

## Determinación del carcinógeno específico del tabaco 4-(metilnitrosamino)-1-(3- piridil)-1-butanol en orina: 20 años de evolución en los métodos de preparación de muestra

Magdalena Escobar-Saucedo <sup>1</sup>, Noemí WaksmanMinsky <sup>2</sup>, J. Ricardo Lucio-Gutiérrez <sup>1</sup>, Rocío Castro Ríos <sup>1</sup>, Ma. De la Luz Salazar-Cavazos <sup>2</sup> y Augusto Rojas Martínez <sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Medicina, Departamento de Química Analítica, Monterrey, Nuevo León, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Monterrey, Nuevo León, México.

Recibido 10 septiembre 2013, Aceptado 30 noviembre 2013

### Resumen

El tabaco se encuentra entre las primeras causas de mortalidad y morbilidad en el mundo. En México hay 17.3 millones de fumadores y alrededor de 60 mil personas mueren por causas atribuibles al tabaco. El 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol o NNAL es un carcinógeno del grupo 1 según la Agencia Internacional para la investigación de Cáncer, el cual es eliminado por el organismo en forma de conjugado del ácido glucorónico (NNAL-glu), debido a lo cual, la relación NNAL-Glu/NNAL libre es un potencial indicador de riesgo para desarrollar cáncer de pulmón. La presente revisión se enfoca en la importancia de la etapa de preparación de muestra en métodos bioanalíticos, así como en las técnicas de preparación de muestra empleadas para la determinación del NNAL en muestras de orina humana reportadas desde el año 1993 hasta 2013. También incluye una sección donde se examinan algunas tendencias del tratamiento de muestras para mejorar el rendimiento de los análisis, dentro de las cuales se pueden mencionar las técnicas de microextracción, SPE en-línea, liofilización, derivatización, entre otras.

**Palabras clave:** tabaco, NNAL, preparación de muestras, métodos bioanalíticos, orina humana

### Abstract

Tobacco is one of the main causes of mortality and morbidity in the worldwide. In Mexico there are 17.3 million smokers and about 60,000 people die because of tobacco. The 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol or NNAL is a carcinogen of Group 1 according to the International Agency for Research on Cancer and it is eliminated from the organism by conjugation to glucuronic acid (NNAL-Glu). According to this, the ratio NNAL-Glu/NNAL is a potential indicator of risk for developing lung cancer. This review focuses on the importance of sample preparation step in bioanalytical methods, as well as on the sample preparation techniques used for determination of NNAL in human urine samples reported since 1993 to 2013. This review also include a section that discusses some trends in treatments of samples in order to improve the performance of analysis such as solid phase microextraction, on-line solid phase extraction, lyophilization, derivatization, and others.

**Keywords:** tobacco, NNAL, sample preparation, bioanalytical methods, human urine.

### 1. Introducción

El tabaco es el único producto de consumo legal que puede dañar a todos los que se exponen a él y causa la muerte de alrededor del 50 % de las personas que lo consumen voluntariamente, en promedio, 15 años antes de lo naturalmente previsible. La Organización Mundial de la Salud, en el año 2008, pronosticó que las muertes debidas al consumo de tabaco superarían los cinco millones de personas y de continuar con la misma tendencia, esta cifra aumentaría a más de ocho millones de defunciones para el año 2030[1]. Actualmente se relaciona al consumo de tabaco con más de 25 enfermedades y es el principal factor causante de cáncer de pulmón, esófago, laringe, boca, garganta, riñón,

vejiga, páncreas, estómago y cérvix, así como de leucemia mieloide aguda[2]. Es importante remarcar que las personas no fumadoras expuestas al humo de cigarro, fumadores pasivos o involuntarios, presentan efectos adversos en la salud más allá de solo irritación en la conjuntiva ocular y tracto respiratorio superior. Se ha reportado que los niños expuestos al humo de segunda mano tienen un aumento del riesgo de síndrome de muerte súbita del lactante, infecciones respiratorias agudas y asma más grave, entre otras enfermedades. En el caso de los adultos no fumadores pueden desarrollar cáncer de pulmón así como efectos inmediatos en el sistema cardiovascular, que incluyen: hipertensión, arteriopatía coronaria,



accidente cerebro-vascular e insuficiencia cardíaca congestiva.[3]

En México durante el año 2010, según el reporte de Guerrero- López et al., fallecieron alrededor de 60 mil personas, es decir 165 muertes por día, a causas atribuibles al tabaco [4]. Según la Encuesta Nacional de Adicciones 2011, en nuestro país hay 17.3 millones de fumadores, lo que representa un 21.7 % de prevalencia del consumo activo de tabaco, siendo el consumo promedio de 7 cigarrillos por día. En ese mismo año, se reportó una prevalencia de exposición al humo de tabaco ambiental (HTA) de 30.2 %, lo que se traduce a 12.5 millones de mexicanos, que nunca han fumado, están expuestos al HTA. [5]

El 25% de las muertes debidas al consumo de tabaco se producen en las edades medias de la vida, lo cual ocasiona pérdidas de productividad laboral y elevados costos para el sector salud [1, 5]. La mayor parte de los daños que causa el tabaco en la salud se ponen de manifiesto hasta varios años después del inicio del consumo; debido a lo cual, las investigaciones se han centrado en la búsqueda de marcadores biológicos de exposición al tabaco.

### 1. Importancia de la búsqueda de marcadores biológicos. El estudio de NNAL.

Los marcadores biológicos, también llamados biomarcadores, son cualquier medición química, física o biológica, que refleja una interacción entre un sistema biológico y un peligro potencial[6]. Los marcadores biológicos pueden clasificarse en tres grupos: de exposición, de efectos y de susceptibilidad. Los biomarcadores de exposición permiten la medición de la dosis interna mediante un análisis químico de un compuesto tóxico o de sus metabolitos en fluidos del cuerpo o excreta[7]. En el caso del tabaco, pueden ser los niveles de alguno de sus componentes, el efecto de los mismos en la función celular o la alteración del ADN que se pueden analizar en aire exhalado, esputo, saliva, sangre, piel, orina, uñas, entre otras partes del cuerpo. La importancia de la búsqueda de biomarcadores del tabaco se debe a que permiten conocer la prevalencia del consumo, estudiar el impacto de los nuevos tratamientos, verificar la exposición al humo de primera o segunda mano, así como constatar si un tratamiento se cumple correctamente[8]

Las nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA, por sus siglas en inglés) se generan durante la fermentación, el curado y el añejamiento de la hoja de tabaco; estas moléculas son buenas candidatas para ser biomarcadores del consumo de tabaco, ya que sólo se encuentran en los productos de tabaco[9, 10]. Las TSNA son altamente cancerígenas y están clasificadas en los grupos 1 o 3 de la Agencia Internacional para la investigación de Cáncer (IARC)[11]. La formación de estos compuestos se lleva a cabo por la nitrosación, ya

sea de, aminas terciarias como la nicotina o aminas secundarias como: nornicotina, anabasina, anatabina, presentes en el tabaco, produciendo diferentes nitrosaminas, las cuales contienen en su estructura el grupo funcional nitroso unido al nitrógeno de la amina; en la Figura 1 se muestran las principales TSNA y su posterior metabolismo[10, 11].

La 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona, llamada también NNK, es la principal nitrosamina derivada de la nicotina. La NNK es un procarcinógeno que para ejercer su efecto tumorigénico requiere activación metabólica, la cual puede ser por tres rutas principales: reducción del grupo carbonilo, N-oxidación y la  $\alpha$ -hidroxilación del anillo de piridina[12]. El producto de la reducción del grupo carbonilo es el 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol, también conocido como nitrosamina alcohol derivada de la nicotina o NNAL. El NNAL presenta niveles séricos muy bajos, ya que es un sustrato de la enzima UDP-glucuriltransferasa que lo transforma en conjugados del ácido glucurónico (NNAL-Glu), los cuales pueden formarse tanto en el grupo carbinol del NNAL (NNAL-O-Glu) como en el Nitrógeno del anillo de piridina (NNAL-N-Glu), siendo depurados rápidamente por el organismo mediante excreción por la orina[12-14].

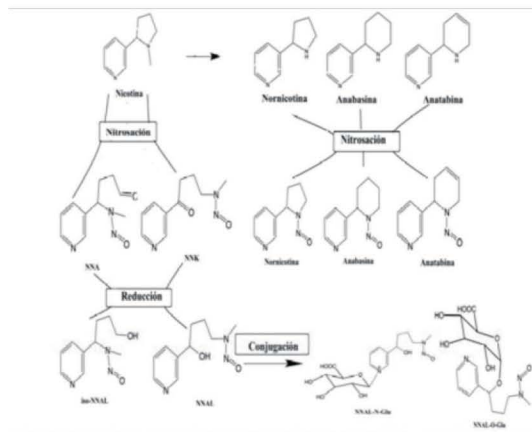


Figura 1. Metabolismo de las TSNA.

### 2. Preparación de muestra y su importancia de la en el análisis bioanalítico.

El proceso analítico considera 5 etapas principales: muestreo, preparación de muestra, separación analítica, detección instrumental y análisis de datos[15]. La etapa de preparación de muestras consiste en convertir una muestra real a un formato que sea adecuado para el análisis por alguna separación analítica u otra técnica y consume alrededor del 80% del tiempo total del análisis de una muestra[16]. Según Smith, los principales objetivos de la preparación de muestras son:



1. Favorecer la selectividad del método, mediante la remoción de potenciales interferencias de la muestra.
2. Incrementar la concentración del analito y de esta manera potenciar la sensibilidad del ensayo.
3. Convertir el analito a una forma más adecuada para su detección o separación.
4. Proveer un método robusto y reproducible que sea independiente de las variaciones en la matriz de la muestra.

En el desarrollo de métodos bioanalíticos para la determinación de compuestos trazas en muestras biológicas, es importante contar con procedimientos de preparación de muestra adecuados y eficientes que potencien la identificación, la confirmación y la cuantificación de los analitos[17]; esto debido a que la mayoría de las técnicas utilizadas para el análisis químico, no son específicas para un solo tipo de compuestos.

Las características importantes para realizar una técnica de preparación de muestra eficiente, según Kataoka[18], son:

1. Mínima pérdida de muestra.
2. Buena recuperación del analito de interés.
3. Eficiente eliminación de los componentes coexistentes.
4. Fácil acoplamiento con los métodos de análisis.
5. Factibilidad en la aplicación del procedimiento.
6. Mínimo costo.

Dada la importancia de la cuantificación de los biomarcadores de exposición al tabaco así como el papel fundamental que desarrolla la etapa de preparación de muestras en los métodos bioanalíticos, se realizó una búsqueda bibliográfica de abril a septiembre de 2013 en Summon® utilizando los descriptores: tobacco-specific nitrosamine, tobacco, lung carcinogen, biomarkers, sample preparation, urine. También se realizó una búsqueda en internet en el buscador “google académico” con los mismos términos. Se seleccionaron aquellos documentos reportados desde 1993 hasta 2013 que mostraran datos relevantes sobre el método analítico empleado, las modificaciones realizadas a los métodos referenciados, así como las ventajas obtenidas con las modificaciones. La tabla 1 resume las metodologías de análisis y se muestran las características para cada una.

#### 4. Determinación del carcinógeno 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL).

##### 4.1. Técnicas cromatográficas.

En la tabla 1 se pueden observar que las técnicas cromatográficas empleadas para el análisis del NNAL son: cromatografía de gases con analizador de energía térmica (GC-TEA), cromatografía de gases con detector de masas selectivas (GC-MSD), cromatografía de gases

acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) y la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS).

Cada una de estas técnicas presenta ventajas y limitaciones. La GC-TEA posee un detector altamente sensible para compuestos que poseen en su estructura grupos nitro (-NO<sub>2</sub>) y/o nitroso (-NO)[19]. Las desventajas que presenta esta técnica son: la gran cantidad de volumen de muestra requerida y que los procesos de preparación de muestras son muy laboriosos y costosos [20]; la mayoría de los laboratorios no podría justificar el uso de un detector tan especializado debido a que no tienen una aplicación regular y frecuente, además de que el detector no puede distinguir la co-elución de compuestos nitrosos.[21] La CG-MSD se ha utilizado poco para el análisis de NNAL y NNAL-Glu en muestras de orina, como para la confirmación de los analitos[22, 23]; mientras que la GC-MS/MS, a pesar de tener límites de detección mejores que GC-TEA, se ha utilizado principalmente para la confirmación de los picos cromatográficos ya que los costos de adquisición del equipo son elevados[24]. Finalmente, con el desarrollo de la HPLC-MS/MS ha encontrado una rápida aceptación en el análisis de NNAL en muestras biológicas, esto debido a la necesidad del análisis de un mayor número de muestras y un tiempo de análisis menor. La HPLC-MS/MS requiere una preparación de muestra simple, la separación de los analitos se alcanza en un menor tiempo y posee buena sensibilidad y selectividad al operar en modo de monitoreo de reacción múltiple; sin embargo presenta la desventaja de la posible supresión iónica de las muestras que podría llevar a la mala cuantificación de las mismas.[25]

##### 4.2. Técnicas de preparación de muestra.

Para una mayor facilidad en el desarrollo de esta revisión, los artículos seleccionados se clasifican en base a la técnica de preparación de muestra principal, de la cual se realiza, tanto una breve descripción, así como la mención de algunos aspectos importantes observados al aplicarla. Finalmente, en el apartado 5 se presentan las nuevas tendencias y retos en la preparación de muestras para el análisis de NNAL en orina.

##### 4.2.1. Extracción líquido-líquido.

La extracción líquido-líquido (LLE) se basa en la transferencia de un analito de una muestra acuosa a un solvente inmiscible en agua (basado en el coeficiente de partición octanol-agua). Es la forma más simple de la extracción y purificación de analitos a partir de muestras líquidas y ha sido ampliamente utilizada en el análisis de muestras biológicas. Dentro de las desventajas que presenta la LLE son la formación de emulsiones, requiere múltiple manipulación de la muestra, puede consumir mucho tiempo así como el uso de grandes cantidades de solventes orgánicos potencialmente tóxicos, lo que

conlleva a la producción de grandes volúmenes de residuos tóxicos [17].

En los primeros reportes para la determinación del NNAL y NNAL-Glu utilizan como principal técnica de extracción la LLE, tomando como modelo la metodología reportada en 1993 por Carmella y *et al.*, el cual consistió en realizar una extracción líquido-líquido de la orina a pH neutro con acetato de etilo, esto con la finalidad de separar la fracción libre contenida en la fase orgánica de la fracción conjugada del NNAL contenida en la fase acuosa. Posteriormente, la fase acuosa se sometió a un proceso de concentración seguido de una hidrólisis enzimática del NNAL-Glu utilizando la  $\beta$ -glucuronidasa tipo IX-A para liberar el NNAL. Terminado el periodo de incubación, se realizó una limpieza por partición acidificando la fase acuosa para provocar la ionización del NNAL y de esta manera asegurar su permanencia en la

fase acuosa, que posteriormente se neutralizó, con lo cual el NNAL se tenían en su forma no ionizada y se recuperó con diclorometano. Tanto la fracción de acetato de etilo como la fracción de diclorometano se llevaron a sequedad, se reconstituyeron en agua y se purificaron mediante HPLC. Finalmente se sometieron a derivatización con trimetilclorosilano, para convertir el alcohol secundario en un derivado de trimetilsileter, para su posterior análisis por GC- TEA[22]. Este método de preparación de muestra fue utilizado como base para posteriores trabajos con la aplicación de pequeñas modificaciones, entre las que se pueden mencionar: cambio del estándar interno utilizado[26–36], diferente cantidad de enzima requerida en el paso de hidrólisis[26, 35]; menor cantidad de muestra[27–33, 35–37]; diferente conservador de muestra[35, 36]; así como modificaciones al paso de purificación por HPLC[38].



Tabla I. Compilación de los estudios que analizan NNAL y NNAL-Glu

| TSNA analizada   | Tipo de muestra       | Método analítico                   | Volumen utilizado | Técnica de preparación de muestra   | Comentarios   | Referencia                |
|--|-----------------------|------------------------------------|-------------------|---|---|---------------------------|
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL-Glu <sup>c</sup>                    | Orina de 24 h         | GC-TEA y confirmación por GC-MSD   | 100 mL            | Extracción Líquido-Líquido, posterior limpieza por HPLC y Derivatización utilizando trimetilclorosilano | Determinaron NNAL-Glu obteniendo la forma libre por hidrólisis con $\beta$ -glucuronidasa (5000 unidades e incubación de 16 h). Utilizaron d <sub>5</sub> -NNAL y d <sub>5</sub> -NNAL-Glu como estándar interno. | Carmella et al, 1993.[22] |
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL-Glu <sup>c</sup>                    | Orina de 24 h         | GC-TEA                             | 100 mL            | Método desarrollado por Carmella, 1993  | Utilizaron iso-NNAL como estándar y 500000 U de $\beta$ -glucuronidasa.   | Hecht et al, 1993[26]     |
| NNK <sup>d</sup> , NNAL <sup>a</sup> , NNAL-Glu <sup>c</sup> | Muestra aleatoria     | GC-TEA                             | 20 mL             | Método de Carmella et al, 1993, con pequeñas modificaciones.  | Utilizaron iso-NNAL como estándar y un volumen menor de muestra.  | Murphy et al, 1994 [39]   |
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL-Glu <sup>c</sup>                    | Diferentes protocolos | GC-TEA                             | 25 mL             | Método de Carmella et al, 1993, con pequeñas modificaciones.  | Utilizaron iso-NNAL como estándar interno. Probaron tres tipos de $\beta$ -glucuronidasas.(IX-A, H-1 y B-1) observando que el mejor rendimiento se obtuvo con la enzima IX-A.                                     | Carmella et al, 1995 [27] |
| NNAL total <sup>b</sup> y NNAL-Glu <sup>c</sup>              | Orina de 24 h         | GC-TEA                             | 25 mL             | Método desarrollado por Carmella, 1995  | El preservador de muestra utilizado fue sulfamato de amonio al 20 % en ácido sulfúrico 3.6 N.   | Kresty et al, 1996 [40]   |
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL-Glu                                 | Muestra aleatoria     | GC-TEA                             | 20-25 mL          | Método desarrollado por Carmella et al, 1995.   | Aplicación del método sin modificaciones.   | Richie et al, 1997[37]    |
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL-Glu <sup>c</sup>                    | Orina de 24 h         | GC-TEA                             | 20-25 mL          | Método desarrollado por Carmella et al, 1995.   | Utilizaron ácido ascórbico como preservador de muestras.  | Taioli et al, 1997[28]    |
| NNAL-Glu <sup>c</sup>  | Muestra aleatoria     | GC-TEA y confirmación por GC-MS/MS | 50 mL             | Método de Hecht et al, 1993 con pequeñas modificaciones.  | Utilizaron iso-NNAL como estándar interno y 25000 U de $\beta$ -glucuronidasa. El análisis cromatográfico se realizó con una columna capilar DB-1701 (30 m x 0.32 mm x 0.25 $\mu$ m).                             | Parsons et al, 1998[29]   |
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL-Glu <sup>c</sup>                    | Orina de 24 h         | GC-TEA y confirmación por GC-MS/MS | 25 mL             | Método de Carmella et al, 1995 con pequeñas modificaciones.   | Aplicaron el uso de columnas capilares como Parsons et al, 1998.  | Hecht et al, 1999[30]     |
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL-Glu <sup>c</sup>                    | Muestra aleatoria     | GC-TEA                             | 4 - 9 mL          | Método de Carmella et al, 1995 y Parsons et al, 1998 con pequeñas modificaciones.                       | Utilizaron iso-NNAL como estándar interno y 10000 U de $\beta$ -glucuronidasa.  | Lackmann et al, 1999 [31] |

Tabla 2 Continuación

| TSNA analizada                             | Tipo de muestra                   | Método analítico                           | Volumen utilizado                        | Técnica de preparación de muestra  | Comentarios  | Referencia                |
|--|-----------------------------------|--|--|--|--|---------------------------|
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL-Glu <sup>c</sup>  | Muestra aleatoria                 | GC-TEA                                     | 20 mL no fumadores y 5 mL para fumadores | Método de Carmella et al, 1993, Hecht et al, 1993 y Parsons et al, 1998 con pequeñas modificaciones.   | La purificación de las muestras se realizó con una columna Luna (de 4.6 x 250 mm de 5µm tamaño de partícula)   | Anderson et al, 2001[32]  |
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL-Glu <sup>c</sup>  | Muestra aleatoria                 | GC-TEA y confirmación por GC-MS/MS         | 20 mL                                    | Método de Hecht et al, 1993 y Parsons et al, 1998 con pequeñas modificaciones.   | Para la hidrólisis utilizaron 25000 unidades de β-glucuronidasa. La limpieza de los extractos se realizó por HPLC fase normal e inversa.   | Hecht et al, 2001[33]     |
| NNAL-O-Glu, NNAL <sup>a</sup> y NNAL-N-Glu | Muestra aleatoria                 | GC-TEA                                     | 10 mL                                    | Extracción en fase sólida con cartuchos SepPakVac C18 de 2 g.  | En la fracción 1(metanol 10%) se eluyó el NNAL-Glu, que posteriormente se dividió en dos alícuotas tratadas con: hidróxido de sodio (NNAL-N-Glu) y la otra con β glucuronidasa (NNAL-N-Glu y NNAL-O-Glu). La fracción 1 contenía NNAL libre y se eluyó con metanol 50%. Se utilizó iso-NNAL como estándar interno. | Carmella et al, 2002 [41] |
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL-Glu <sup>c</sup>  | Orina de 24 h                     | GC-TEA                                     | No especificado                          | Método de Hecht et al, 1999.   | La limpieza de los extractos se realizó por HPLC fase normal e inversa.  | Hecht et al, 2002[34]     |
| NNAL total <sup>b</sup>                    | Muestra aleatoria                 | GC-TEA, se realizaron pruebas con GC-MS/MS | 4.5 mL fumadores y 20 mL en no fumadores | Extracción líquido-líquido de la muestra acidificada. La limpieza por extracción líquido-líquido con soporte y se enriqueció por HPLC y se derivatizó. | Para la extracción líquido-líquido con soporte se utilizaron cartuchos Chem-Elute. Las condiciones de derivatización fueron: calentamiento a 50 °C por 1 h. Se encontró buena sensibilidad con GC-MS/MS.   | Camella et al, 2003 [24]  |
| NNAL total <sup>b</sup>                    | Muestra aleatoria y orina de 24 h | GC-TEA                                     | No especificado                          | Método de Carmella et al, 1993, Hecht et al, 1993 y Parsons et al, 1998 con pequeñas modificaciones.   | Muestra puntual para establecer los niveles base de NNAL en cada sujeto previo a la exposición al humo de segunda mano y la muestra de 24 horas para la post exposición  | Anderson et al, 2003 [35] |
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL-Glu <sup>c</sup>  | Orina 24 horas                    | HPLC-MS/MS                                 | 10 mL para NNAL y 5 mL para NNAL total   | Extracción en un solo paso por extracción en fase sólida. De intercambio catiónico.  | Utilizaron los cartuchos Oasis MCX de 60 mg. El estándar interno fue d <sub>3</sub> -NNAL. No se requirió derivatización.  | Byrd y Ogden, 2003 [20]   |
| NNAL total <sup>b</sup>                    | Muestra aleatoria                 | GC-TEA                                     | 4.5 mL                                   | Método de Carmella et al, 1995, Hecht et al, 1999.   | Se realizó el seguimiento de diversos biomarcadores urinarios.   | Murphy at al, 2004[36]    |
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL-Glu <sup>c</sup>  | Muestra aleatoria                 | GC-MS de alta resolución                   | 5 mL                                     | Extracción líquido-líquido, en dos condiciones, limpieza por extracción en fase sólida, y derivatización con anhídrido del ácido heptafluorobutírico.  | Utilizaron como estándar interno <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -NNAL. La hidrólisis del NNA-Glu la realizaron con 10000 unidades de β-glucuronidasa de <i>H. pomata</i> y con incubación de 48 h.   | Bernet et al, 2005[23]    |

Tabla 3 Continuación

| TSNA analizada  | Tipo de muestra   | Método analítico | Volumen utilizado | Técnica de preparación de muestra  | Comentarios  | Referencia                 |
|---|-------------------|------------------|-------------------|--|--|----------------------------|
| NNAL total <sup>b</sup>   | Muestra aleatoria | HPLC-MS/MS       | 5 mL              | Extracción en un solo paso por extracción en fase sólida, utilizando cartuchos con polímeros molecularmente impresos.  | El estándar interno fue <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -NNAL. No se requirió derivatización. Para la hidrólisis realizaron estudios con la β glucoronidasa/X-A de <i>E. coli</i> y la H-1 de <i>H. pomata</i> , no encontraron diferencia significativa entre ambas. | Xia et al, 2005[42]        |
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL-Glu <sup>c</sup>   | Muestra aleatoria | GC-TEA           | No especificado   | Método de Carmella et al 2003.   | La limpieza del extracto lo realizaron por extracción en fase sólida de intercambio iónico y como estándar interno el 5-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-pentanol.   | Hecht et al, 2006[43]      |
| NNAL total <sup>b</sup>   | Muestra aleatoria | GC-TEA           | No especificado   | Método de Hecht et al 1999 y Hecht et al, 2001.  | Utilizaron como estándar interno el C5-NNAL.   | Stepanov et al, 2006[38]   |
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL total <sup>b</sup>   | Orina 24 horas    | HPLC-MS/MS       | No especificado   | Extracción en fase sólida utilizando cartuchos de intercambio catiónico.   | Utilizaron d <sub>3</sub> -NNAL como estándar interno.   | Scherer et al, 2007 [44]   |
| NNAL total <sup>b</sup>   | Muestra aleatoria | HPLC-MS/MS       | No especificado   | Método basado en Carmella et al, 1995, Carmella et al, 2003 y Carmella et al 2005.   | Realizó estudios utilizando GC-TEA y HPLC-MS/MS  | Hecht et al, 2007[45]      |
| NNAL total <sup>b</sup>   | Muestra aleatoria | HPLC-MS/MS       | 5 mL              | Extracción Líquido-Líquido con variaciones de pH.  | Se realizó derivatización con anhídrido hexanoico.   | Jacob III et al, 2008 [46] |
| NNAL total <sup>b</sup>   | Muestra aleatoria | HPLC-MS/MS       | 5 mL              | Método basado en Xia et al, 2005 con pequeñas modificaciones.  | Realizaron la extracción con cartuchos con polímeros molecularmente impresos, para la elución utilizaron una centrifuga y agregaron un paso extra de lavado con una mezcla de tolueno:diclorometano (4:1)  | Shah et al, 2009[47]       |
| NNAL total <sup>b</sup> , NNN <sup>g</sup> total, NAB total <sup>e</sup> y NAT <sup>f</sup> | No especificado   | HPLC-MS/MS       | 6 mL              | Extracción en fase sólida con polímeros molecularmente impresos y Extracción en fase sólida de intercambio catiónico se realizó con la finalidad de enriquecer el extracto | Los estándares internos fueron los analitos de interés deuterados. La extracción en fase sólida.   | Kavvadias et al, 2009 [48] |



Tabla 4. Continuación

| TSNA analizada                              | Tipo de muestra   | Método analítico | Volumen utilizado | Técnica de preparación de muestra  | Comentarios   | Referencia                |
|---|-------------------|------------------|-------------------|--|---|---------------------------|
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL total <sup>b</sup> | Muestra aleatoria | HPLC-MS/MS       | 5 mL              | Extracción líquido con soporte y posteriormente una extracción líquido-líquido y el paso final extracción en fase sólida con polímeros molecularmente impresos   | La extracción líquido con soporte se realizó en cartuchos ChemElute. Método cromatográfico por Xia et al, 2005.   | Ashley et al, 2010[49]    |
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL total <sup>b</sup> | Muestra aleatoria | HPLC-MS/MS       | 0.25 mL           | Extracción líquido-líquido. Derivatización con acetonitrilo/ yoduro de n-propilo. Posterior purificación por extracción en fase sólida de intercambio catiónico.   | Utilizaron d <sub>3</sub> -NNAL como estándar interno. Se empleó un método de dilución isotópica estable en combinación con HPLC-MS/MS y empleo del monitoreo de reacciones múltiples.  | Bhat et al, 2011[50]      |
| NNAL <sup>a</sup> y NNAL-Glu <sup>c</sup>   | Orina de 24 h     | HPLC-MS/MS       | 1 mL              | Extracción en línea con columnas capilares de microflujo con polímeros molecularmente impresos.  | Para el análisis se ajustó el pH de la orina entre 5 y 7. Se realizó el análisis del NNAL total hidrolizando la muestra acondicionada con buffer de fosfatos pH 6.4 y 20000 unidades de β-glucoronidasa H-1 y se incubaron por 48 h.  | Shah et al, 2011[51]      |
| NNAL total <sup>b</sup>                     | Orina de 24 h     | HPLC-MS/MS       | 5 mL              | Método basado en Shah et al, 2009.   |   | Hou et al, 2012[52]       |
| NNAL <sup>a</sup> , NNAL-O-Glu y NNAL-N-Glu | Muestra aleatoria | HPLC-MS/MS       | 10 mL             | Extracción líquido-líquido, seguida de una extracción en fase sólida de intercambio catiónico.   | Se analizaron los analitos sin hidrolizar. El estándar interno fue <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -NNAL. El método desarrollado se comparó con los métodos enzimáticos reportados por Shah et al, 2009 y Hou et al, 2012 y se observó una variación en los resultados de -8.39 % a 13.38 % para el NNAL y de -3.04 % a 21.54 % para el NNAL total.  | Yao et al, 2013[53]       |
| NNAL <sup>a</sup> , NNAL-O-Glu y NNAL-N-Glu | Muestra aleatoria | HPLC-MS/MS       | 180 μL            | Extracción líquido con soporte (SLE) en formato de placa de 96 pozos, seguida por una extracción en fase sólida en formato de placa de 96 pozos. El tratamiento de los analitos se basó en una adaptación del procedimiento de Carmella et al, 2002. | La determinación de los analitos se realizó dividiendo el volumen de muestra en 3 fracciones: 80 μL para NNAL libre, 60 μL para NNAL-N-Glu y 40 μL para NNAL total. Para la extracción líquido con soporte se utilizaron las placas de Isolute SLE+ y la para extracción en fase sólida se emplearon placas de Oasis MCX. El estándar interno utilizado fue <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -NNAL. | Carmella et al, 2013 [54] |

**Nota:** <sup>a</sup>NNAL: NNAL libre, <sup>b</sup>NNAL Total: NNAL libre + NNAL-Glu, <sup>c</sup>NNAL-Glu: NNAL-N-Glu + NNAL-O-Glu, <sup>d</sup>NNK: nitrosonicotina cetona, <sup>e</sup>NAB: nitrosoanabasina, <sup>f</sup>NAT: nitrosoanatabina, <sup>g</sup>NNN: nitrosonornicotina

Con la finalidad de reducir los costos del tratamiento de muestra por LLE, esta se puede desarrollar empleando volúmenes pequeños de solventes orgánicos. En el 2008, Jacob et al. tomaron 5 mL de muestra de orina y realizaron extracciones empleando menos de 10 mL de los solventes orgánicos, utilizaron la agitación por vórtex para mejorar la eficiencia de extracción y ciclos de centrifugación - congelación de la fase acuosa para la eliminación de emulsiones y la separación de las fases. Este método también incluyó un proceso de derivatización con anhídrido hexanoico y 4-(dimetilamino) piridina, con la finalidad de convertir el grupo hidroxilo (moderadamente polar) en un grupo éster (relativamente no polar) y como consecuencia de esta modificación química se logró: aumentar la sensibilidad del método de HPLC-MS/MS debido a la disminución de la supresión iónica, aumentar la retención en la columna cromatográfica y separar eficientemente el analito y los compuestos interferentes mediante la extracción y el análisis cromatográfico[46].

#### 4.2.1. Extracción líquido-líquido con soporte.

La extracción líquido-líquido con soporte (SLE), también se le conoce como extracción líquido-líquido extralut, extracción líquido-líquido con soporte sólido (SS-LLE) o extracción líquido-sólido (LSE). Esta técnica consiste en inmovilizar un líquido con el uso de un material químicamente inerte, que está empacado en un tubo de propileno y la posterior percolación de un líquido inmiscible de manera semejante a la cromatografía. El material de relleno más utilizado es la tierra de diatomeas (principalmente compuesta por  $\text{SiO}_2$ ), con un rango de trabajo de pH de 1 a 13. Cuando el solvente inmiscible pasa a través de la tierra de diatomeas húmeda, se aumenta el área de contacto superficial lo que permite una mayor distribución entre los líquidos, lo que se traduce en una mayor recuperación del analito[17, 55]. Esta técnica se ha utilizado para llevar a cabo la limpieza del extracto previo al análisis cromatográfico[24, 49], en estos trabajos se sustituye el paso de limpieza por HPLC que utiliza marcadores de tiempo de retención para indicar el inicio y término de colecta de la fracción que contiene al NNAL. La SLE se ha combinado con LLE y la extracción en fase sólida con polímeros molecularmente impresos (SPE-MIP).

#### 4.2.2. Extracción en fase sólida.

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica de partición del analito entre una fase sólida (en diversas presentaciones) y una fase líquida que se puede aplicar para extraer analitos de baja o nula volatilidad, donde los analitos deben presentar una mayor afinidad por la fase extractante que por la matriz de la muestra. La retención puede deberse a interacciones no polares, polares o iónicas, que dependerán de las propiedades físico-químicas del analito y de la fase extractante. Existe una amplia variedad de fases extractantes para SPE, entre los que podemos citar a los unidos químicamente a la sílica: C8, C18, intercambio iónico; materiales con más de un

mecanismo de retención, también llamados de modo mixto, los inmunosorbentes y los polímeros molecularmente impresos[17]. Algunas ventajas de la SPE sobre las extracciones convencionales y limpieza son: mayor reproducibilidad, empleo de menores volúmenes de solventes, rapidez, versatilidad, costos menores, posibilidad de automatización y obtención de extractos libres de interferencias.[56]

Carmella et al. reportaron por primera vez en 1995 el uso de la SPE para el análisis del NNAL en orina; ellos investigaron la posibilidad de sustituir el paso de limpieza por HPLC por la limpieza por SPE en fase normal o inversa, pero los cromatogramas que obtuvieron no fueron aceptables para la cuantificación por GC-TEA[27]. Posteriormente en el 2002, emplearon cartuchos Sep pack Vac C18 para la separación del NNAL libre y NNAL-Glu en muestras de orina, realizando la elución con metanol al 10 % para el NNAL-Glu y metanol al 50% para el NNAL libre, obtuvieron coeficientes de variación menores al 10 % para cada uno de los analitos[41]. Byrd y Ogden en el 2003 reportaron un método, validado según los criterios de la FDA, para la determinación de NNAL y NNAL-Glu mediante SPE en cartuchos de intercambio catiónico Oasis MCX de 60 mg y el análisis por HPLC-MS/MS. Los volúmenes de muestra que analizaron fueron de 10 y 5 mL para la determinación del NNAL libre y del NNAL total, respectivamente. La concentración de NNAL-Glu la calcularon como la diferencia entre el NNAL total y el NNAL libre. Ellos observaron que al reducir los pasos de la preparación de las muestras, se logró disminuir el tiempo de análisis de las mismas y observaron una recuperación del analito superior al 85 % [20]. En el 2005, Bernet y et al. cambiaron el proceso de limpieza mediante HPLC por una limpieza por SPE utilizando cartuchos Oasis HLB y posteriormente una derivatización con ácido heptafluorobutírico (HFBA) y el análisis por GC-MS, la recuperación promedio del método desarrollado fue de 97.5 % en un rango de 10 - 800 pg mL<sup>-1</sup> [23]. Hecht et al., en el 2006, realizaron modificaciones al método desarrollado por Carmella et al. [24], las cuales consistieron en la sustitución del paso de limpieza por HPLC por una SPE de intercambio catiónico y posterior análisis por GC-TEA [43]. Este trabajo, fue adaptado en el 2007 para el análisis de los extractos por HPLC-MS/MS por Scherer et al. [44] y Hecht et al. [45].

#### 4.2.3. Polímeros molecularmente impresos.

Los polímeros molecularmente impresos (MIP) son materiales extractantes utilizados en SPE, que no solo concentran a los analitos de interés, sino que también puede separarlos selectivamente en muestras reales. Los MIPs son polímeros sintéticos cuya principal ventaja es la posibilidad de preparar una fase extractante selectiva para un predeterminado analito o un grupo de analitos [17]. En el 2005, Xia et al. [42] reportaron la síntesis de una fase extractante diferente a las convencionales, que era preparada con una selectividad o memoria para una sola

molécula o clase de moléculas, en este caso para el NNAL y su aplicación para el análisis de muestras de orina. Ellos observaron que los resultados del método por HPLC-MS/MS aplicando el uso de esta tecnología fue lo suficientemente sensible para lograr la determinación de NNAL tanto en fumadores activos como en no fumadores[42]. Tomando como antecedente el trabajo de Xia et al, en el 2009, Shah et al.[47] en el 2009, realizaron pequeñas modificaciones al método, las cuales consistieron en realizar la elución mediante centrifugación con lo cual se garantizó la uniformidad de la velocidad de elución y se redujo el 50% del tiempo empleado en el método original. En ese mismo año, 2009, Kavvadias et al.[48] reportaron el análisis simultáneo de cuatro TSNAs: NNAL, N-nitrosoanabasina (NNN), N-nitrosoanabazina (NAB) y N-nitrosoanatabina (NAT), por HPLC-MS/MS; la preparación de las muestras consistió en un proceso de SPE con polímeros molecularmente impresos de 6 mL de orina y se realizó una SPE de intercambio catiónico para enriquecer el extracto.

#### 5. Perspectivas para el análisis del NNAL.

La extracción líquido-líquido ha sido la técnica de preparación de muestra predominante en el análisis de NNAL y NNAL-Glu; actualmente el uso de polímeros molecularmente impresos ha dado buenos resultados; sin embargo, la tendencia en los métodos bioanalíticos actuales es la búsqueda y desarrollo de nuevas tecnologías que permitan aumentar el número de muestras analizadas, así como disminuir la cantidad de muestra requerida, el tiempo de análisis, el costo por análisis y la cantidad de residuos generados. Para ello, los investigadores están ensayando estrategias tales como:

- a) *Nuevas técnicas de preparación de muestra.* La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) se ha aplicado en la extracción de NNAL en cabello[53], pero no se ha probado en la matriz de orina. También existen otras técnicas como la microextracción en fase sólida (SPME) la cual es un proceso de extracción no exhaustivo basado en el establecimiento del equilibrio de partición entre la matriz y la fase extractante; el proceso de extracción, purificación y concentración se realiza en un solo paso y puede ser una opción para el análisis de NNAL que es un compuesto semivolátil en muestras de orina, debido a que existen fibras de una amplia gama de polaridad y el uso de la modalidad de extracción por espacio de cabeza (HS) elimina la desventaja de la complejidad de la muestra. Otra opción podría ser el uso de nuevos formatos de las técnicas de extracción previamente utilizadas que requieran una menor cantidad de muestra y puedan realizarse múltiples tratamientos a la vez, esta última estrategia ya ha sido adoptada en el 2013 por

Carmella et al., quienes combinaron la SLE y SPE de intercambio iónico, en placas de 96 pozos[21]. Ellos demostraron que el método desarrollado era preciso y exacto y que además, podía ser aplicado a más de 2600 muestras, lo cual asegura la practicidad del método para aplicarlo en estudios epidemiológicos.

- b) *Automatización y acoplamientos en línea de las técnicas de preparación de muestras.* Los procedimientos de manipulación automática de muestras no sólo acortan el total de tiempo de análisis, también suelen proporcionar una mayor precisión y exactitud en relación con las técnicas manuales[57]. En el 2011, Shah et al. desarrollaron un sistema de extracción con columnas capilares de microflujo en línea. La fase estacionaria utilizada, consistió en polímeros molecularmente impresos. La ventaja reportada por los autores fue la disminución del costo de análisis ya que las columnas capilares contienen menor cantidad de fase extractante y una misma columna puede ser utilizada para el análisis de hasta 300 muestras[51].
- c) *Reducción de los pasos del análisis.* La eliminación o sustitución de los pasos limitantes de los métodos bioanalíticos es factible al contar con sistemas analíticos más avanzados, como en el trabajo reportado por Yao et al. en 2013, quienes realizaron la determinación del NNAL libre y el NNAL-Glu, determinando la concentración de NNAL-N-Glu y NNAL-O-Glu sin el tratamiento de hidrólisis enzimática y extrayendo la muestra por LLE y SPE de intercambio catiónico y el análisis por HPLC-MS/MS. Los autores compararon el método desarrollado con los métodos enzimáticos reportados por Shah et al.[51] y Hou et al.[52] y observaron una variación aceptable en los resultados de -8.39 % a 13.38 % para el NNAL y de -3.04 % a 21.54 % para el NNAL total[53].
- d) *Derivatización.* Este tipo de tratamiento involucra una modificación química del analito de interés para mejorar su volatilidad, estabilidad térmica o mejorar su detección[15, 16]. En los métodos de análisis por GC mencionados anteriormente, se utilizó la derivatización para hacer al NNAL más volátil y en otros por HPLC-MS/MS para hacerlo menos polar y por lo tanto mejorar la separación de cualquier interferencia remanente. En el 2011, Bhat et al. desarrollaron un método para la determinación de NNAL que involucraba dos extracciones líquido-líquido para la separación de NNAL, la derivatización con acetonitrilo y yoduro de n-propilo y finalmente, una purificación por SPE de intercambio catiónico. El tipo de agente derivatizante utilizado fue de isótopos estables, esto mejoró 20 veces la sensibilidad para la



detección y cuantificación del NNAL ya que también facilitó la limpieza del extracto por SPE de modo mixto. Esta técnica de análisis también puede ser aplicado a otras nitrosaminas como la N-nitrosoanatabina, N-nitrosoanabasina y N-nitrosonornicotina[50].

- e) *Liofilización de la muestra.* La cantidad de muestra requerida y la concentración esperada de los analitos son las consideraciones principales al momento de plantear y desarrollar métodos bioanalíticos. En el caso de la determinación de NNAL y NNAL-Glu se observó que los primeros métodos desarrollados involucraban grandes volúmenes de muestra, que conforme evolucionaban y aparecían técnicas de preparación de muestras innovadoras, fueron disminuyendo. Cuando no es posible alcanzar niveles de concentración del analito adecuados para la sensibilidad del método se puede recurrir a la liofilización de la muestra. En los artículos considerados para esta revisión, no se ha encontrado reportes de la aplicación de la liofilización como parte de la preparación de muestra. Pero esta técnica puede ser empleada para el análisis del NNAL y NNAL- Glu en muestras de orina ya que permite la preconcentración del analito, realiza un cambio de solvente para asegurar la compatibilidad de los pasos de separación-detección y mejora la estabilidad del analito en el almacenamiento y el análisis [58].

## 6. Conclusión

En la presente revisión se ha podido visualizar el avance en el estudio del NNAL y su forma conjugada (NNAL-Glu). Debido a la complejidad de las muestras biológicas, en este caso la orina, se han desarrollado múltiples métodos bioanalíticos, siendo en un inicio, laboriosos, multietapas, donde el análisis de un conjunto de muestras podía tardar cerca de 1 semana. El tiempo de análisis ha podido disminuir debido a la aparición de nuevas técnicas tanto de preparación de muestra como analíticas donde las técnicas de análisis cromatográfico han aumentado su sensibilidad y con el empleo de técnicas de preparación de muestras con menor cantidad de pasos o menor tiempo de desarrollo con lo que se obtienen resultados comparables a los primeros métodos reportados. Aún hay técnicas de preparación de muestras que no se han explorado para el análisis de NNAL y NNAL-Glu en orina y cuyas eficiencias podrían ser prometedoras como la DLLME y la SPME. El principal interés de desarrollar metodologías de alta eficiencia que permitan el análisis rápido y económico de un mayor número de muestras, es su aplicación en estudios epidemiológicos; debido a que su cuantificación permitirá el establecimiento de los perfiles toxicogénicos de personas con exposición al

humo del tabaco de primera o segunda mano, así como el poder predictivo de la relación NNAL-Glu-NNAL del desarrollo de afecciones pulmonares.

## 6. Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud. *Informe OMS sobre la epidemia mundial de tabaquismo*, 2008: plan de medidas MPOWER; Francia, 2008.
2. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. <http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/tabaco/dejar-de-fumar> (accessed November 7, 2013).
3. U.S. Department of Health and Human Services. *Children and Secondhand Smoke Exposure Excerpts from the Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General*; Atlanta, GA, 2007.
4. Guerrero-López, C. M.; Muños-Hernández, J. A.; C, M.; Miera-Juárez, B. S. De; Reynales-Shigematsu, L. M.; C, D. *Salud Publica Mex.* **2013**, 55, 276–281.
5. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz; Instituto Nacional de Salud Pública; Secretaría de Salud. *Encuesta Nacional de Adicciones 2011: Reporte de Tabaco*; INPRFM: México DF, México, 2012.
6. Strimbu, K.; Tavel, J. A. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2010**, 5, 463–6.
7. Gil, F.; Pla, A. *J. Appl. Toxicol.* **2001**, 255, 245–255.
8. Pérez Trullén, A.; Bartolomé, C.; Barrueco, M.; Herrero, I.; Jiménez, C. *Prev. Tab.*, **8**, **2006**, 164–173.
9. Xia, Y.; Bernert, J. T.; Jain, R. B.; Ashley, D. L.; Pirkle, J. L. *Biomarkers*, **2011**, 16, 112–9.
10. Hecht, S. S.; Hoffmann, D. *Carcinogenesis*, **1988**, 9, 875–884.
11. International Agency for Research on Cancer. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N - Nitrosamines*; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2007; Vol. 89.
12. Schrader, E.; Hirsch-Ernest, K.; Scholz, E.; Kahl, G. F.; Foth, H. *Drug Metab. Dispos.* **2000**, 28, 180–185.
13. Ren, Q.; Murphy, S. E.; Zheng, Z. **2000**, 28, 1352–1360.
14. Wiener, D.; Doerge, D. R.; Fang, J.; Upadhyaya, P.; Lazarus, P. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, 32, 72–79.
15. Chen, Y.; Guo, Z.; Wang, X.; Qiu, C. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1184, 191–219.
16. Smith, R. M. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000, 3–27.
17. Nováková, L.; Vlcková, H. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 656, 8–35.
18. Kataoka, H. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2003**, 22, 232–244.

19. Shah, K. a.; Karnes, H. T. *Crit. Rev. Toxicol.* **2010**, *40*, 305–327.
20. Byrd, G. D.; Ogden, M. W. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 98–107.
21. Carmella, S. G.; Ming, X.; Olvera, N.; Brookmeyer, C.; Yoder, A.; Hecht, S. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 1209–17.
22. Carmella, S. G.; Akerkar, S.; Hecht, S. S. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 721–724.
23. Bernert, J. T.; Jain, R. B.; Pirkle, J. L.; Wang, L.; Miller, B. B.; Sampson, E. J. *Nicotine Tob. Res.* **2005**, *7*, 729–38.
24. Carmella, S. G.; Han, S.; Fristad, A.; Yang, Y.; Hecht, S. S. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2003**, *12*, 1257–1261.
25. Orden, R. Van. Advantages and Disadvantages of High- end Mass Spectrometry in a Toxicology Lab. [http://www.chem.agilent.com/Library/slide presentation/Public/Advantages\\_disadvantages\\_of\\_High-end\\_MS\\_in\\_Toxicology\\_Lab.pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/slide presentation/Public/Advantages_disadvantages_of_High-end_MS_in_Toxicology_Lab.pdf).
26. Hecht, S. S.; Carmella, S. G.; Murphy, S. E.; Akerkar, S.; Brunnemann, K. D.; Hoffmann, D. *N. Engl. J. Med.* **1993**, *329*, 1543–1546.
27. Carmella, S.; Akerkar, S.; Richie, J. J.; Hecht, S. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1995**, *4*, 635–642.
28. Taioli, E.; Garbers, S.; Bradlow, H.; Carmella, S.; Akerkar, S.; Hecht, S. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1997**, *6*, 517–522.
29. Parsons, W. D.; Carmella, S. G.; Akerkar, S.; Bonilla, L. E.; Hecht, S. S. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1998**, *7*, 257–60.
30. Hecht, S. S.; Carmella, S. G.; Chen, M.; Koch, J. F. D.; Miller, A. T.; Murphy, S. E.; Jensen, J. A.; Zimmerman, C. L.; Hatsukami, D. K. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 590–596.
31. Lackmann, G. M.; Salzberger, U.; Töllner, U.; Chen, M.; Carmella, S. G.; Hecht, S. S. *J. Natl. Cancer Inst.* **1999**, *91*, 459–65.
32. Anderson, K. E.; Carmella, S. G.; Ye, M.; Bliss, R. L.; Le, C.; Murphy, L.; Hecht, S. S. *J. Natl. Cancer Inst.* **2001**, *93*, 5–8.
33. Hecht, S. S.; Ye, M.; Carmella, S. G.; Fredrickson, A.; Adgate, J. L.; Greaves, I. A.; Church, T. R.; Ryan, A. D.; Mongin, S. J.; Sexton, K. *Cancer Epidemiol. biomarkers Prev.* **2001**, *10*, 1109–1116.
34. Hecht, S. S.; Carmella, S. G.; Ye, M.; Le, K.; Jensen, J. A.; Zimmerman, C. L.; Hatsukami, D. K. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 129–134.
35. Anderson, K. E.; Kliris, J.; Murphy, L.; Carmella, S. G.; Han, S.; Link, C.; Bliss, R. L.; Puumala, S.; Murphy, S. E.; Hecht, S. S. *Cancer Epidemiol. biomarkers Prev.* **2003**, *12*, 1544–1546.
36. Murphy, S. E.; Link, C. A.; Jensen, J.; Le, C.; Puumala, S. S.; Hecht, S. S.; Carmella, S. G.; Losey, L.; Hatsukami, D. K. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2004**, *13*, 1617–1623.
37. Richie, J. J.; Carmella, S.; Muscat, J.; Scott, D.; Akerkar, S.; Hecht, S. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1997**, *6*, 783–790.
38. Stepanov, I.; Hecht, S. S.; Duca, G.; Mardari, I. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2006**, *15*, 7–11.
39. Murphy, S.; Carmella, S.; Idris, A.; Hoffmann, D. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1994**, *3*, 423–428.
40. Kresty, L. A.; Carmella, S. G.; Borukhova, A.; Akerkar, S. A.; Gopalakrishnan, R.; Harris, R. E.; Stoner, G. D.; Hecht, S. S. *Cancer Epidemiol. biomarkers Prev.* **1996**, *5*, 521–525.
41. Carmella, S. G.; Le, K.; Upadhyaya, P.; Hecht, S. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 545–550.
42. Xia, Y.; McGuffey, J. E.; Bhattacharyya, S.; Selligren, B.; Yilmaz, E.; Wang, L.; Bernert, J. T. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7639–45.
43. Hecht, S. S.; Carmella, S. G.; Le, K.-A.; Murphy, S. E.; Boettcher, A. J.; Le, C.; Koopmeiners, J.; An, L.; Hennrikus, D. J. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2006**, *15*, 988–92.
44. Scherer, G.; Engl, J.; Urban, M.; Gilch, G.; Janket, D.; Riedel, K. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *47*, 171–183.
45. Hecht, S. S.; Carmella, S. G.; Murphy, S. E.; Riley, W. T.; Le, C.; Luo, X.; Mooney, M.; Hatsukami, D. K. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2007**, *16*, 1567–72.
46. Jacob, P.; Havel, C.; Lee, D.-H.; Yu, L.; Eisner, M. D.; Benowitz, N. L. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8115–21.
47. Shah, K. A.; Halquist, M. S.; Karnes, H. T. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 1575–1582.
48. Kavvadias, D.; Scherer, G.; Urban, M.; Cheung, F.; Errington, G.; Shepperd, J.; McEwan, M. J. *Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 1185–92.
49. Ashley, D. L.; O'Connor, R. J.; Bernert, J. T.; Watson, C. H.; Polzin, G. M.; Jain, R. B.; Hammond, D.; Hatsukami, D. K.; Giovino, G. A.; Cummings, K. M.; McNeill, A.; Shahab, L.; King, B.; Fong, G. T.; Zhang, L.; Xia, Y.; Yan, X.; McCraw, J. M. *Cancer Epidemiol. biomarkers Prev.* **2010**, *19*, 1389–98.
50. Bhat, S. H.; Gelhaus, S. L.; Mesaros, C.; Vachani, A.; Blair, I. A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 115–121.
51. Shah, K. A.; Peoples, M. C.; Halquist, M. S.; Rutan, S. C.; Karnes, H. T. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *54*, 368–378.
52. Hou, H.; Zhang, X.; Tian, Y.; Tang, G.; Liu, Y.; Hu, Q. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *63*, 17–22.
53. Yao, L.; Zheng, S.; Guan, Y.; Yang, J.; Liu, B.; Wang, W.; Zhu, X. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *788*, 61–7.
54. Carmella, S. G.; Ming, X.; Olvera, N.; Brookmeyer, C.; Yoder, A.; Hecht, S. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 1209–1217.
55. Nave, F.; Cabrita, M. J.; da Costa, C. T. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1169*, 23–30.
56. Yagüe, C.; Bayarri, S.; Lázaro, R.; Conchello, P.; Ariño, A.; Herrera, A. *J. AOAC Int.* **2001**, *84*, 1561–1568.
57. Kataoka, H. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *373*, 31–45.
58. Fernández-Peralbo, M. A.; Luque de Castro, M. D. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2012**, *41*, 75–85.

## Información para autores

*Química Hoy Chemistry Sciences* es una revista editada por la Universidad Autónoma de Nuevo León a través de la Facultad de Ciencias Químicas, con el objetivo de publicar los avances más recientes en el área de la Química y todas sus ramas. Se invita a todos los investigadores a enviar artículos de investigación y comunicaciones cortas, así como artículos de revisión en áreas donde el autor ha trabajado y publicado significativamente.

Es indispensable que los artículos enviados sean originales y que no se hayan publicado en ninguna otra revista. Los artículos deben estar escritos de manera ordenada, en un lenguaje claro y conciso y no deben estar redactados en primera persona. Se aceptarán artículos en inglés.

No se aceptarán trabajos de divulgación.

Los autores deberán de ceder los derechos de autor a la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los artículos recibidos serán sujetos a un proceso de arbitraje doble ciego, por especialistas del área pertenecientes a instituciones tanto nacionales como extranjeras. Los criterios aplicables a la selección de textos serán: el rigor científico, la calidad y precisión de la información, el interés general del tema expuesto y la claridad del lenguaje.

### Lineamientos editoriales

No se aceptarán artículos que no cumplan con los siguientes lineamientos editoriales.

Para su consideración editorial es requisito enviar por correo electrónico el manuscrito en formato Word (.doc o .docx) a la siguiente dirección: [revistachemistrysciences@gmail.com](mailto:revistachemistrysciences@gmail.com)

El artículo deberá incluir las siguientes secciones: título del trabajo, autores, afiliación, resumen, palabras claves, introducción, parte experimental, resultados y discusión y referencias. Si se quiere agregar una sección con agradecimientos, esta deberá ir antes de las referencias.

Todo el manuscrito deberá ir con tipografía Times New Roman de 11 puntos a espacio sencillo. El resumen deberá tener una extensión máxima de 200 palabras e incluir un máximo de cinco palabras claves, tanto el resumen como las palabras claves deberán ir en español y en inglés. Las figuras deberán incluirse dentro del manuscrito y adicionalmente enviar los archivos originales en formato .tif o .jpg y con una resolución de al menos 300 dpi. Numerar las referencias entre corchetes dentro del manuscrito y deberán aparecer en el orden en que fueran citadas en la sección de referencias. Para las referencias deberá

usarse los estilos recomendados por la American Chemical Society (más información: <http://pubs.acs.org/userimages/ContentEditor/1246030496632/chapter14.pdf>). Algunos ejemplos se muestran a continuación:

#### Artículos:

1. Larabee, D. C.; Reynolds, T. Y.; Hochberg, R. B. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 1802-1814.

#### Libros:

2. Beall, H.; Trimbur, J. *A Short Guide to Writing about Chemistry*, 2da. ed.; Longman: New York, 2001; pp 17-32.

#### Tesis:

3. King, K. J. Development of a Pressurized System for Oxidation Studies of Volatile Fluids. Tesis de Maestría, The Pennsylvania State University, State College, PA, Marzo de 1983.

#### Patentes:

4. Sheem, S. K. Low-Cost Fiber Optic Pressure Sensor. U.S. Patent 6,738,537, 18 de Mayo de 2004.

#### Sitios de internet:

5. U.S. Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov> (accesado el 24 de abril de 2011).

Para cualquier comentario o duda, estamos a su disposición

Revista *Química Hoy Chemistry Sciences*

Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Tel: (81) 83294000 Ext. 6240

Correo electrónico: [revistachemistrysciences@gmail.com](mailto:revistachemistrysciences@gmail.com)  
[www.uanl.mx/publicaciones/quimica-hoy.html](http://www.uanl.mx/publicaciones/quimica-hoy.html)