, 21 • Parque Empresarial La Moraleja • 28810 Alcobendas

Tel. 912 03 91 00 • Fax 916 61 08 55

www.waters.com • eMail spain@waters.com

© 2004 Waters Corporation. Waters, ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography y UPLC son marcas registradas de Waters Corporation.