

Validación de un método analítico de determinación de dopamina por cromatografía líquida de alta resolución

Validation of analytical method for dopamine determination by high-performance liquid chromatography

Lic. Daylín Hernández Falcón, Dra.C. Asela Fernández García, Dr.C. Oscar Ernesto Ledea Lozano

Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la dopamina es una hormona endógena del grupo de las catecolaminas que se emplea como fármaco para simular la acción del sistema nervioso simpático, promueve el incremento de la frecuencia cardíaca y la presión arterial. Sin embargo; este medicamento presenta un alto potencial genotóxico y está asociado al tratamiento de enfermedades como la esquizofrenia y el Mal del Parkinson. Por tal motivo ha resultado de gran interés su determinación en las aguas residuales que emergen de su producción.

Objetivo: validar un método para la cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución de la dopamina presente en disoluciones acuosas.

Métodos: la validación se llevó a cabo empleando una columna RP-18 de 250 × 4,6 mm, 5 µm; fase móvil: NaH₂PO₄ al 1 %/CH₃OH (90/10); flujo: 1,0 mL/min y un detector ultravioleta visible a 280 nm. Se calcularon los límites de detección y cuantificación, y se evaluó la estabilidad del medicamento en las condiciones de análisis.

Resultados: se obtuvieron pruebas documentadas que demuestran que el método resultó ser lineal ($r = 0,999$ y $r^2 = 0,998$), exacto y preciso en el intervalo de 1×10^{-4} mol/L a 2×10^{-3} mol/L; además, fue selectivo frente a los posibles productos de degradación obtenidos mediante la ozonización.

Conclusiones: el método estudiado resulta lineal, preciso y exacto en el intervalo de concentraciones analizado, lo que permite la determinación de dopamina en solución acuosa.

Palabras clave: dopamina, cromatografía líquida de alta resolución, validación.

ABSTRACT

Introduction: dopamine is an endogenous hormone in the catecholamine group, which is used to simulate the sympathetic nervous system action and to raise the heart rate and the blood pressure. However, this drug has high genotoxicity and is associated with the treatment of diseases such as schizophrenia and Parkinson's disease. For this reason, the determination of dopamine in wastewaters coming from its production has been of great interest.

Objective: to validate a high performance liquid chromatography method for quantification of dopamine present in aqueous solutions.

Methods: the validation used a RP-18 250 × 4.6 mm 5 µm column, mobile phase: 1 % NaH₂PO₄ /CH₃OH (90/10), 1.0 mL/min flow rate and a visible ultraviolet detector at 280 nm. Detection limits and quantitation were estimated in addition to evaluating the drug stability under the analysis conditions.

Results: documented evidence showed that the method proved to be linear ($r = 0.999$ and $r^2 = 0.998$), accurate and precise in the range of 1×10^{-4} mol/L to 2×10^{-3} mol/L. This method was also selective against potential degradation products from ozonization.

Conclusions: the studied method was linear, precise and accurate in the range of tested concentrations, allowing the dopamine determination in aqueous solutions.

Keywords: dopamine, High Performance Liquid Chromatography, validation.

INTRODUCCIÓN

La dopamina o 2-(3,4-dihidroxifenil) etilamina; 3-hidroxitiramina, es una hormona endógena del grupo de las catecolaminas. Se genera en el hipotálamo y actúa como neurotransmisor e intermediario en la síntesis de la norepinefrina y la epinefrina en el sistema nervioso central y periferia. Una gran variedad de enfermedades como la esquizofrenia y el mal del Parkinson están dadas por aberraciones en la neurotransmisión de la dopamina.^{1,2}

Como fármaco, la dopamina actúa como simpaticomimético (simulando la acción del sistema nervioso simpático), promoviendo el incremento de la frecuencia cardíaca y la presión arterial, a su vez, puede producir efectos deletéreos como taquicardia o hipertensión arterial. Promueve el incremento de la fuerza de la contracción del músculo cardíaco, y provoca dilatación de los vasos sanguíneos renales.³ Se ha demostrado que la dopamina presenta un alto potencial genotóxico ya que modifica y daña el ADN.⁴ Por tales motivos ha resultado de gran interés su determinación y estudio con diferentes métodos y condiciones y en particular en aquellas relacionadas con el tratamiento de los residuales de la industria farmacéutica para la conservación de medio ambiente.

Entre los métodos analíticos que han sido empleados para la determinación de dopamina están la espectroscopia infrarroja-tranformada de Fourier, la fluorescencia y el uso de un electrodo de carbono vítreo modificado.^{5,6} En cuanto a los métodos cromatográficos se destaca el uso de la cromatografía de gases para la determinación de dopamina proveniente de diferentes matrices^{7,8} y de la cromatografía líquida junto a la detección electroquímica o con ionización electrospray y espectrometría de masas con el mismo fin.⁹⁻¹¹ Otros métodos como

la detección amperométrica usando un biosensor de tirosina para la determinación de dopamina se han desarrollado recientemente.¹²

El desarrollo riguroso de un método analítico lleva aparejado un proceso de validación que asegura la confiabilidad de los resultados. El objetivo de este trabajo fue validar un método analítico de determinación de dopamina por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), debido al interés de estudiar la presencia de dicho medicamento en aguas residuales provenientes de plantas productoras de este y su comportamiento frente a un proceso degradativo usualmente empleado en el tratamiento de las aguas residuales.

MÉTODOS

REACTIVOS

Los reactivos empleados para el desarrollo experimental fueron de grado analítico. Las disoluciones patrón de dopamina se prepararon con un estándar de referencia de los Laboratorios Farmacéuticos Eduardo Reyes Canto, La Habana. Se empleó dihidrogeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) de la BDH y metanol (CH_3OH) de la Merck para cromatografía líquida. Los ajustes de pH se realizaron con ácido fosfórico e hidróxido de sodio, ambos de la Merck.

INTRUMENTACIÓN

El análisis de la dopamina fue llevado a cabo en un cromatógrafo líquido de alta resolución equipado con una bomba LKB 2150 (LKB, Bromma, Sweden), un inyector manual con *loop* de 20 μL (Rheodyne 7725i), un detector espectrofotométrico de longitud de onda variable Knauer K-2501 (Knauer, Germany), una interfase Knauer, que permite la adquisición de los cromatogramas mediante el software Eurochrom 2000 (Knauer, Germany). La determinación se realizó en fase reversa y modo isocrático. Se empleó una mezcla KH_2PO_4 0,1 mol/L- CH_3OH (90:10) como fase móvil y una columna RP 18 de 250 x 4 mm (5 μm), Grace Vydac. Se trabajó con una velocidad de flujo de 1 mL/min. La longitud de onda para la detección UV se seleccionó tomando la de máxima absorvancia en un espectro UV (200-600 nm) de una disolución de dopamina. Se empleó un espectrofotómetro Cintral 101 para este fin.

El pH fue medido con un pHmetro-conductímetro InoLab. En todos los casos se realizaron las determinaciones a temperatura ambiente (25 °C).

Se emplearon dos programas de computación: Microsoft® Excel 2007 y el programa estadístico STATGRAPHICS Plus 5.0 para el procesamiento estadístico de los resultados.

PARTE EXPERIMENTAL

El procedimiento para la determinación de dopamina por CLAR fue validado teniendo en cuenta los parámetros de linealidad, precisión (repetibilidad, reproducibilidad, robustez), exactitud y selectividad, según las guías Harmonised Tripartite Guideline (ICH) 2005, World Health Organization (WHO) 2006 y

EURACHEM 1998.¹³⁻¹⁵ Además se evaluó el rango y la sensibilidad del método así como la estabilidad de la muestra en las condiciones de análisis.

Linealidad: los experimentos se llevaron a cabo mediante el análisis de disoluciones estándar de dopamina por triplicado (0,1; 0,5; 0,8; 1; 1,2; 1,5; 2×10^{-3} mol/L) en un intervalo de 10-200 % de la cantidad teórica declarada como 100 % (1×10^{-3} mol/L).

Se empleó el método de regresión simple para la obtención de la curva de calibración. Además se determinó r coeficiente de correlación lineal (r), coeficiente de determinación (r^2), intercepto (a), y pendiente (b), para el 95 % de confianza.

Criterios de aceptación:

- Ecuación de la recta: $y = bx + a$; $r \geq 0,99$ y $r^2 \geq 0,98$
- Prueba de hipótesis nula de la ordenada en el origen $a = 0$.
- Prueba de la hipótesis nula de la pendiente: $b = 0$. Se determinó a partir de una prueba ANOVA de la regresión, teniendo en cuenta la probabilidad asociada al valor de la pendiente, es decir, si la $p < 0,05$; el valor de "b" difiere significativamente de cero.

Además, la desviación estándar relativa de la pendiente ($S_{b\text{relativa}}$) debe ser menor del 2 %.

Adicionalmente, se determinó el error absoluto medio (MAE) que es el valor medio de los residuos y el estadístico Durbin-Watson (DW) que examina los residuos.

Sensibilidad: la evaluación de este parámetro se realizó estimando el límite de cuantificación (LC) y el límite de detección (LD) a partir de la curva de regresión. Los LD y LC fueron calculados según la guía ICH como $3,3 \vartheta$ (pendiente de la curva) y 10ϑ (pendiente de la curva), respectivamente, donde ϑ es la desviación estándar del intercepto.¹³

Exactitud: se determinó por la adición de cantidades conocidas de dopamina a una disolución y la posterior determinación de la muestra. La exactitud como porcentaje del recobrado fue evaluada a diferentes niveles de concentración por triplicado (0,5; 1 y $1,5 \times 10^{-3}$ mol/L). Se incluyó la determinación del recobrado medio y del coeficiente de variación (CV) total.

Recobrado (R) = $\frac{\text{Concentración recobrado real}}{\text{Concentración añadida}} \times 100$

Criterios de aceptación: $97 \% \leq R \leq 103 \%$ y $CV \leq 2,0 \%$.

Además, se realizó la prueba G de Cochran y la prueba de la t de Student, siendo n-1 los grados de libertad y $\alpha = 0,05$.

Precisión: La precisión de los ensayos fue determinada en término de repetibilidad, reproducibilidad intermedia y robustez.

- Repetibilidad: se evaluaron muestras con la concentración equivalente al 100 %, un valor bajo y otro alto, comprendidos dentro del intervalo de la linealidad del método, 50 y 150 % respectivamente. Se calculó el CV en estos tres niveles de concentración y se comparó con el criterio establecido. Las determinaciones fueron

realizadas por el mismo analista, por sextuplicado, en las mismas condiciones de trabajo. Criterio de aceptación: $CV \leq 1,5 \%$.

- Reproducibilidad intermedia: se determinó por el análisis de muestras de 1×10^{-3} mol/L bajo las mismas condiciones y en el mismo laboratorio, pero días diferentes por dos analistas diferentes. Se calculó el CV total. Criterio de aceptación: $CV \leq 2,0 \%$. Además, se realizó la prueba F de Fisher y la t de Student, para comparar varianzas y medias, respectivamente.

- Robustez: se analizaron muestras de concentración 1×10^{-3} mol/L por triplicado y se evaluó la influencia de la variación de tres factores que pudieran incidir en los resultados como son: variación del pH de la fase móvil en $\pm 0,2$ unidades, variación de la composición orgánica de la fase móvil en $\pm 2 \%$ y el empleo de otra columna de separación, Lichrospher® 100 RP18 (5 μm), Merck. Se realizaron las pruebas estadísticas ANOVA y Cochran.

Rango: se estableció el intervalo en que se cumplieron los criterios de linealidad, exactitud y precisión del método estudiado.

Selectividad: Se preparó una disolución de DA de 1×10^{-3} mol/L y la misma fue sometida a condiciones favorables para su degradación, como la oxidación mediante la ozonización, determinando así la posibilidad de la aparición de interferencias en la determinación de dicho medicamento por la presencia de los productos de degradación.

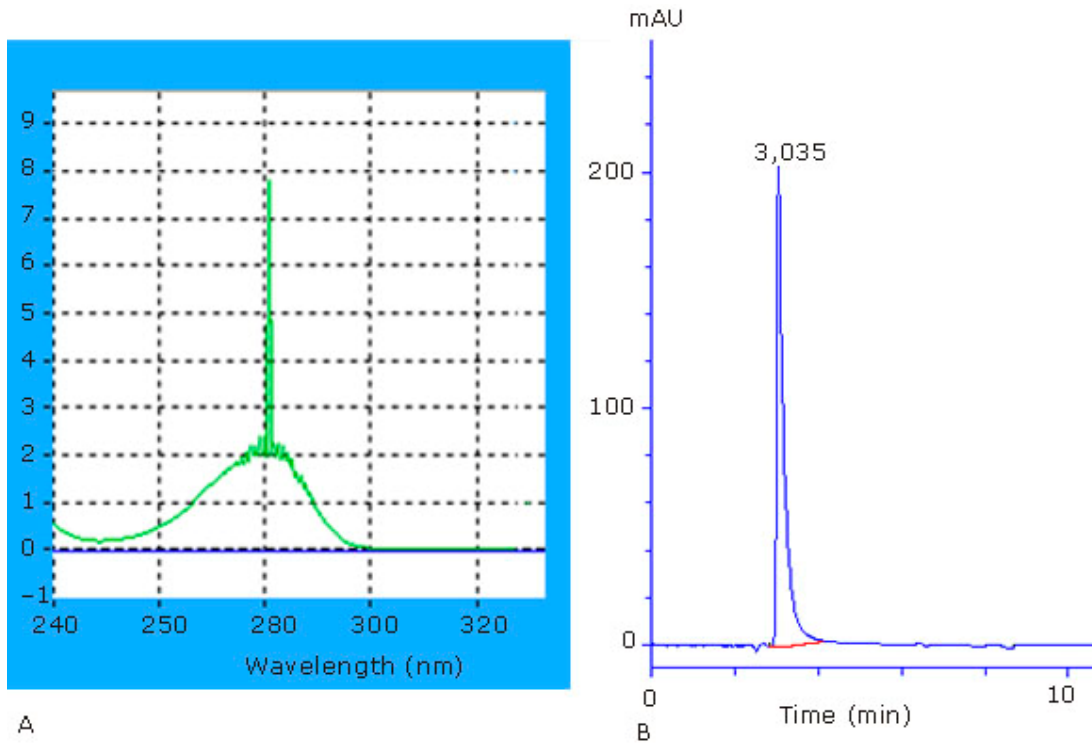
Criterio de aceptación: No deben aparecer señales interferentes atribuidas a los posibles productos de degradación, que coincidan con el tiempo de retención del patrón del analito, o que estén muy cercanas a la zona de interés analítico para la dopamina.

Estabilidad de las disoluciones patrón de dopamina: teniendo en cuenta que la dopamina se degrada por diversos factores o puede hidrolizarse, fue necesario establecer el tiempo y la temperatura en la cual la disolución de dopamina es estable para su posterior uso. Para ello, se midieron tres disoluciones patrones de 1×10^{-3} mol/L de dopamina a las 0, 4, 12, 24, 36 y 48 h después de su preparación. El mismo procedimiento se realizó a temperatura ambiente y manteniendo las muestras en refrigeración a 10°C .

RESULTADOS

En la [figura 1](#) (A) se muestra el espectro UV obtenido para una muestra patrón de dopamina de concentración de 1×10^{-3} mol/L. En este se puede observar un máximo de absorción a 280 nm, por lo que los análisis empleando CLAR se realizaron a esta longitud de onda. La absorbancia fue mínima en el intervalo de los 300-600 nm. El cromatograma obtenido para la misma muestra se presenta en la [figura 1](#) (B). El tiempo de retención, ancho y altura del pico cromatográfico son adecuados para realizar la determinación de DA con el método propuesto.

La curva de calibración obtenida al graficar el área integrada bajo el pico cromatográfico contra la concentración de las muestras se presenta en la [figura 2](#).



A: espectro UV. B: cromatograma de CLAR.

Fig. 1. Disolución patrón de dopamina.

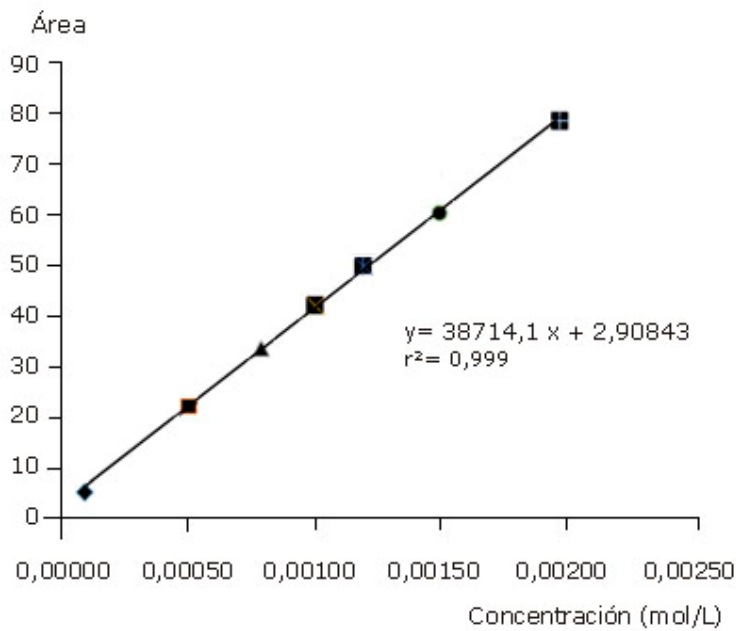


Fig. 2. Curva de calibración de dopamina (1×10^{-4} mol/L - 2×10^{-3} mol/L).

Los resultados correspondientes a la validación de este método para la linealidad, exactitud y precisión (repetibilidad, reproducibilidad intermedia) se resumen en la [tabla 1](#), donde F_{exp} , t_{exp} , F_{tab} y t_{tab} se refieren al valor con respecto a F Fisher y t de Student tabulados y determinados experimentalmente. En la [tabla 2](#) se muestran los resultados obtenidos para la determinación de la robuetez del método, manteniendo la velocidad de flujo de 1 mL/min, la longitud de onda a 280 nm y variando un solo parámetro a la vez, el cual es señalado en la segunda columna de la [tabla 2](#).

Tabla 1. Resumen de resultados de la validación del método

Parámetro	Resultados	Criterios
Linealidad del método	$y = 38\,714,1x + 2,908$ $r = 0,99$; $r^2 = 0,99$ ANOVA $p = 0,00$ $Sb_{relativa} = 0,01$	$y = bx + a$ $r \geq 0,99$, $r^2 \geq 0,98$ ANOVA $\leq 0,05$, significativa $Sb_{relativa} < 2\%$
Exactitud	$R_{total} = 100,97\%$; $CV = 1,89\%$ $G_{tab} = 0,87$ $G_{exp} = 0,35$ $n = 9 \rightarrow t_{exp} = 1,53$ $t_{tab} = 2,31$	$R_{total} = 97-103\%$; $CV \leq 3\%$ $G_{exp} < G_{tab}$; $\alpha = 0,05$; $K = 3$; $n = 3$ Prueba de la t de Student (comparación del R con el 100 %) $t_{exp} < t_{tab}$
Repetibilidad	$CV_{50\%} = 1,17\%$; $CV_{100\%} = 0,98\%$ $CV_{150\%} = 0,46\%$	$CV \leq 1,5\%$
Reproducibilidad intermedia	$CV_{total} = 0,87\%$ $F_{exp} = 1,35$; $F_{tab} = 4,60$ $t_{exp} = 0,96$; $t_{tab} = 3,74$	$CV_{total} \leq 3\%$ $F_{exp} < F_{tab}$ $t_{exp} < t_{tab}$
Sensibilidad	$LC = 5,48 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ $LD = 1,66 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$	
Rango	10-200 %	

Tabla 2. Resultados de la robuetez del método de determinación de DA

Parámetro modificado	Condiciones	Recobrado medio (%)	Parámetros estadísticos
Sin modificaciones	Columna RP C18 GraceVydac FM: metanol-KH ₂ PO ₄ 0,1mol/L (10:90); pH 2,26	100	F = 0,84 p = 0,54 Cochran: 0,31 p = 0,85
Fase móvil (pH)	pH 2,06	100,26	
	pH 2,46	100,79	
Fase móvil (composición)	12 % metanol/88 % KH ₂ PO ₄	99,84	
	8 % metanol/92% KH ₂ PO ₄	100,73	
Cambio de columna	Lichrospher® 100 RP18; Merck	99,89	

El cromatograma obtenido luego de la ozonización se muestra en la [figura 3](#), en la que se observan dos productos de degradación P1 y P2. A partir de la separación cromatográfica aplicada se logró una adecuada separación del analito y sus productos.

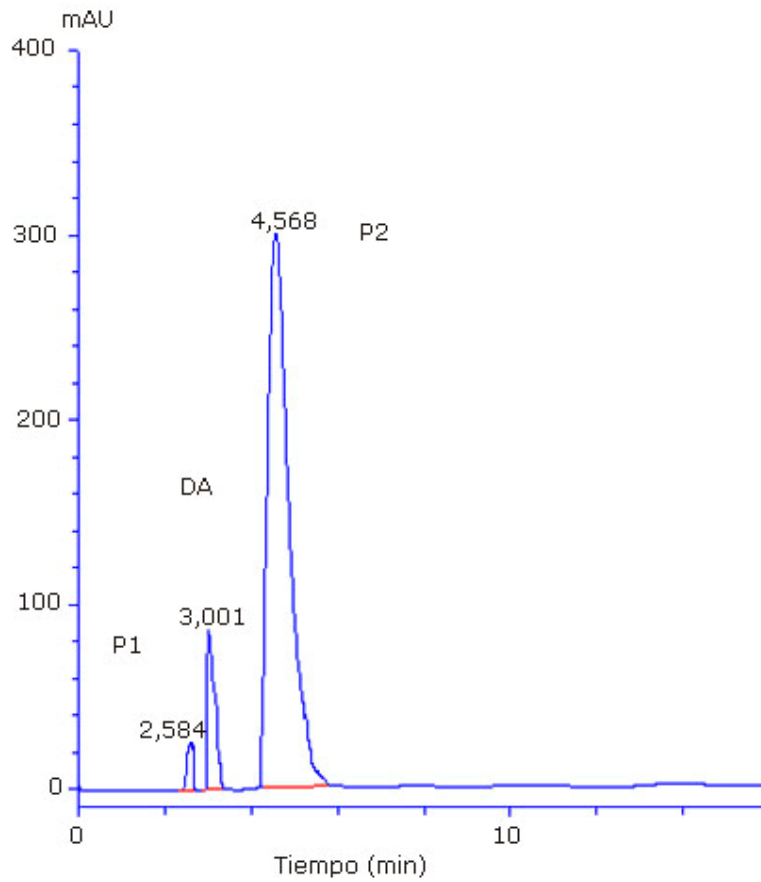


Fig. 3. Cromatograma de la dopamina y sus productos de oxidación después de la ozonización.

Las muestras estudiadas no mostraron ninguna señal de degradabilidad o hidrólisis durante los primeros 48 h después de preparada la disolución, por lo que en todas las condiciones evaluadas los cromatogramas fueron similares al presentado con anterioridad (Fig. 1) (B). El valor F de la tabla ANOVA fue de 1,49; con $p= 0,31$ siendo este mayor que 0,05 por lo que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos a las diferentes temperaturas durante las primeras 48 horas.

DISCUSIÓN

El sistema tuvo un comportamiento lineal en el intervalo de 10-200 %, ya que se cumplieron todos los criterios estadísticos establecidos al procesar los resultados por regresión lineal. Se obtuvo una elevada proporcionalidad entre la respuesta obtenida y la concentración del analito. Dado que la probabilidad estadística en la tabla ANOVA es inferior a 0,01, existe relación estadísticamente significativa entre área y concentración para un nivel de confianza del 99 %.^{13,15}

El estadístico r^2 indica que el modelo explica un 99,89 % de la variabilidad en área. El coeficiente de correlación indica una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra que la desviación típica de los residuos es 0,85.

El valor medio de los residuos (MAE) es de 0,67. Dado que la probabilidad estadística de DW es inferior a 0,05, hay indicio de una posible correlación serial.

Sensibilidad: el método fue suficientemente sensible para el propósito con que fue desarrollado, pues es capaz de detectar una cantidad equivalente al 5,50 % de degradación del principio activo.

Exactitud: el recobrado medio no excedió el límite de 97-103 %, por lo que el método fue exacto. Además el CV total quedó comprendido en el intervalo de aceptación. La G_{exp} fue menor que G_{tab} de la prueba G de Cochran, por lo que las varianzas de los tres niveles de concentración evaluados fueron equivalentes y no influyó el factor de concentración en la exactitud del método. Por su parte, la prueba t de Student corroboró la exactitud, ya que el valor obtenido fue inferior al tabulado, por lo que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre el recobrado medio y el 100 %. De modo que se puede afirmar que la técnica fue exacta y no se afectó por errores sistemáticos de forma significativa.^{13,16,17}

Precisión

- Repetibilidad: se obtuvieron CV bajos para la repetibilidad del método, inferiores en todos los casos al 1,5 % establecido como límite y se demostró la repetibilidad de la respuesta analítica.¹³⁻¹⁷

- Reproducibilidad intermedia: se obtuvo un CV inferior al criterio de aceptación. Este análisis se complementó con las pruebas estadísticas de Fisher y la t de Student donde la $F_{exp} < F_{tab}$ y $T_{exp} < T_{tab}$, por lo que no existieron diferencias significativas entre las precisiones de los analistas, independientemente del día en que se efectuó el ensayo. El conjunto de dichos resultados permitió asegurar que estos fueron homogéneos, lo que ratifica la precisión del método en estudio ya que los errores aleatorios no repercutieron apreciablemente.¹³⁻¹⁷

- Robustez: Puesto que la probabilidad estadística de la prueba de Fisher así como la prueba de Cochran es superior a 0,05 en ambos casos, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias y entre las desviaciones típicas para un nivel de confianza del 95 %, lo que demuestra la robustez del método.

Rango: cumplidas las especificaciones de linealidad, precisión y exactitud del método, queda establecido que el intervalo analítico es de 10-200 %, lo que verifica que el método analítico es adecuado para su aplicación a muestras que contienen principio activo a concentraciones dentro del intervalo de concentración definido.

Selectividad: el procedimiento cromatográfico empleado garantiza la adecuada selectividad del método frente a las posibles interferencias en un proceso de degradación. Por tanto, el método puede emplearse para la determinación de DA frente a sus productos de degradación P1 y P2.

El método estudiado bajo las condiciones descritas, demostró ser lineal, preciso y exacto, con un límite de detección de $5,48 \times 10^{-5}$ mol/L y de cuantificación de $1,66 \times 10^{-4}$ mol/L. Las muestras pueden almacenarse a temperatura ambiente o inferior y ser analizadas en las primeras 48 h después de su preparación. La metodología empleada permite la determinación de dopamina en disolución acuosa y puede ser útil para realizar estudios de degradación del medicamento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bahena R, Flores G, Arias JA. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. Rev Biomed. 2000;11(1):39-60.

2. Hornykiewicz O. Dopamine (3-hidroxytyramine) and brain function. *Pharmacol Rev.* 1996;18:925-64.
3. Meana JJ, García JA. Transmisión catecolaminérgica. Fármacos agonistas catecolaminérgicos. En: Flores J. *Farmacología Humana*. 5ta ed. España: Editorial Elsevier; 2008. p. 235-60.
4. Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *Mini-Review J Neurosci Res.* 1999;55:659-65.
5. Jing L, Haiyan D, Wanzhi W, Shenglian L. Spectrometric investigations on the binding of dopamine to bovine serum albumin. *Physics and Chemistry of Liquids.* 2012;50(4):453-64.
6. Sopsis Ch, Sukon P, Suwan Ch. Fabrication of Modified SWNTs/Glassy Carbon Electrode for the determination of dopamine. *Molecular Crystals and Liquid Crystals.* 2011;538(1):292-7.
7. Yar M, Ali L, Ali S, Ali A. Capillary gas chromatographic determination of dopamine by pre-column derivatization method using trifluoroacetylacetone as Derivatizing reagent. *J Chem Soc Pak.* 2010;32(6):781-5.
8. Musshoff F, Schmidt P, Dettmeyer R, Priemerb F, Jachauc K, Madeaa B. Determination of dopamine and dopamine-derived (R)-/(S)-salsolinol and norsalsolinol in various human brain areas using solid-phase extraction and gas chromatography/ mass spectrometry. *Forensic Science International.* 2000;113:359-66.
9. Syslová K, Rambousek L, Kuzma M, Najmanová V, Bubeníková V, Slamberová R, et al. Monitoring of dopamine and its metabolites in brain microdialysates: method combining freeze-drying with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2011;1218(21):3382-91.
10. Głód BK, Staczak KI. Application of RP-HPLC-ED assay to analysis of the blood of Parkinson's disease patients. *Acta Chromatog.* 2005;15:276-88.
11. El-Beqqali A, Kussak A, Abdel M. Determination of dopamine and serotonin in human urine samples utilizing microextraction online with liquid chromatography/electrospray tandem mass. *Spectrometry. J Sep Sci.* 2007;30:421-4.
12. Wang Y, Zhang X, Chen Y, Xu H, Tan Y, Wang S. Detection of Dopamine Based on Tyrosinase-Fe₃O₄ Nanoparticles-chitosan Nanocomposite Biosensor. *Am J Biomed Sci.* 2010;2(3):209-16.
13. ICH-Harmonised tripartite Guideline. Validation of analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 2005.
14. WHO-Technical Report Series No. 937. Appendix 4n Analytical Method Validation: 2006.
15. EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 1998.

16. Bonfilio R, Laignier EC, Benjamim M, Nunes HR. Analytical Validation of Quantitative High-Performance Liquid Chromatographic Methods in Pharmaceutical Analysis: A Practical Approach. Crit Rev Analyt Chem. 2012;42(1):87-100.

17. Kazusaki M, Ueda S, Takeuchi N, Ohgami Y. Validation of analytical procedures by high-performance liquid chromatography for pharmaceutical analysis. Chromatography. 2012;33(2):65-73.

Recibido: 10 de julio de 2014.

Aprobado: 15 de agosto de 2014.

Daylín Hernández Falcón. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC).
Ave. 25 esq. 158, Cubanacan, Playa, La Habana, Cuba.