

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Evaluación de métodos para inducir interferencia de ARN por medio de ARN de doble hebra en la expresión del gen RHBP (*Rhodnius* Heme-Binding Protein) en ninfas de *Rhodnius prolixus* Stahl 1859, vector de la enfermedad de Chagas

José Guillermo Juárez Valdez

Guatemala

2010

Evaluación de métodos para inducir interferencia de ARN por medio de ARN de doble hebra en la expresión del gen RHBP (*Rhodnius* Heme-Binding Protein) en ninfas de *Rhodnius prolixus* Stahl 1859, vector de la enfermedad de Chagas

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Evaluación de métodos para inducir interferencia de ARN por medio de ARN de doble hebra en la expresión del gen RHBP (*Rhodnius* Heme-Binding Protein) en ninfas de *Rhodnius prolixus* Stahl 1859, vector de la enfermedad de Chagas

Trabajo de investigación presentado
por José Guillermo Juárez Valdez
para optar al grado académico de Licenciado en Biología

Guatemala

2010

Vo. Bo. :

(f) _____
Dra. Pamela Marie Pennington

Tribunal Examinador:

(f) _____
Dra. Pamela Marie Pennington

(f) _____
Lda. María Margarita Palmieri Santisteban

(f) _____
Lda. Mabel Laline Taracena Oliva

Fecha de aprobación: Guatemala (Fecha de examen de graduación).

PREFACIO

Me inscribí en la carrera de Biología para dedicar la mayoría de mis cursos a estudiar los procesos y métodos de la biología molecular, mi tema de mayor interés desde el principio de mis estudios. A finales de mi tercer año se me presentó la oportunidad de laborar en el laboratorio de Chagas del Centro de Estudios en Salud de la UVG, lugar donde me habían informado se trabajaba mucho con este tipo de técnicas. Para mi conveniencia el proyecto donde laboraría me permitiría realizar mi tesis en alguno de los objetivos del proyecto. En un principio empecé cuidando la colonia de chinches *Rhodnius prolixus*, el trabajo más agotador y estresante que he tenido ya que cuidar y mantener una colonia de insectos toma mucho tiempo, dedicación y cariño. Luego de haber superado el establecimiento de la colonia proseguí a elaborar los experimentos para mi tesis, con la cual aprendí técnicas que, de otra manera, probablemente no hubiera aprendido. En sí este proyecto me ha hecho crecer como científico e investigador y darme cuenta que, para el éxito de un proyecto, se necesita la colaboración de todos sus integrantes, ya que si una parte no funciona, todas las otras se ven afectadas.

Quisiera agradecer a varias personas: a mis asesoras la Pamela Pennington por permitirme ser parte del laboratorio de Chagas y Mabel Taracena por ayudarme en los distintos experimentos elaborados. A Pedro Peralta por siempre brindarme su ayuda en el insectario en todos los detalles que necesité. A Alfonso Salam por enseñarme a clasificar, manipular y manejar la colonia de chinches. A Claudia Umaña por ayudarme en un principio con la colonia de chinches. A Gaby Silva por proveerme la proteína hemo-RHBP. A Lucía Ortiz y María Eugenia Castellanos por ser grandes compañeras de laboratorio y siempre brindarme su ayuda. Principalmente a Dios por brindarme tantas bendiciones y logros a través de los años. Finalmente quisiera agradecer a mi padre, madre y familia por brindarme su ayuda a lo largo de los años. A Silvana Caravantes por siempre darme su apoyo incondicional. Quiero dedicar esta tesis a mi abuelo, Francisco Guillermo Valdez Tíble, por todo su cariño, consejo y bendiciones que me dio a través de los años.

CONTENIDO

	Página
PREFACIO.....	vi
ÍNDICE.....	vii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xii

Capítulo

I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. Antecedentes.....	2
1. Información general.....	2
2. Epidemiología del vector.....	4
3. <i>Rhodnius</i> Heme-Binding Protein (RHBP).....	6
4. Interferencia de ARN (iARN).....	7
5. Cromatografía líquida de alta eficacia (High performance liquid chromatography o HPLC).....	9
B. Objetivos e hipótesis.....	10
1. Objetivo general.....	10
2. Objetivos específicos.....	10
3. Hipótesis.....	10
C. Justificación.....	11
II. MÉTODOS.....	13
A. Procedimiento.....	13
1. Insectos.....	13
2. Selección de organismos.....	13
3. Extracción y linealización de plásmidos.....	14
4. Síntesis de ARN de doble hebra (ARNdh).....	16
5. Ensayo de ingesta de ARNdh.....	17
6. Ensayo de inyección de ARNdh.....	18
7. Disección y extracción de hemolinfa.....	19
8. Análisis en HPLC.....	19
9. Análisis estadístico.....	20

III. RESULTADOS	22
A. Estandarización de la técnica de HPLC para la detección de la proteína RHBP en la hemolinfa	22
1. Método de reproducibilidad	22
2. Método de detección	23
B. Análisis de interferencia de ARNd _h en <i>R. prolixus</i>	25
1. Análisis de los pesos del consumo sanguíneo en el ensayo de ingesta (por vía oral).....	25
2. Análisis de los pesos de la ingesta sanguínea en el ensayo de inyección	28
3. Análisis de los pesos de la ingesta sanguínea entre tratamientos de los ensayos de ingesta e inyección	30
4. Análisis del peso relativo de ingesta sanguínea (mg sangre/mg de individuo) en los ensayos de ingesta e inyección.....	31
5. Análisis de las muestras de hemolinfa saturada mediante sus áreas de mAU para el ensayo de ingesta	35
6. Análisis de las muestras de hemolinfa mediante sus áreas de mAU para el ensayo de inyección.....	37
7. Análisis de la proteína RHBP en el d3 para el tratamiento Sangre sin ARNd _h en los ensayos de ingesta e inyección.....	40
8. Análisis de los efectos de interferencia de ARN sobre la muda de N3 a N4 en el ensayo de ingesta	41
IV. DISCUSIÓN	43
V. CONCLUSIONES.....	46
VI. RECOMENDACIONES.....	47
VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	48
VIII. ANEXOS	53
A. Cromatogramas de las muestras del ensayo de ingesta	53
B. Cromatogramas de las muestras del ensayo de inyección	88

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Departamentos con <i>R. prolixus</i> y porcentajes de individuos infectados con <i>T. cruzi</i> (Monroy <i>et al.</i> 2003)	5
Cuadro 2. Composición de la fase móvil para el HPLC	23
Cuadro 3. Estadística descriptiva de los valores de peso de ingesta sanguínea para el experimento de ingesta y el experimento de efectos de muda de N3 a N4	28
Cuadro 4. Estadística descriptiva de los valores de peso de ingesta sanguínea para el experimento de inyección.....	29
Cuadro 5. Estadística descriptiva de los valores de la dosis de sangre mg/ mg del peso sin alimentación de los individuos del ensayo de ingesta e inyección	34
Cuadro 6. Estadística descriptiva de los valores de las áreas mAU de los tratamientos para d3 y d7 del ensayo de ingesta	37
Cuadro 7. Estadística descriptiva de los valores de las áreas mAU de los tratamientos para d3 y d7 del ensayo de inyección	39
Cuadro 8. Estadística descriptiva del experimento de efectos de muda en el retraso de N3 a N4.....	41

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura1. <i>R. prolixus</i> en sus 5 estados ninfales hasta llegar a adulta.	3
Figura2. Ciclo infeccioso del <i>T. cruzi</i>	5
Figura3. Esquema que demuestra el mecanismo del silenciamiento mediante iARN.	8
Figura4. <i>R. prolixus</i> con las cinco marcas corporales empleadas para identificar los organismos dentro de los grupos empleados.	14
Figura5. Cromatograma del control de reproducibilidad del HPLC.	22
Figura6. Cromatograma de una muestra sin saturación con hemina..	24
Figura7. Cromatograma de control de actividad de hemina sin hemolinfa.	24
Figura8. Ejemplo de cromatograma de la muestra con ensayo de ingesta de tratamiento control ARNdh de gen de planta saturada con un volumen de hemina a 10 mM.	25
Figura9. Peso de la ingesta sanguínea (mg) de los tres tratamientos del ensayo de ingesta de <i>R. prolixus</i> N3.	26
Figura10. Peso de la ingesta sanguínea (mg) de los tres tratamientos para el experimento de efectos de muda de N3 a N4 de <i>R. prolixus</i>	27
Figura11. Peso de la ingesta sanguínea (mg) del ensayo de inyección en N3 de <i>R. prolixus</i>	29
Figura12. Comparación de la ingesta sanguínea (mg) de individuos de <i>R. prolixus</i> N3 expuestos por vía oral y por inyección intratorácica según la vía de exposición.	30

Figura13.	Análisis de la dosis de sangre mg/ mg del peso sin alimentación de los individuos del ensayo de ingesta e inyección en <i>R. prolixus</i> N3.....	32
Figura14.	Comparación entre tratamientos de la dosis de sangre mg/ mg del peso sin alimentación de los individuos en los ensayos de ingesta e inyección en <i>R. prolixus</i> N3. ..	33
Figura15.	Acumulación de la proteína RHBP en la hemolinfa de <i>R. prolixus</i> N3 en dos diferentes días luego de la alimentación.. ..	36
Figura16.	Acumulación de la proteína RHBP en la hemolinfa de <i>R. prolixus</i> N3 en dos diferentes días luego de la alimentación.. ..	38
Figura17.	Análisis de la cantidad de proteína del d3 para el tratamiento de Sangre sin ARNdh en los ensayos de ingesta e inyección de <i>R. prolixus</i> N3.....	40
Figura18.	Experimento de efectos de la muda de N3 a N4 en <i>R. prolixus</i>	411

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar dos métodos para inducir interferencia de ARN por medio de ARN de doble hebra en la expresión del gen RHBP (*Rhodnius* Heme Binding Protein) en ninfas de *R. prolixus* Stahl 1859, vector de la enfermedad de Chagas. Para esto se realizaron dos ensayos mediante la inoculación por vía oral (ingesta) (el ARNdh se agregaba a la sangre) dividido en dos experimentos: cuantificación de proteína en hemolinfa y efectos de muda; y la inoculación directa (inyección) (el ARNdh se inyectaba en el pronoto) la cual se realizaba 24 horas antes de alimentar a los individuos con sangre.

Se empleó un total de 150 individuos para el ensayo de ingesta: 120 en el experimento de análisis del HPLC y 30 en el experimento efectos de muda. Se utilizó 60 individuos para el ensayo de inyección. Cada ensayo constó de 3 tratamientos (Sangre sin ARNdh, Control ARNdh y ARNdh RHBP), en los cuales se evaluó la ingesta sanguínea, la dosis de sangre consumida, la acumulación de proteína en la hemolinfa (experimento análisis HPLC e inyección) y el retraso de muda (experimento efectos de muda). La técnica de HPLC descrita en esta investigación fue eficiente para detectar cambios en la concentración de la proteína RHBP en muestras de hemolinfa saturada y mantener una buena reproducibilidad entre días de análisis.

Se determinó que el mejor control para observar los efectos fisiológicos del ARNdh RHBP es el Control ARNdh, dado que los tratamientos con ARNdh presentan una cinética de acumulación de proteína similar entre ambos. La cinética de acumulación de proteína en la hemolinfa se ve alterada por el ARNdh en la sangre, causando una mayor cantidad de RHBP en el día tres (d3) por parte de los individuos de ambos ensayos. Se concluyó que existe una diferencia significativa en la cantidad de proteína circulante para el tratamiento de Sangre sin ARNdh en los ensayos de ingesta e inyección del d3. Esto sugiere que la proteína RHBP está involucrada en la actividad inmune de *R. prolixus*.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una de las principales enfermedades de contagio por medio de vectores en Latinoamérica. Esta es una enfermedad zoonótica causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, el cual ha sido registrado infectando a más de 150 especies (animales domésticos, silvestres y humanos) en diferentes partes del organismo como a macrófagos, el tejido muscular y las células nerviosas.

Esta enfermedad se caracteriza en los humanos por un período de incubación que tarda entre 7 y 15 días, continúa con una fase aguda que llega a durar hasta cuatro semanas en las cuales los síntomas no son obvios en la mayoría de casos y como consecuencia casi nunca es detectada. El signo de la Romaña (leve inflamación con edema en el área circundante periocular) es característico de la fase aguda, pero solamente suele presentarse en un 5% de los infectados. Luego de un período asintomático de 10 años o más, entre un 10 y 40% de los infectados llegan a la fase crónica, la que se caracteriza por complicaciones cardíacas o digestivas, las cuales pueden conducir a la muerte por medio de una arritmia o una falla cardíaca congestiva (Beard 2004; Remme *et al.* 2006).

El *T. cruzi* es transmitido principalmente por las heces infectadas de los insectos hematófagos de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, vectores de la enfermedad. La mayoría de estos insectos se logra encontrar en los nidos del reservorio del parásito, los cuales incluyen zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*), armadillos (*Dasypus* sp.) y roedores (Muridae) entre otros. A su vez se ha logrado observar que ciertas especies se han adaptado a los hábitats humanos y a sus áreas circundantes, como el interior de las casas con construcción rústica (paredes de adobe y techos de paja), los gallineros y potreros (Schofield 1994). En Guatemala los únicos vectores encontrados de la enfermedad son *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma nitida*; siendo los primeros dos los de mayor importancia debido a sus altas tasas de infestación y distribución geográfica (Monroy *et al.* 2003; Ponce 2007).

En Venezuela se ha demostrado que *R. prolixus* es capaz de reinfestar casas que se encuentren dentro de un perímetro de 100 metros o menos (Sánchez *et al.* 2006). Estudios morfométricos y genéticos de *R. prolixus* de especímenes hondureños y colombianos han demostrado que los organismos de la región centroamericana deriva de las poblaciones de

Sur América (Dujardin *et al.* 1998), lo que sugiere que esta especie es introducida en la región. Actualmente *R. prolixus* se encuentra desde la región sur de Oaxaca en México hasta la parte norte de Costa Rica (Zeledón 2004). Las poblaciones de *R. prolixus* tienen un mayor porcentaje de organismos infectados con *T. cruzi* que su contrapartida silvestre *T. dimidiata*; dando como resultado que se registre una mayor cantidad de humanos infectados con tripanosomiasis en los lugares donde ésta se encuentra (Paz *et al.* 2002; Ponce *et al.* 1995). Por esto, *R. prolixus* es un vector mucho más eficiente.

Este vector se mantiene bajo control en los hogares principalmente con el empleo de insecticidas residuales rociados intradomiciliariamente, estos productos químicos ayudan a disminuir la probabilidad de contraer la enfermedad dentro de las casas (Ponce *et al.* 2005). Pero debido a la necesidad de rociar periódicamente, este método se vuelve poco sostenible (se estima un valor de ocho dólares por casa rociada), además estos insecticidas no llegan a todas las áreas de la casa, dejando áreas sin tratamiento y el potencial de desarrollo de resistencia, como se ha documentado con *R. prolixus* en Venezuela (Vassena *et al.* 2000; Schofield *et al.* 2006).

A. Antecedentes

1. Información general. *Rhodnius prolixus* Stahl 1859, una chinche (Reduviidae, Triatominae), está distribuida desde el sur de Oaxaca, México, hasta Colombia y Venezuela (Ponce 2007; Superlano *et al.* 2006). *Rhodnius* tiene 15 especies en Latinoamérica. Esta especie paurometábola pasa por cinco estadios ninfales (N1, N2, N3, N4 y N5) (Fig. 1) (Wheeler 2003). Entre cada estadio *R. prolixus* se alimenta una sola vez, ya que es en estos momentos cuando se vuelven más vulnerables (Chapman 2003). *R. prolixus* se alimenta de sangre durante toda su vida, pero a su vez se han registrado actividades de coprofagia. Para las ninfas, la alimentación es necesaria para el crecimiento y la muda, mientras que en los adultos se utiliza para la producción de huevos.

Figura1. *R. prolixus* en sus 5 estados ninfales hasta llegar a adulta.

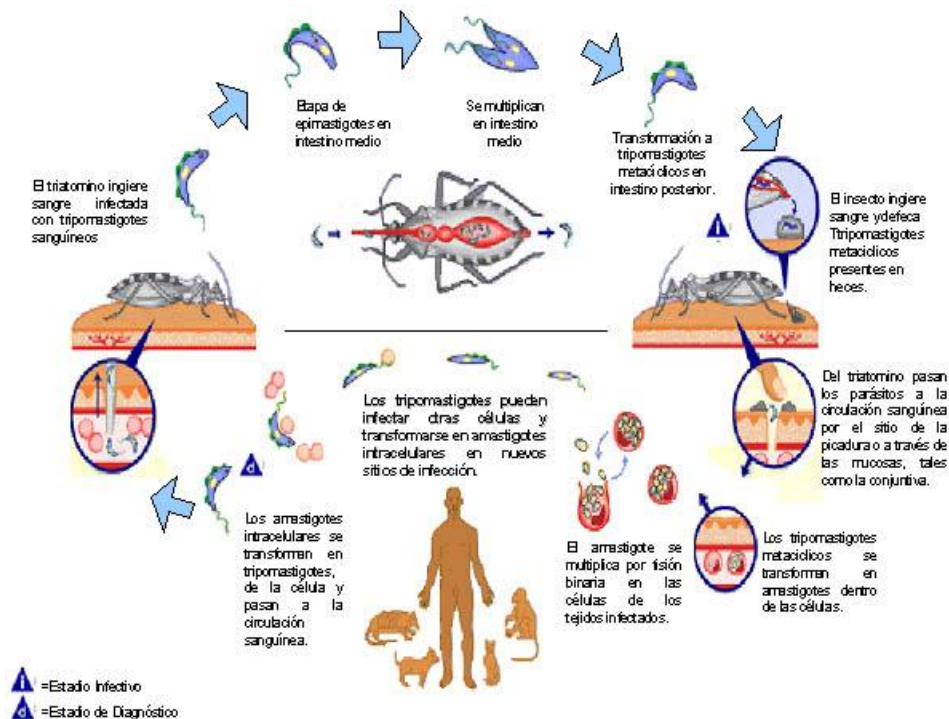


R. prolixus tiene la capacidad de encontrar su alimento mediante el seguimiento de una fuente de calor o por medio de las emisiones de CO₂. La detección de CO₂ se encuentra distribuida en todo su cuerpo, pero se ve más desarrollada en las antenas y las patas (Davis y Sokolove 1975). Éste tiene la capacidad de absorber hasta 12 veces su propio peso en sangre, en este punto la serotonina (neurotransmisor) entra en acción para permitir la extensión corporal. La serotonina actúa como coordinador del intestino medio (captación) y de las funciones excretoras (remoción de iones y fluidos) de los tubos de Malpighi, para controlar la cantidad de iones y fluidos del cuerpo que se movilizan desde y hacia la hemolinfa. Debido a la expansión abdominal, el cerebro empieza a liberar la hormona protoracicotrópica (PTTH por sus siglas en inglés) que induce la síntesis y secreción de ecdisona de las glándulas protorácicas y, en el tercer día, genera la liberación de hormonas juveniles para inducir el desarrollo de la muda (Adams 2003). El estudio de Wigglesworth (1965) demostró que las hormonas juveniles varían entre los estados ninfales 1-4 y el 5to ya que en el último se induce el desarrollo del adulto. Al llegar a la adultez solamente se puede dar inicio al proceso de fertilización cuando la miotropina es liberada como consecuencia de que la espermateca haya sido llenada con suficiente esperma, para dar inicio a la ovulación y maduración de los huevos (Wheeler 2003).

2. **Epidemiología del vector.** *R. prolixus* es de los vectores más eficientes en la región centroamericana, debido a su alta tasa de infestación en los hogares. Estos se han logrado adaptar al interior de las casas rústicas de la región del trópico (Paz *et al.* 2002), y generalmente se hallan en los techos de paja y en las paredes de adobe que presentan rajaduras. Se ha observado que los organismos silvestres que se encuentran en un perímetro no mayor de 100 metros, tienden a reinfestar las casas (Sánchez *et al.* 2006). Otro factor que ha ayudado a aumentar las tasas de prevalencia en los hogares es que se pueden encontrar más hembras que machos (Monroy *et al.* 2003), lo cual permite aumentar la población de chinches debido a las mayores tasas de oviposición. Además, su ciclo ninfal es mucho más corto que el de *T. dimidiata* (Pennington y Beard 2004) permitiendo tener una generación de organismos en solamente seis meses.

Las chinches pueden contraer el *T. cruzi* y volverse vectores al momento de alimentarse de la sangre de algún organismo infectado (animal o humano) (Fig. 2) y transmitirlo cuando éste se alimenta de otro organismo. Las heces infectadas con el protozooario caen en las cercanías de la herida, causada por la picadura, y el organismo, al rascarse, introduce los tripanosomas al torrente sanguíneo en el cual empieza el ciclo infectivo del parásito. Este organismo se asocia a regiones que tienen una mayor cantidad de humanos con seroprevalencia y organismos silvestres infectados que su contraparte nativa *T. dimidiata* (Paz *et al.* 2002).

Figura2. Ciclo infectivo del *T. cruzi*. Protozooario causante de la enfermedad de Chagas, cuyo vector es *Rhodnius prolixus*.



Adaptado de (Salazar 2004)

El estudio de Monroy *et al.* (2003) ha demostrado que la prevalencia de esta especie de chinche no se limita únicamente a los departamentos de Chiquimula, Zacapa y Jalapa, también se ha encontrado organismos en el departamento de Quiché (Cuadro 1) lo que sugiere que pueden haber otros departamentos con *R. prolixus*.

Cuadro 1. Departamentos con *R. prolixus* y porcentajes de individuos infectados con *T. cruzi* (Monroy *et al.* 2003)

Departamento	# de chinches disectadas	# de chinches positivas	% de infección
Chiquimula	779	282	36.2
Zacapa	1534	202	13.2
Quiché	10	0	0
Jalapa	21	0	0
Total	2344	484	20.6

3. **Rhodnius Heme-Binding Protein (RHBP).** Las moléculas en el organismo que dan como resultado la producción de oxígeno reactivo pueden lastimar tanto células como tejidos causando daño oxidativo a todo tipo de biomoléculas, si el organismo no llega a generar algún método de detoxificación. Los compuestos orgánicos que contienen hierro como el grupo hemo, son conocidos por sus actividades catalíticas para la formación de radicales libres (Halliwell y Gutteridge 1989). Éste es uno de los principales problemas que *R. prolixus* debe lidiar, ya que se alimenta de grandes cantidades de hemoglobina que contiene hasta 10 mM de hemina. Estos compuestos generan un incremento en la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico, liposomas y lipoforinas, las principales lipoproteínas de la hemolinfa) y, debido a que la alimentación activa el proceso de excreción del exceso de iones y fluidos, se genera una mayor concentración de estos grupos en el intestino medio (Dansa *et al.* 1995).

R. prolixus controla la acumulación de los compuestos hemo, con la proteína RHBP, la cual inhibe la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Esto se logra mediante la unión de la proteína RHBP al grupo hemo, suprimiendo de esta manera la generación de oxígeno reactivo, protegiendo de esta manera al insecto en contra de la oxidación a causa del ciclo alimenticio (Dansa *et al.* 1995). Esta proteína se expresa durante todas las etapas de *R. prolixus* y su expresión incrementa después de la ingesta. RHBP puede ser encontrada en dos maneras dentro del organismo de la chinche, en su forma saturada con hemo (hemo-RHBP) o en su forma apo (apo-RHBP o libre de hemo). La forma apo tiene la capacidad de secuestrar el hemo liberado de la degradación de la hemoglobina, y funcionar de esta manera como un anti-oxidantes, ya que en la hemolinfa la mitad del RHBP se encuentra en su forma apo-RHBP.

RHBP es importante en todos los ciclos del organismo, es uno de los componentes principales del huevo (1% del total de proteínas), ya que es incorporada a los oocitos por medio de endocitosis (Machado *et al.* 1998). En contraste a la hemolinfa, el total del RHBP en los oocitos se encuentra en su forma hemo-RHBP, el cual es empleado en la embriogénesis y en la degradación de la proteína para obtener el grupo hemo para ser incorporada a la producción de proteínas-hemo sintetizadas por el embrión. Se ha observado que, cuando la fuente del grupo hemo disminuye en la alimentación proporcionada a las hembras, el número de huevos ovipositados disminuye, ya que las

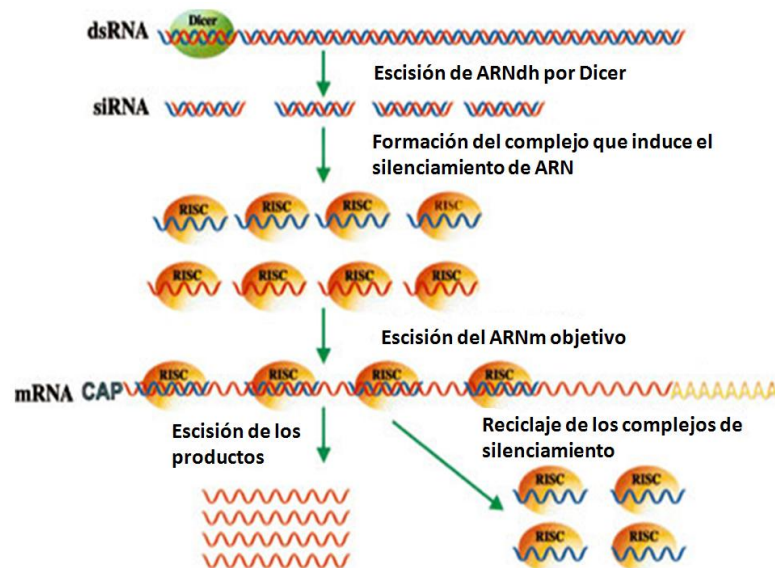
hembras no ponen huevos con una menor concentración de RHBP sino que ovipositan menos huevos (Braz *et al.* 2002).

4. **Interferencia de ARN (iARN).** Éste es un mecanismo que causa silenciamiento de ARN, el cual es empleado por la mayoría de organismos eucariotas para controlar la transcripción de genes (Agrawal *et al.* 2003); del mismo modo se emplea para la regulación del desarrollo, ya que provee resistencia hacia virus de ARN y en regular el movimiento de transposones. El método de interferencia de ARN mediante la implementación de ARN doble hebra (ARNdh) fue demostrado por primera vez en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.* 1998). Se comprobó que éste silenciamiento tiene la capacidad de propagación en todo el organismo y que se puede emplear bacterias que produzcan ARNdh para generar interferencia *in vivo* si se alimenta al organismo con éstas (Timmons y Fire 1998). En estos experimentos, *C. elegans* adultos fueron inyectados con ARNdh generando efectos fenotípicos de interferencia debido a la inhibición de ciertos genes, cuyos efectos se observaron en su progenie. Este efecto fue reproducible al emplear una solución conteniendo ARNdh o al alimentarlos con *E. coli* que expresara ARNdh (Timmons y Fire 1998; Timmons *et al.* 2003). La técnica de iARN es muy poderosa para determinar la función de genes porque requiere de pequeñas cantidades de ARNdh para que se genere un efecto en el organismo y el método de inyección e ingesta ha sido empleado en distintos artrópodos vectores de enfermedades y plagas de cultivos (Ramakrishnam *et al.* 2005, Araujo *et al.* 2006).

El ARNdh genera un silenciamiento a nivel del ARN mensajero (ARNm) homólogo a través de un mecanismo que conlleva la degradación de éste mediante complejos proteicos conservados en los organismos (Figura 3). El ARNm se degrada en dos pasos. En el primero el ARNdh se une a un complejo de nucleasas de ARN llamada Dicer, el cual degrada el ARNdh a ARN interferencia pequeño (small interfering RNA o siRNA por sus siglas en inglés), las cuales son cadenas cortas de entre 21-25 nucleótidos (nt) de ARNdh con un fosfato en el extremo 5' y un hidroxilo en el extremo 3' (con un extremo protuberante que actúa como guía para la degradación del ARN homólogo). El segundo se da al momento en que los siRNA se unen a un complejo silenciador inducido por ARN (RNA-induced silencing complex o RISC, por sus siglas en inglés) que contiene varias

nucleasas, las cuales degradan el ARNm conforme a la secuencia de las siRNA (Stram y Kuzntzova 2006).

Figura3. Esquema que demuestra el mecanismo del silenciamiento mediante iARN.



Adaptado de (Stram y Kuzntzova 2006)

El método de iARN ha sido empleado en *R. prolixus* para determinar genes importantes en la hematofagia y la transmisión de patógenos; a su vez ha sido empleada para inhibir la expresión de una hemoproteína de las glándulas salivales (nitroforina 2) (Araujo *et al.* 2006). Se ha observado que, tanto en la inoculación de ARNdH por ingesta o inyección intratorácica, se generan efectos de iARN, aunque el método de inyección tiene mayores efectos de inhibición. La ventaja de emplear inoculación por ingesta es que se puede emplear cualquier estadio, mantiene una tasa de mortalidad más baja que la inyección (como consecuencia de la punción) y sus aplicaciones son más útiles para ser empleadas en áreas fuera del laboratorio.

5. Cromatografía líquida de alta eficacia (High performance liquid chromatography o HPLC). Este tipo de cromatografía es una de las técnicas analíticas más empleadas, ya que permite análisis cuantitativos y cualitativos. El principio de esta técnica se basa en la separación de compuestos empleando una fase estacionaria y una fase móvil. La fase móvil del HPLC pasa por una bomba que determina la velocidad, fuerza y cantidad de fase que será bombeada a través de la columna de exclusión molecular. La muestra que se desea analizar se disuelve en un solvente y se inyecta en el equipo para que éste sea empujado con la fase móvil por la columna de alta presión (fase estacionaria). Estos compuestos reaccionan con la fase móvil y la fase estacionaria de la columna para generar una alta precisión de los compuestos separados. Los compuestos son separados y captados por un detector de ondas de ultravioleta visible (UV) para el procesamiento de datos. Los compuestos separados se analizan mediante los tiempos de retención (tiempo que le toma al detector captar la muestra luego de la inyección) y la integración del área bajo la curva de retención (Yeung y Synovec 1986).

La detección de la proteína RHBP se realiza mediante la medición de la absorbancia del pico de Soret (412 nm), y la absorbancia del grupo hemo en una solución acuosa se mide a 398 nm (Braz *et al.* 2002; Danza *et al.* 1995; Paiva *et al.* 2002). La hemolinfa puede contener tanto apo-RHBP como hemo-RHBP, en contraste en el cuerpo graso solamente se haya hemo-RHBP (Paiva *et al.* 2002).

El estudio de Danza (1995) demostró que la cantidad de RHBP que se encuentra en la hemolinfa luego de la alimentación tiene su mayor concentración en el séptimo día, luego de este día disminuye la concentración de proteína llegando a un estado constitutivo. Esta técnica ha sido la más versátil para poder demostrar las concentraciones y los cambios que la RHBP tiene en la hemolinfa a lo largo del tiempo.

B. Objetivos e hipótesis

1. Objetivo general

Evaluar dos métodos para inducir de interferencia de ARN por medio de ARN de doble hebra en la expresión del gen RHBP (*Rhodnius* Heme Binding Protein) en ninfas de *R. prolixus* Stahl 1859, vector de la enfermedad de Chagas.

2. Objetivos específicos

- a. Comparar los efectos de interferencia de ARN (iARN) en dos diferentes ensayos de inoculación de ARN de doble hebra (ARNdh): ingesta (análisis mediante HPLC y efectos de muda) e inyección.
- b. Estandarizar la detección de la proteína RHBP a partir de hemolinfa saturada por medio de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta eficacia (High performance liquid chromatography o HPLC).
- c. Establecer el método de iARN de mayor eficiencia mediante la cuantificación de la proteína RHBP obtenida a partir de la hemolinfa de los individuos y saturándola con hemina, empleando la técnica de HPLC.
- d. Establecer el mejor control para comparar los efectos de iARN analizando la ingesta sanguínea según los tratamientos Sangre sin ARNdh y Control ARNdh.

3. Hipótesis

Es posible evaluar el efecto de interferencia de ARN a partir de ARN de doble hebra en la producción de la proteína RHBP en la hemolinfa de *Rhodnius prolixus* Stahl 1859, mediante la técnica de HPLC.

C. Justificación

En la XIII Reunión del Sector de Salud de Centro América se estableció que “El control de la enfermedad de Chagas debe ser una actividad prioritaria para los países centroamericanos” (Ponce 2007). Se estima que en el continente existen unos 9.8 millones de infectados (Schmunis 2000) y 40 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad (Shofield *et al.* 2006). Datos de la Organización Mundial de la Salud (2002) indican que 2.8 millones de personas demuestran síntomas de la enfermedad de Chagas, calculándose una mortalidad aproximada de 13,000 personas anualmente en el continente (WHO 2002d). En el 2000, Guatemala fue el primer país de Centro América en iniciar una estrategia de control vectorial a gran escala en colaboración con la Agencia Internacional de Cooperación Japonesa (JICA) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Antes de que se iniciara el control vectorial se estima que en Guatemala se daban entre 28-30 mil nuevos casos anualmente, manteniendo un 34% de la población en riesgo de contraer la enfermedad de Chagas (WHO 1991). Se estima que para el 2002 en Guatemala había 4 millones de personas en riesgo y unas 730 mil infectadas (OPS 2002)

En todos los países afectados, la enfermedad de Chagas ha sido responsable de un alto costo tanto directo como indirecto. Se estima que en Guatemala un 35% de los marcapasos colocados son consecuencia de esta enfermedad generando pérdidas económicas debido a la mortalidad y la discapacidad temprana en los adultos en edad productiva; se calculó pérdidas de \$8,156 millones para el continente entero en 1995 (JICA-OPS 2006).

El rociado intradomiciliar de insecticidas residuales es el principal método para disminuir las poblaciones del vector dentro de los hogares. La limitante es la necesidad de realizar rociamientos periódicos, lo que hace el programa poco sostenible dado que se han registrado reinfestaciones en hogares, por *R. prolixus* con hábitats silvestres en Venezuela (Sánchez *et al.* 2006). A su vez este organismo ha demostrado un desarrollo de resistencia a estos productos químicos (Vassena *et al.* 2000; Schofield *et al.* 2006).

El desarrollo de nuevos métodos de control vectorial es esencial para mantener las poblaciones con hábitos silvestres controlados y a su vez eliminar las poblaciones que han reinfestado los hogares. En el 2002, el Consejo Técnico y Científico de Investigación en Enfermedades Tropicales y la Asamblea Mundial de la Salud (resolución WHA 5.1)

recomendó que las investigaciones científicas se enfocaran en desarrollar programas de extensión y sostenibilidad de control vectorial de triatomíneos silvestres y domiciliarios en las regiones Andinas y Centroamericanas (Research 2002). Es por ello que este tema de investigación se enfoca en evaluar dos métodos para inducir iARN mediante la implementación de la proteína RHBP, como blanco para desarrollar un nuevo insecticida microbiológico en el control del vector *R. prolixus*. Éste generaría la muerte de los organismos de una manera específica y sin dañar a las otras especies de insectos no vectoriales de la región.

II. MÉTODOS

A. Procedimiento

1. Insectos. La colonia de insectos de *R. prolixus* se mantuvo bajo condiciones controladas de temperatura ($27\pm 2.0^{\circ}\text{C}$), humedad ($70\pm 5.0\%$) y ciclo circadiano (12 luz: 12 oscuridad) en el insectario del Centro de Estudios en Salud de la UVG. Los especímenes empleados fueron sincronizados desde N1, mediante la separación de las chinches que mudaran en un lapso de 7 días. Éstas se mantuvieron en grupos de 100 individuos por frasco plástico de rosca de 250 ml (Guateplast) con papel kraft autoclaveado. Estos se alimentaron los días lunes y miércoles de cada inicio de ensayo (ingesta-inyección), a partir de sangre de conejo extraída con tres días de anterioridad, a la cual se le realizó un control de calidad mediante un frote de 100 μl de sangre en un medio de cultivo de Agar + BHI (Brain Heart Infusion) (Merck).

2. Selección de organismos. Los ensayos emplearon organismos del tercer estadio (N3) que tuvieran dos semanas de haber mudado y que no hubieran sido alimentados. Para el ensayo de ingesta los individuos fueron pesados dos días antes de alimentarlos, en una balanza analítica (Mettler A163) usando tubos eppendorf de 0.6 ml previamente pesados. Se repitió la medición el día siguiente de la alimentación. Los individuos fueron marcados en la parte superior del abdomen con corrector líquido (Liquid Paper) (Fig. 4), de la siguiente manera: punto superior-izquierdo (1), superior-derecho (2), inferior-izquierdo (3), inferior-derecho (4) y central (5).

Se realizó el mismo procedimiento con los individuos del ensayo de inyección, con la única diferencia que éstos fueron pesados antes de realizar la inyección torácica. Se pesaron y marcaron 15 chinches extras para ser empleados, ya que el proceso de punción tiene una alta mortalidad, en caso de la muerte de algún organismo.

Figura4. *R. prolixus* con las cinco marcas corporales empleadas para identificar los organismos dentro de los grupos empleados.



3. Extracción y linealización de plásmidos. Se emplearon células competentes de *Escherichia coli* Top 10 (Invitrogen), las cuales fueron clonadas con el kit de clonación TOPO TA para introducir el ADN copia (ADNc) de RHBP. Las colonias con una coloración blanca (considerado como positivo para la presencia del ADNc) fueron escogidas para tamizar los insertos conteniendo el ADNc de RHBP mediante un PCR con iniciadores específicos para el gen. Los clones positivos fueron utilizados para extraer los plásmidos usando el kit PlasmidPureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen). Para realizar esto se empleó el vector pGEM®-T Vector Systems (Promega) con el gen insertado de RHBP y el vector pBluescript II SK(+/-) (Fermentas) con el gen de la proteína para el desarrollo de óvulos de *Arabidopsis thaliana* (como control de posible iARN no-específica) (Control ARNdh). Éste fue proporcionado por el laboratorio de Chagas, Centro de Estudios en Salud (CES), UVG.

a. Iniciadores y tamaño de los productos de PCR para RHBP.

RHBP F1: 5'-gtaaaactgttcggt tatctaataca-3'

RHBP R1: 5'-caactgtacgct tggtagc-3'

Promotor T7: 5'-gtaata cgactcacta tagggc-3'

Promotor T7: 5'-gtaata cgactcacta tagggc-3'

Tamaño estimado del producto: 414 pb

b. Iniciadores y tamaño de los productos de PCR para *A. thaliana*.

M13-30: 5'-taaacgacg gccagtg-3'

Promotor T7: 5'-gtaata cgactcacta tagggc-3'

M13: 5'-cat ggcatagct gtttcc-3'

Promotor T3: 5'-cccttagt gagggtaat t-3'

Tamaño estimado del producto: 516 pb

Luego de la extracción de los plásmidos, se linealizaron con las enzimas de restricción Sal I (RHBP), Sac I (*A. thaliana*) y Kpn I (*A. thaliana*) (Promega) para obtener ADNc. Para comprobar las digestiones enzimáticas se realizó un gel de agarosa al 0.7% con bromuro de etidio, el cual se corrió a 50 voltios por 1 hora y se visualizó bajo una cámara de luz Ultravioleta (UVP, UV Transiluminator).

Se siguió el protocolo de Linealización de Plásmido elaborado en el laboratorio del Chagas, CES, UVG:

1. A los plásmidos pGEMT se agrega 2 ul de BSA 0.1 mg/ml, 2 ul de Buffer D 10X (correspondiente a la enzima), 1 ul de Sal I, 2 ug de ADN y llegar a 20 ul con H₂O_{dd}
2. A los plásmidos pBluescript se agrega 2 ul de BSA 0.1 mg/ml, 2 ul de Buffer J 10X (correspondiente a la enzima), 1 ul de Sac I en un tubo y 1 ul de Kpn I en otro, 2 ug de ADN y llegar a 20 ul con H₂O_{dd}
3. Se colocan las muestras a 37°C durante 12 horas.
4. Se realizó un spike con 0.5 ul de enzima de restricción (Sal I, Sac I y Kpn I), 1 ul de Buffer y 8.5 ul de H₂O_{dd} se incubo a 37°C por 4 horas.
5. Se comprobó las digestiones mediante electroforesis.
6. Se agregó 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1).
7. Se agitó por 1 min y se centrifugo a 12,000 rpm por 10 min a 4°C, se removió la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo.
8. Se agregó 1 vol de H₂O libre de nucleasas a la fase orgánica y se repitió los pasos 6 y 7.

9. Se agregó 1 volumen de cloroformo a la extracción acuosa y se repitió los pasos 6 y 7 (2 repeticiones).
10. Se precipitó el plásmido con 2.5 vol de etanol al 100% con acetato de sodio 3 M, se incubó a -20°C por 60 min y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4°C . Se descartó el sobrenadante y se lavó suavemente con 500 ul de etanol al 70%.
11. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante, se lava nuevamente con 100 ul de etanol 100% y se centrifuga a 13,000 rpm por 8 min a 4°C .
12. Se descarta el sobrenadante y se deja secar por veinte minutos en hielo. Se suspendió el pellet en 10 ul de H_2O libre de nucleasas.

4. **Síntesis de ARN de doble hebra (ARNdh).** A partir del ADNc de ambos genes, RHBP (pGEMT-RHBP^{Forward} - pGEMT-RHBP^{Reverse}) y *A. thaliana* (pBluescript-Sac I_(F)-pBluescript-Kpn I_(R)), se preparó el ARNdh *in vitro* empleando el kit T7 Ribomax Express RNAi system (Promega) y T3 RNA polymerase (Promega).

Se siguió el protocolo propuesto de Síntesis de ARNdh, elaborado en el laboratorio de Chagas, CES, UVG:

1. Para los plásmidos pGEMT agregar 10 ul de Buffer 2X, 2 ul de ADN, 6 ul de $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ y 2 ul de enzima T7.
2. Para los plásmidos pBluescript agregar 10 ul de Buffer 2X, 3 ul de ADN, 5 ul de $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, 2 ul de enzima T7 y únicamente para Kpn I 1 ul de Ribolock.
3. Las muestras se incuban a 37°C por 30 min y se mezclan los ADNc forward y reverse.
4. Se incuba a 70°C por 10 min y se enfría a temperatura ambiente por 20 min; luego se agrega 2 ul de RNase (1:200) y 2 ul de DNase.
5. Se incuba a 37°C por 30 min y se agrega 4.4 ul de acetato de sodio y 2.5 vol de etanol al 100%.
6. Se coloca en hielo 5 min y centrifugar a 13,000 rpm por 10 min a 4°C . Se descarta el sobrenadante y lavar el pellet con 300 ul de etanol al 70%.
7. Se centrifuga a 13,000 rpm por 10 min a 4°C , se descarta el sobrenadante.

8. Se lava con 100 ul de etanol al 100%, se repite el paso 7 y secar 15min a temperatura ambiente.
9. Se resuspender el pellet en 50 ul de H₂O DEPC, se hace una dilución 1:10 (corre 3 ul de esto en un gel de agarosa al 0.7% a 100V por 30 min) y 1:100 (para la cuantificación por espectrofotometría 260:280).
10. Las muestras como las diluciones se almacenan a -80°C.

Luego de la síntesis, el ARNdh fue visualizado en un gel de agarosa al 0.7% con bromuro de etidio, el cual se corrió a 50 voltios por 45 minutos. Se usó un espectrofotómetro (Agilent 8453) y una microcelda de cuarzo 10 mm-5 ul (Agilent Technologies) para calcular su pureza y concentración midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. Para el ensayo de ingesta la cuantificación se realizó un día previo a la alimentación, mientras que para el ensayo de inyección se realizó el mismo día en que se hizo la inyección torácica en los individuos.

5. Ensayo de ingesta de ARNdh. Se emplearon 120 individuos N3 los cuales se dividieron en dos experimentos. El primer experimento constó de dos partes. (1) Experimento de cuantificación de proteína en hemolinfa: se emplearon 30 individuos en grupos de 10 para cada tratamiento ARNdh RHBP (RHBP), ARNdh control (*A. thaliana*) y Sangre sin ARNdh (H₂O_{DEPC}), los cuales se subdividieron en grupos de 5 para cada día de disección luego de la alimentación (día 3 (d3) y día 7 (d7)). (2) Experimento del efecto en la muda a N4: constó de 30 individuos separados en grupos de 10 por tratamiento (ARNdh RHBP – Control ARNdh - Sangre sin nada) los cuales se mantuvieron en observación diaria hasta el momento de la muda, se registraron aquellos que murieron en el proceso o que no mudaron (datos censurados).

El segundo experimento se realizó en duplicado, para lo cual se repitió la primera parte del primer experimento. Se utilizó 30 individuos divididos en dos réplicas (Réplica 1: R1 y Réplica 2: R2), para un total de 60. Éstas se dividieron en grupos de 10 por tratamiento: ARNdh RHBP, ARNdh control y Sangre sin ARNdh, cada tratamiento se subdividió en grupos de 5 por tiempo de disección d3 y d7. Todos los grupos se

mantuvieron en tubos Corning de 50 ml con papel kraft autoclaveado (7*4 cm) adentro de estos, para proveerles a los individuos una base donde movilizarse.

Los individuos fueron alimentados con sangre de conejo estéril por medio de un alimentador artificial 5W1 (Hemotek) que mantuvo la sangre a una temperatura de 36.5°C. Se empleó un aproximado de 12 ul de sangre por individuo alimentado. La sangre fue colocada en almacenadores individuales los cuales estaban previamente autoclaveados. Luego de agregar la sangre se agregó 1 ug/ul de ARNdh RHBP, 1ug/ul de ARNdh Planta y un volumen igual de H₂O_{DEPC} con relación al volumen de ARNdh RHBP. Las chinches del experimento dos fueron fotografiadas en grupos de 5, con una cámara Canon (PowerShot A410) y observadas bajo un estereoscopio (American Optical) durante un lapso de 48 horas luego de la alimentación, esto se realizó empleando cajas petri (Falcon) y papel milimetrado en la parte inferior de la caja petri. Se registró cualquier tipo de anomalía fisiológica, tales como: tipo de coloración, motricidad o distensión abdominal.

6. Ensayo de inyección de ARNdh. Este experimento empleó 90 individuos divididos en dos partes. La primera constó de 30 individuos N3 separados en grupos de 10 por tratamiento (ARNdh RHBP, Control ARNdh y Sangre sin ARNdh) y en grupos de 5 por cada día de disección d3 y d7. La segunda parte constó de dos grupos de 30 individuos cada uno para un total de 60 individuos (R1 y R2) separados de la misma manera que la primera parte. Se implementó la misma metodología que en el ensayo de ingesta y se analizaron los mismos parámetros, con la variación de que el H₂O_{DEPC}, el ARNdh de RHBP y ARNdh de *A. thalina* no fue introducida en la sangre de la cual se alimentaron los individuos. En su lugar, éstas fueron inyectadas en el pronoto del individuo en una dosis de 10 ug/ul de ARNdh de su respectivo tratamiento y 1ul de H₂O_{DEPC}. Esto se realizó un día previo a la alimentación de todos los tratamientos.

Para el proceso de inyección, los individuos fueron colocados sobre una base de plastilina, y sujetados mediante la colocación de un cinturón de plastilina sobre el abdomen. Luego fueron colocadas en el estereoscopio (American Optical), con el cual se tuvo una mejor precisión de la inyección torácica empleando el microinyector (micrómetro y tubería para capilar de 1mm) (Sutter Instrument Co.). Se clasificó como una inyección exitosa cuando no se observara líquido externo fluyendo a través del pronoto del individuo,

de lo contrario se realizó nuevamente la punción para agregar la cantidad exacta del producto. De estos individuos, las que sobrevivieron un período de 24 horas luego de la inyección fueron empleados en el estudio y aquellos que no sobrevivieron fueron reemplazados.

7. Disección y extracción de hemolinfa. Se disectó en los días establecidos a los distintos grupos de chinches. Cada grupo de 5 individuos fue colocado a 4°C durante 15 minutos, luego se procedió a disectarlo. Cada individuo fue observado bajo un estereoscopio (American Optical); se colocó recostada sobre su dorso en una caja petri y sujeta en el abdomen con unas pinzas (Bioquip). Al momento de realizar la disección se procedió a amputar el primer par de patas desde el fémur, con lo cual se apretó el abdomen para poder extraer la hemolinfa (la cual debía tener una consistencia líquida completamente transparente). Ésta fue extraída con una pipeta p2 (Gilson) con puntas p10 sin bloquear (Neptune, CLP). Se extrajo la mayor cantidad de hemolinfa posible y luego se procedió a colocarla en una solución con 2 vol de acetato de amonio 50 mM y PMSF 3 µM, 6 vol de acetato de amonio 25 mM y PMSF 1.5 µM, y 1 vol de hemina 10 mM, para una dilución de 1:10. En cada tratamiento se tomó una muestra de 1 µl que no fue saturada con hemina.

Todas las muestras se colocaron en tubos de microcentrífuga (Eppendorf) de 0.2 ml con su respectiva identificación (Ensayo= O: oral, P: punción; día de disección: 3 ó 7; Tratamiento= C: control, P: planta y R: RHBP; # de Chinche= 1, 2, 3, 4 o 5) y almacenadas a -20 °C en el congelador (Frigidaire).

8. Análisis en HPLC. De las muestras obtenidas se realizó una dilución 1:10 de cada una, para una dilución final de 1:100, y se mantuvo a -20°C. En el HPLC se empleó como control de reproducibilidad entre ensayos la muestra de hemo-RHBP liofilizada, la cual fue resuspendida a una concentración de 1 µg/µl para ser inyectada al inicio de cada corrida. Si la muestra no daba los mismos valores que en el tratamiento anterior se repetía la fase móvil.

Las muestras de hemolinfa de cada ensayo fueron corridas en un mismo día (26-9-2010 ingesta y 13-10-2010 inyección), de las cuales se realizó un duplicado cada tres muestras.

Esto se realizó en un equipo de HPLC (Hewlett Packard Series 1100), empleando una jeringa de 10 μ l (Hamilton), con una columna de exclusión molecular ZORBAX GF-250 4.6 x 250 nm de 4 μ m de diámetro y una pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5 mm y 4 μ m de diámetro. Se empleó un inyector de 5 μ l para introducir las muestras. La absorbancia del detector se fijó a 412 nm (Pico Soret) para una lectura continua de 6 min. Se empleó una fase móvil de 500 ml (Tris-HCL 5 mM de pH 7, NaCl 0.15 M) y una fase estacionaria de 1000 ml (fosfato de sodio 0.1 M de pH 7, con .005% de azida de sodio) en la cual se dejaba guardada la columna. Todas las muestras fueron mantenidas en frío durante este proceso. Entre cada inyección la jeringa se limpio con buffer de acetato de amonio 25 mM y PMSF 1.5 μ M tres veces antes de iniciar una nueva muestra. Al momento de finalizar un tratamiento se corrió la solución buffer para controlar que no se quedara nada en la columna y las muestras sin saturar se corrieron a la mitad de cada tratamiento.

Los cromatogramas fueron imprimidos, escaneados y archivados, en el laboratorio de Chagas, del CES en la UVG. Estos resultados fueron cuantificados mediante la integración del área debajo del pico de absorción y expresándose como unidades arbitrarias normalizadas (mAU) mediante el programa ChemStation (A 1007).

9. Análisis estadístico. Los pesos y los mAU de los cromatogramas fueron tabulados en el programa de Excel (Microsoft 2007), se analizaron utilizando el programa estadístico SPSS 9.0 (proporcionado por el Departamento de Biología, UVG) y delimitando sus intervalos de confianza con el programa CIA (Confidence Interval Analysis 2.2.0, proporcionado por el Departamento de Bioquímica y Microbiología). Se les hizo un análisis no paramétrico, mediante la implementación del índice de Mann-Whitney (suma de rangos) para dos muestras independientes (se colocó el valor de p exacto cuando el valor crítico se encontrara dentro del rango de ± 0.03) y una prueba de Wilcoxon para definir los rangos de confianza. La prueba de Mann-Whitney se empleó para determinar la existencia de una diferencia significativa con un valor de $p < 0.05$ entre los distintos tratamientos y sus días de disección.

Los datos fueron graficados mediante un boxplot, para determinar aquellos valores atípicos que se encontraran fuera del rango del tercer intercuartil (IQ). Estos valores fueron

eliminados, dado que no se encuentran dentro del 75% de los datos muestrales, y como consecuencia causan una alteración de los resultados generado un aumento en el intervalo de confianza de los datos (Burke 1998; Scott y Blair 2004). Se analizó la estadística descriptiva para ver los rangos de la distribución y sus medianas. Los datos del experimento de efectos de muda a N4 se analizaron mediante una prueba de Kaplan-Meier con datos censurados, para determinar si existe alguna variación significativa en relación al retraso en la muda.

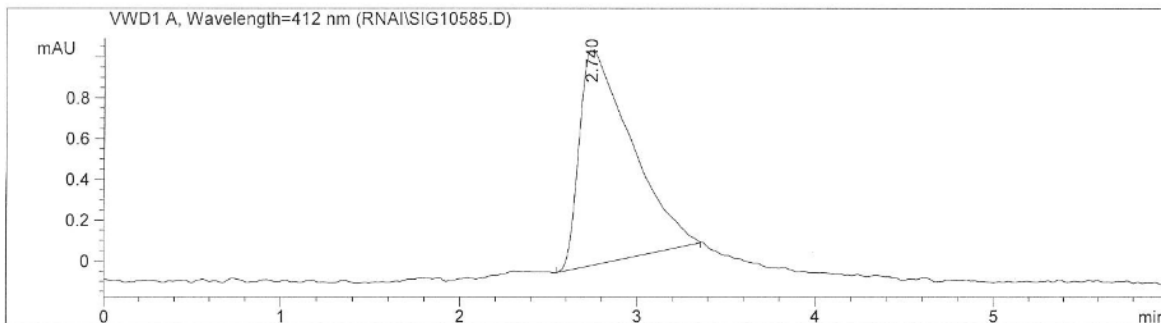
III. RESULTADOS

A. Estandarización de la técnica de HPLC para la detección de la proteína RHBP en la hemolinfa

1. Método de reproducibilidad. El paso principal de la investigación, fue estandarizar el método de detección de la proteína RHBP con la técnica de HPLC, para poder completar los objetivos. Para lograr esto, se determinaron las concentraciones adecuadas de la fase móvil (Cuadro 3), ya que éste es el factor limitante para la correcta detección de la proteína, porque los cambios de pH, tienen una influencia crítica en los tiempos de retención y en los mAU. Esto se logró mediante el desarrollo de un control de reproducibilidad de la fase móvil, el cual consistía de una muestra de proteína liofilizada (hemo-RHBP proporcionada por G. O. Paiva-Silva), resuspendida a una concentración final de 1ug/ul en acetato de amonio 25mM y PMSF 1.5µM. Después de 18 repeticiones en diferentes días, se obtuvo una media +- desviación estándar del tiempo de retención de 2.74 +- 0.02 seg y un área bajo la curva de mAU de 23.6 +- 2 (Fig. 5).

Es importante mencionar, que todos los grupos analizados entre sí, fueron trabajados bajo las mismas condiciones, para reducir el margen de error. Es recomendable siempre realizar las inyecciones de las muestras el mismo día, e incluir el control interno cada día para poder realizar comparaciones entre grupos; de otra manera no se puede asegurar la integridad de las comparaciones debido a la fase móvil. Para reproducibilidad se recomienda utilizar la columna, solamente, si el control interno está dentro de dos desviaciones estándar de la media obtenida.

Figura5. Cromatograma del control de reproducibilidad del HPLC. Se empleó una muestra, de concentración 1ug/ul, de proteína hemo-RHBP. Ésta fue inyectada en el HPLC, con lo cual se obtuvo un tiempo de retención de 2.740 seg y un área de 21.568 mAU.



En los experimentos realizados fue posible observar que se necesita 89.4 ml de HCl 0.1M en un volumen final de 200 ml, para obtener el pH adecuado de 7.1; si las cantidades de este compuesto varían por más de 1ml, el HPLC no detecta de manera eficiente la proteína. Esto se detectó empleando otros 30 individuos en el día 10, los cuales mostraron valores que no se correlacionaban entre ellos en los distintos días de análisis. Los datos no fueron empleados, porque las muestras fueron analizadas en el HPLC, previamente de tener el control interno y todos los parámetros establecidos.

Cuadro 2. Composición de la fase móvil para el HPLC

<i>Reactivo</i>	<i>50mM Tris pH7</i>		
	Cantidad	Concentración final	Aforar con H ₂ O dd
Tris-base	1.21g	50mM	200ml
HCl	89.4ml	0.1M	
		1.5M NaCl	
NaCl	17.5g	1.5M	200ml

2. **Método de detección.** Debido a la cantidad de proteína apo circulante, con el método utilizado, no fue posible detectar la proteína no saturada, ya que ésta no muestra absorbancia a la longitud de onda de 412 nm (pico Soret) (Fig. 6). Por ello se decidió saturar la hemolinfa con un volumen de hemina a 10 mM (Dansa *et al.* 1995), para llegar a una concentración final en la inyección de 0.1 mM.

La hemina (concentración final 1 mM), por sí sola, demuestra un tiempo de retención a 2:35 seg (Fig. 7) y un área de 6.3 mAU. Al momento de agregar un volumen equivalente de hemina (10 mM), a las muestras de hemolinfa, se logra apreciar un tiempo de retención a los 2:30 +- 0.15 seg (Fig. 8) y un pico con diferentes áreas de mAU, dependiendo el grupo y el día de disección (Anexos 1 y 2). Se debe poder obtener como mínimo 0.5 μ l de hemolinfa, para inyectar los 5 μ l de muestra, debido al tamaño del inyector empleado (diluidas 1:100). La fase móvil debe mantenerse a un flujo de 1 ml/min, durante seis minutos, con el fin de evitar una detección errónea de la muestra y a su vez permitir la limpieza de la columna. Se inyectó una muestra sin saturar entre cada cambio de tratamiento (Sangre sin ARNdH, Control ARNdH y ARNdH RHBP) como control de posible contaminación o retención de proteína por parte de la columna.

Figura6. Cromatograma de una muestra sin saturación con hemina. Se inyectó 5 μ l de una muestra de hemolinfa sin saturar, la cual no presenta ningún tipo de pico que pudiera ser integrado para obtener el mAU en el tiempo de retención.

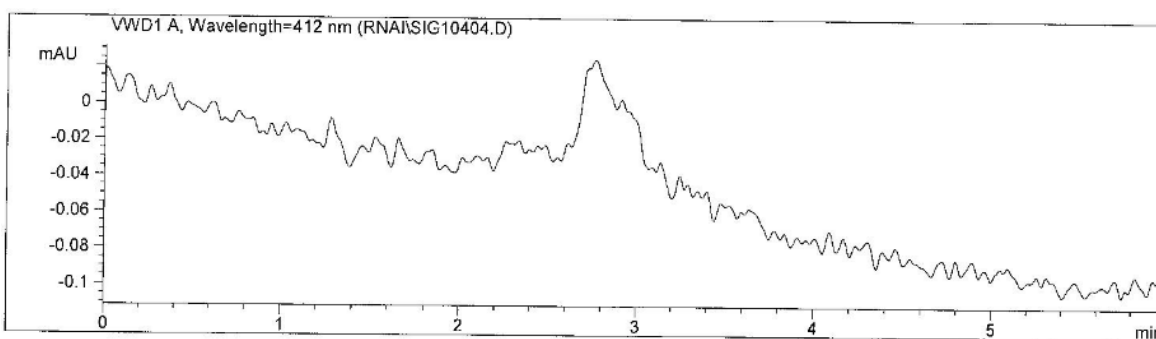


Figura7. Cromatograma de control de actividad de hemina sin hemolinfa. Se inyectó 5 μ l de hemina en una concentración de 10 mM (diluida 1:10) en el HPLC, observándose un tiempo de retención de 2:337 seg y un área de 6.3 mAU.

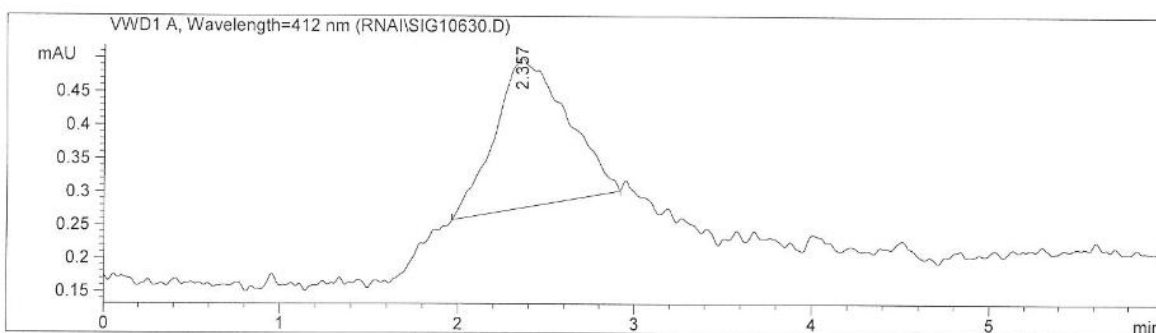
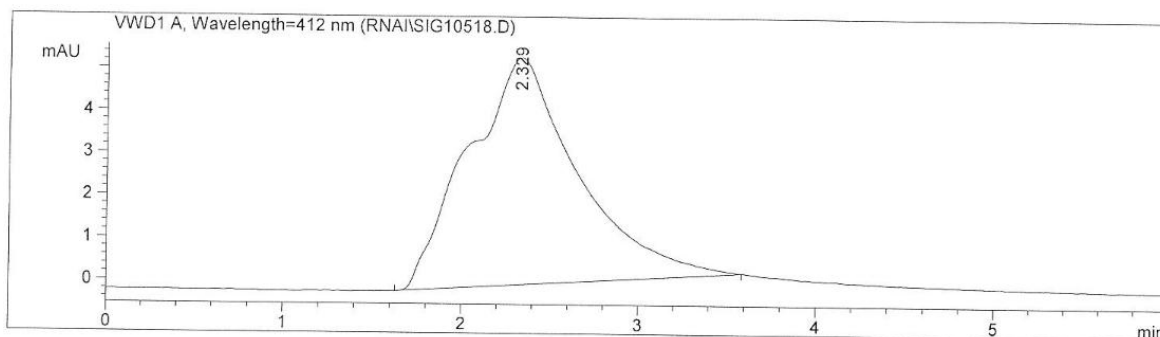


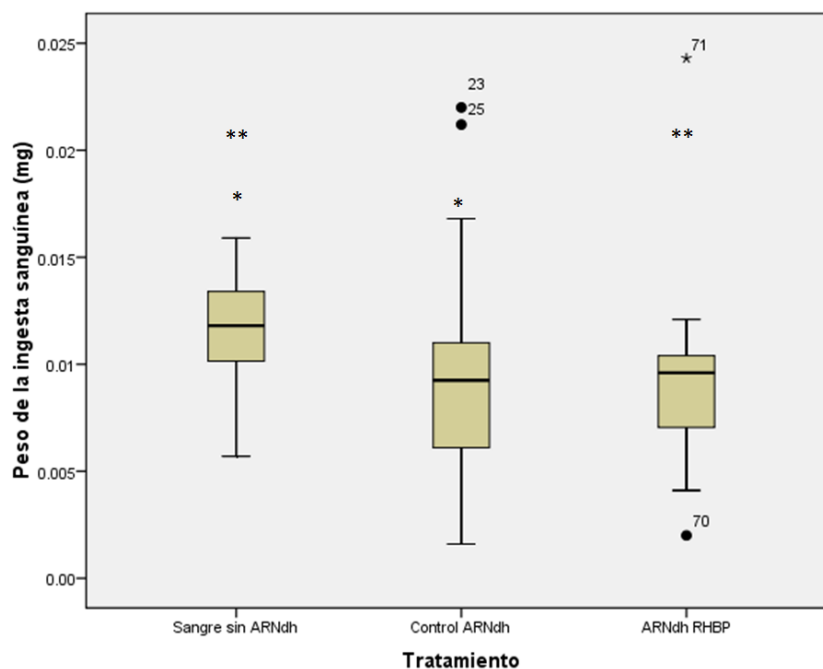
Figura8. Ejemplo de cromatograma de la muestra con ensayo de ingesta de tratamiento control ARNd_h de gen de planta saturada con un volumen de hemina a 10 mM. Se empleó la muestra 03P5R1, con la cual se obtuvo un tiempo de retención de 2:329 seg y un área de 231.5898 mAU



B. Análisis de interferencia de ARNd_h en *R. prolixus*

1. **Análisis de los pesos del consumo sanguíneo en el ensayo de ingesta (por vía oral).** Se compararon los pesos de la ingesta sanguínea, entre los tratamientos de un mismo ensayo (Fig. 9). Se observó que el grupo que recibió el tratamiento de sangre sin ARNd_h (N= 27), ingirió una mayor cantidad de sangre, que los otros dos tratamientos (prueba de Mann-Whitney suma de rangos, $p < 0.01$). Los tratamientos con el control ARNd_h (N= 26) y el ARNd_h RHBP (N= 23) mostraron un valor de $p > 0.05$ entre ellos demostrando que no existe diferencia en la cantidad de sangre consumida entre estos dos grupos. Esto puede indicar que el agregar algún tipo de ARNd_h en la sangre, genera una alteración en la alimentación de los individuos N3 de *R. prolixus*. Además indica que el control ARNd_h, es un mejor control de la actividad que se suscita en la fisiología de los individuos del tratamiento ARNd_h RHBP que el de sangre sin ARNd_h en el ensayo de ingesta. Los datos de la estadística descriptiva se pueden observar en el Cuadro 3.

Figura9. Peso de la ingesta sanguínea (mg) de los tres tratamientos del ensayo de ingesta de *R. prolixus* N3. Los individuos de dicha especie fueron pesados antes e inmediatamente después de la alimentación y éstos datos fueron analizados mediante una prueba de Mann-Whitney. Ésta determinó, que el tratamiento de Sangre sin ARNdH (N= 27), tuvo un valor de (*) (**) $p < 0.01$ en relación a los otros dos tratamientos; mientras que los tratamientos Control ARNdH (26) y ARNdH RHBP (N=23) obtuvieron un valor de $p > 0.05$ entre ellos.

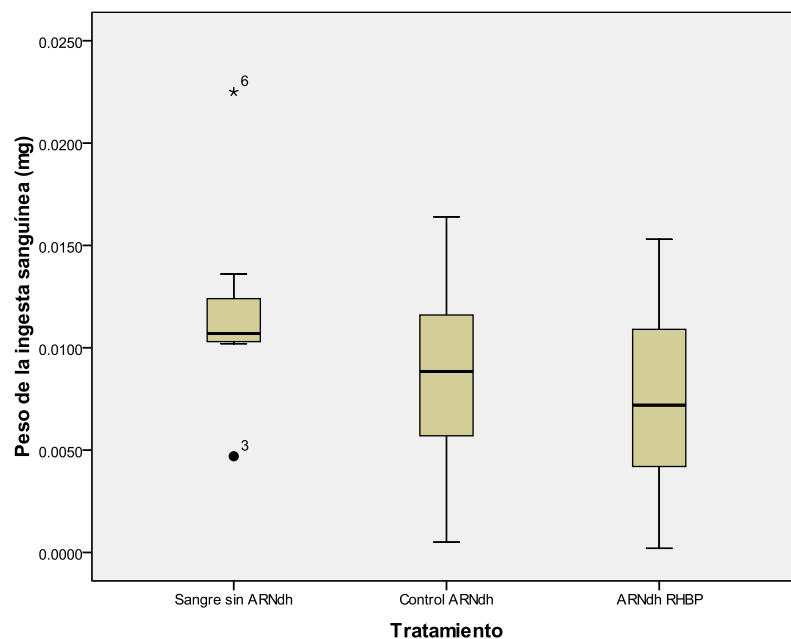


En el boxplot de la figura 9, se observó que existe un valor atípico en el tratamiento de ARNdH RHBP (No. 71), el cual fue eliminado de los próximos análisis realizados, ya que éste no se encuentra dentro del rango del tercer IQ. Con estos datos se delimitó el rango para el aumento de peso en los individuos del ensayo de ingesta e inyección, es de 16 a 222 mg; lo que se encontró fuera de este rango, no se tomó en cuenta para el estudio.

En los individuos del experimento de efecto en la muda (Fig. 10), se observó que no hubo diferencia significativa en la cantidad de sangre ingerida por los individuos, según el tratamiento de Sangre sin ARNdH (N= 9), Control ARNdH (N= 9) y ARNdH RHBP (N= 7) (Mann-Whitney suma de rangos, $p > 0.05$). Como se observa en el boxplot, los tratamientos

que recibieron ARNdH en su alimentación, tienen una mayor dispersión en relación a sus pesos. Los datos de la estadística descriptiva se observan en el Cuadro 3.

Figura10. Peso de la ingesta sanguínea (mg) de los tres tratamientos para el experimento de efectos de muda de N3 a N4 de *R. prolixus*. Los individuos de dicha especie fueron pesados antes e inmediatamente después de su alimentación y estos datos fueron analizados mediante una prueba de Mann-Whitney. Ésta demostró que entre todos los tratamientos se tiene un valor de $p > 0.05$.



Se observó que existe un valor atípico en el tratamiento de Sangre sin ARNdH (Fig. 10) (No. 6), el cual fue eliminado de los próximos análisis realizados, ya que éste no se encuentra dentro del tercer IQ. Luego en el experimento, se pudo ver que este individuo falleció en el catorceavo día.

Al contemplar los datos del Cuadro 3, se puede apreciar que el tratamiento de sangre sin ARNdH tiene una mayor ingesta de sangre, que los tratamientos con ARNdH, según sus medianas en ambos experimentos. A pesar de que no se encontró diferencia significativa en el experimento de efectos de muda, se aprecia un consumo con una menor dispersión parte del tratamiento sangre sin ARNdH; su nivel de significancia puede deberse a su

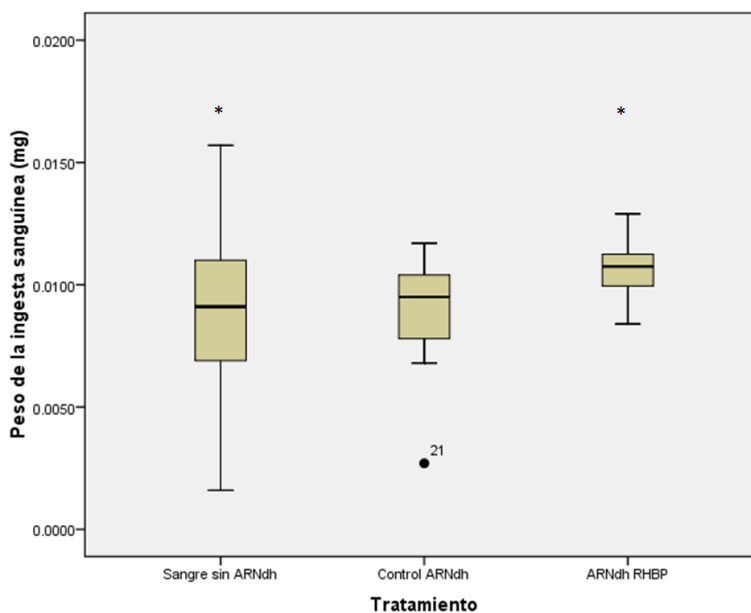
tamaño muestral. Esto corrobora la idea que en sí el ARNd_h genera una alteración en la alimentación de los individuos.

Cuadro 3. Estadística descriptiva de los valores de peso de ingesta sanguínea para el experimento de ingesta y el experimento de efectos de muda de N3 a N4

<i>Intervalo de confianza</i>					
Experimento ingesta	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Nivel de confianza %
<i>Sangre sin ARNd_h</i>	27	0.0108	0.0125	0.0117	90
<i>Control ARNd_h</i>	26	0.0078	0.0107	0.0091	90
<i>ARNd_h RHBP</i>	22	0.0078	0.0099	0.0089	90
Experimento efecto muda					
<i>Sangre sin ARNd_h</i>	8	0.0086	0.0124	0.0110	92
<i>Control ARNd_h</i>	9	0.0057	0.0116	0.0087	90
<i>ARNd_h RHBP</i>	7	0.0042	0.0113	0.0075	92

2. **Análisis de los pesos de la ingesta sanguínea en el ensayo de inyección.** Los individuos del ensayo inyección, demostraron un intervalo de confianza (Cuadro 3 y 4) distinta a los del ensayo de ingesta. No hubo diferencia significativa en la ingesta sanguínea, entre los dos grupos control: Sangre sin ARNd_h (N= 17) y el Control ARNd_h (N= 17) (Mann-Whitney suma de rangos, $p > 0.05$). Se detectó diferencia significativa en la ingesta sanguínea, entre el grupo control de Sangre sin ARNd_h y el ARNd_h RHBP (N= 16) (Mann-Whitney suma de rangos, $p = 0.045$). No hubo diferencia significativa en la ingesta sanguínea entre los dos grupos que recibieron ARNd_h: Control ARNd_h y ARNd_h RHBP (Mann-Whitney suma de rangos, $p > 0.05$). En el Cuadro 4 se contemplan los datos de la mediana y sus intervalos de confianza, con lo cual se logra apreciar que el tratamiento de ARNd_h tiene un consumo mayor que los controles.

Figura11. Peso de la ingesta sanguínea (mg) del ensayo de inyección en N3 de *R. prolixus*. Los individuos de dicha especie fueron pesados a las 24 horas después de su alimentación y estos datos fueron analizados mediante una prueba de Mann-Whitney. Se determinó que el tratamiento de Sangre sin ARNdH (N= 17) tuvo un valor de $p > 0.05$ con el tratamiento de Control ARNdH (N= 17) y un valor de $*p = 0.045$ para el tratamiento ARNdH RHBP. Los tratamientos de Control ARNdH y ARNdH RHBP (N= 16) tuvieron una $p > 0.05$.

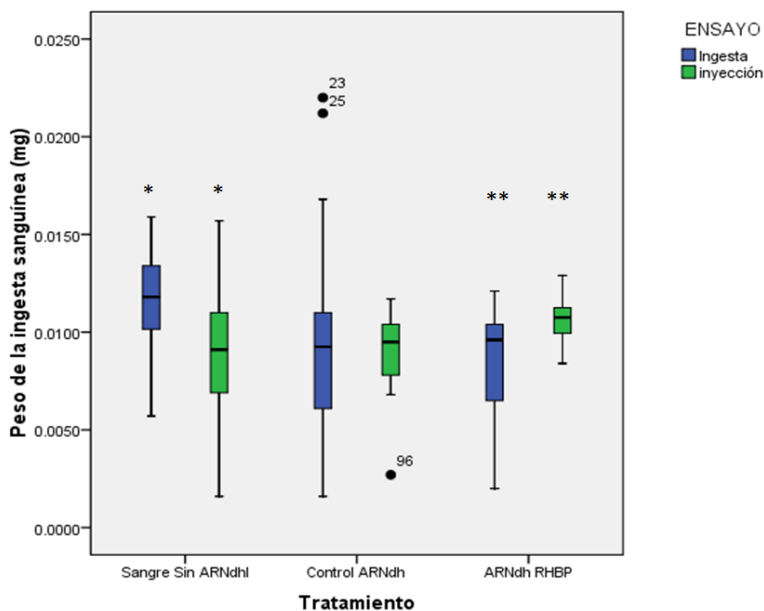


Cuadro 4. Estadística descriptiva de los valores de peso de ingesta sanguínea para el experimento de inyección

Ensayo de inyección	N	Intervalo de confianza			Nivel de confianza %
		Mínimo	Máximo	Mediana	
<i>Sangre sin ARNdH</i>	17	0.0076	0.0106	0.0089	90
<i>Control ARNdH</i>	17	0.0083	0.0100	0.0092	90
<i>ARNdH RHBP</i>	16	0.0102	0.0112	0.0107	90

3. **Análisis de los pesos de la ingesta sanguínea entre tratamientos de los ensayos de ingesta e inyección.** Se compararon los pesos de ingesta sanguínea, entre los tres tratamientos de los ensayos por vía oral y por inyección (Fig. 12). Se pudo observar, que para el tratamiento de Sangre sin ARNdh para los ensayo por vía oral (N= 27) e inyección (N= 17), sí hay una diferencia significativa en la cantidad de ingesta sanguínea (prueba de Mann-Whitney suma de rangos, $p < 0.01$). No se encontró una diferencia significativa para el tratamiento de Control ARNdh, para los ensayos por vía oral (N= 26) e inyección (N= 17) (prueba de Mann-Whitney suma de rangos, $p > 0.05$). Para el tratamiento de ARNdh RHBP, sí se encontró una diferencia significativa en la ingesta sanguínea, en los ensayos por vía oral (N= 22) e inyección (N= 16) (prueba de Mann-Whitney suma de rangos, $p = 0.009$). En el Cuadro 3 y 4, se observan los resultados de la estadística descriptiva de las medianas y sus intervalos de confianza, con lo cual se puede apreciar que el tratamiento de Sangre, sin ARNdh, tuvo una mayor ingesta para el ensayo por vía oral y que el ARNdh tuvo una mayor ingesta en el ensayo de inyección, lo cual se corrobora con los valores de p.

Figura12. Comparación de la ingesta sanguínea (mg) de individuos de *R. prolixus* N3 expuestos por vía oral y por inyección intratorácica según la vía de exposición. Estos datos fueron analizados mediante una prueba de Mann-Whitney. Ésta determinó que sí existe una diferencia significativa entre los tratamientos de Sangre sin ARNdh (*) (ingesta N= 27 e inyección N= 17) y ARNdh RHBP (**) (ingesta N= 26 e inyección N= 17) (prueba de Mann-Whitney suma de rangos, $p < 0.01$). No se encontró diferencia significativa entre el tratamiento Control ARNdh (ingesta N= 22 e inyección N= 16) (prueba de Mann-Whitney suma de rangos, $p > 0.05$).



4. **Análisis del peso relativo de ingesta sanguínea (mg sangre/mg de individuo) en los ensayos de ingesta e inyección.** Se compararon los mg de pesos de ingesta sanguínea, contra el peso sin alimentar, de los individuos de los ensayos de ingesta e inyección. Para el ensayo de ingesta (Fig. 13 A) en el tratamiento de Control ARNdhl, se encontró un valor atípico, que se encuentra fuera del rango del tercer IQ, el cual fue eliminado de este análisis. Para el ensayo de inyección (Fig. 13 B) en el tratamiento de Sangre sin ARNdhl, se encontró un valor atípico que se encuentra fuera del rango del tercer IQ, el cual fue eliminado de este análisis.

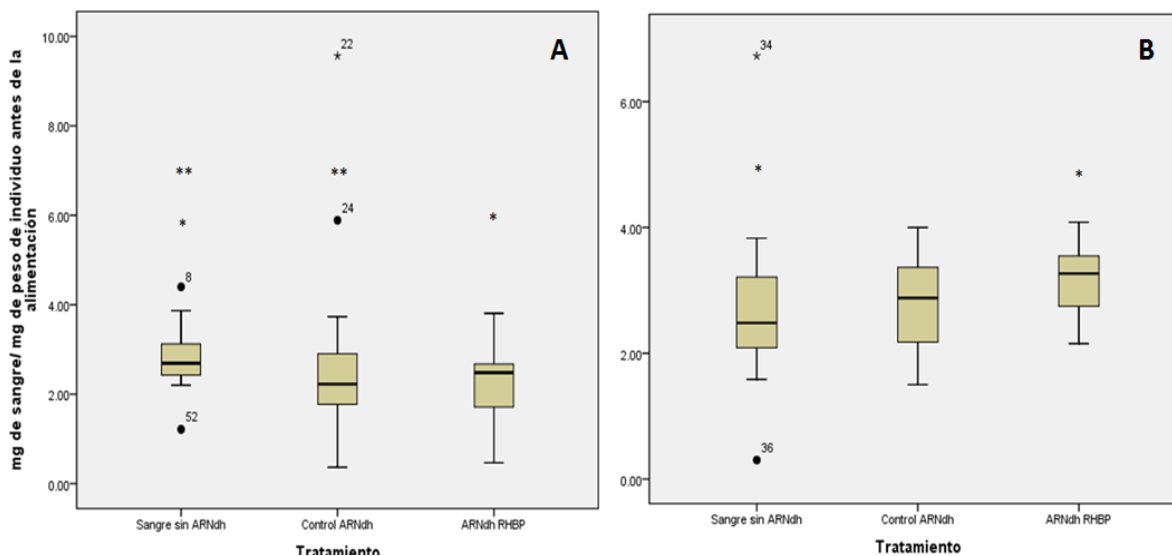
En el ensayo de ingesta, se observó una diferencia significativa en la dosis de sangre consumido y el peso original de los individuos, en el tratamiento de Sangre sin ARNdhl (N= 26) (prueba de Mann-Whitney suma de rangos, $p < 0.05$), en comparación con los tratamientos con ARNdhl. No se contempla diferencia significativa, en la dosis de sangre consumida y el peso original de los individuos, entre los tratamientos Control ARNdhl y ARNdhl RHBP $p > 0.05$ (prueba de Mann-Whitney suma de rangos).

No se observó una diferencia significativa, en la dosis de sangre consumida y el peso original de los individuos, en los tratamientos control: Sangre sin ARNdhl (N= 16) y Control ARNdhl (N= 17) (prueba de Mann-Whitney suma de rangos, $p > 0.05$); a su vez no se encontró diferencia significativa en los tratamientos con ARNdhl: Control ARNdhl y ARNdhl RHBP (N= 16) (prueba de Mann-Whitney suma de rangos, $p > 0.05$). Se apreció un

incremento significativo, en la dosis de sangre consumida, entre los tratamientos Sangre sin ARNdh y ARNdh RHBP (prueba de Mann-Whitney suma de rangos, $p < 0.05$). La estadística descriptiva con las medianas y rangos de confianza se pueden observar en el Cuadro 5.

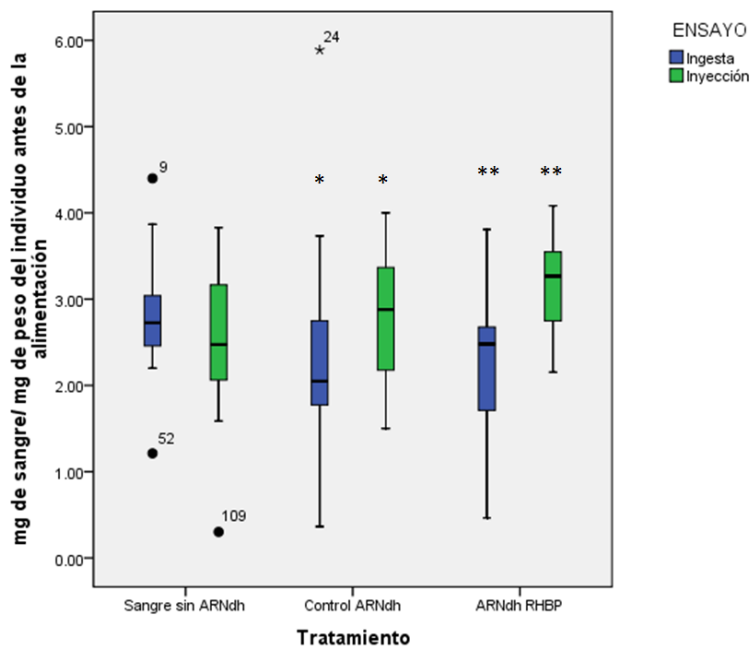
Los datos del ensayo ingesta, demuestran que el tratamiento que no tiene ARNdh, consume una mayor cantidad de sangre, en relación a su peso, que los grupos con ARNdh, corroborando los resultados anteriores, que el agregar ARNdh en la sangre, causa un menor consumo por parte de los individuos. En los datos del ensayo de inyección, se observa una fisiología distinta, ya que el ARNdh RHBP presenta un incremento significativo de la ingesta de sangre en relación al tratamiento de Sangre sin ARNdh. Esto comprueba, aún más, que el mejor control para analizar los datos de ARNdh, es el tratamiento de Control ARNdh, ya que estos dos tratamientos experimentaron características fisiológicas muy similares a lo largo de este estudio, por ejemplo, un consumo muy similar en la ingesta sanguínea.

Figura13. Análisis de la dosis de sangre mg/ mg del peso sin alimentación de los individuos del ensayo de ingesta e inyección en *R. prolixus* N3. Los datos de ambos ensayos fueron analizados mediante la prueba de Mann-Whitney. (A) Se observó que sí existe una diferencia significativa de (*) (**) $p < 0.05$ entre el tratamiento de sangre sin ARNdh (N= 26) y los tratamientos con ARNdh. No se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos control ARNdh (N= 25) y ARNdh RHBP (N= 22) con un valor de $p > 0.05$. (B) No se observó una diferencia significativa entre los tratamientos control: sangre sin ARNdh (N= 17) y control ARNdh (N= 17), ya que se obtuvo un valor de $p > 0.05$. Sí se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos sangre sin ARNdh y ARNdh RHBP (N= 16) con un valor de (*) $p < 0.05$. No se halló diferencia significativa entre los tratamientos con ARNdh $p > 0.05$.



En el análisis de comparación de dosis, entre mismos tratamientos de distintos ensayos (Fig. 14), se observó que no hay diferencia significativa en el tratamiento de sangre sin ARNdH (prueba de Mann-Whitney suma de rangos, $p= 0.097$), por lo que la dosis de ingesta de sangre, para ambos ensayos, es la misma. Sí se encontró una diferencia significativa, en la dosis de sangre consumida entre los tratamientos con ARNdH en diferentes ensayos (Control ARNdH $p= 0.023$ y ARNdH RHBP $p< 0.01$) (prueba de Mann-Whitney suma de rangos). Esto denota que los tratamientos con ARNdH que fueron sometidos al proceso de inyección, ven su fisiología alimenticia alterada, generando un mayor consumo de sangre, actividad que no se observó en el tratamiento de sangre sin ARNdH.

Figura14. Comparación entre tratamientos de la dosis de sangre mg/ mg del peso sin alimentación de los individuos en los ensayos de ingesta e inyección en *R. prolixus* N3. Los datos de ambos ensayos fueron analizados mediante la prueba de Mann-Whitney. Ésta determinó que sí existe una diferencia significativa en los tratamientos control ARNdH (*) (ingesta N= 27 e inyección N= 16) y ARNdH RHBP (**) (ingesta N= 22 e inyección N= 17) (prueba de Mann-Whitney suma de rangos, $p< 0.01$). No se encontró diferencia significativa en el tratamiento sangre sin ARNdH (ingesta N= 27 e inyección N= 16) (prueba de Mann-Whitney suma de rangos, $p> 0.05$).



Cuadro 5. Estadística descriptiva de los valores de la dosis de sangre mg/ mg del peso sin alimentación de los individuos del ensayo de ingesta e inyección

<i>Intervalo de confianza</i>					
Experimento	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Nivel de confianza %
Experimento ingesta					
<i>Sangre sin ARNdH</i>	27	2.600	2.980	2.555	90
<i>Control ARNdH</i>	25	1.923	2.666	2.282	90
<i>ARNdH RHBP</i>	22	1.940	2.552	2.306	90
Experimento inyección					
<i>Sangre sin ARNdH</i>	16	2.154	2.991	2.580	90
<i>Control ARNdH</i>	17	2.513	3.183	2.850	90
<i>ARNdH RHBP</i>	16	2.925	3.470	3.201	90

5. Análisis de las muestras de hemolinfa saturada mediante sus áreas de mAU para el ensayo de ingesta. Se analizaron un total de 75 muestras para el ensayo de ingesta, las cuales fueron comparadas entre tratamientos y dentro del mismo. Las muestras faltantes en este ensayo, se debe a una falta de obtención de hemolinfa en el proceso de disección (N= 8) o de una alimentación fuera del rango de aceptación (N= 7). Se pudo observar mediante el boxplot (Fig. 15) un valor atípico (No. 6), el cual fue eliminado por estar fuera del tercer IQ.

Al analizar el incremento de proteína circulante en la hemolinfa del d3 al d7, se encontró un incremento significativo en los dos tratamientos control: sangre sin ARNdh (d3 N= 12 y d7 N=14) y control ARNdh (d3 N= 14 y d7 N= 12) (prueba Mann-Whitney suma de rangos, $p < 0.01$ y $p = 0.02$, respectivamente). No se encontró un incremento significativo, en la proteína del d3 al d7 en el tratamiento de ARNdh RHBP (d3 N= 12 y d7 N= 10) (Mann-Whitney suma de rangos, $p > 0.05$).

Al analizar la cantidad de proteína del d3 entre tratamientos, no se encontró diferencia significativa entre ambos controles: sangre sin ARNdh y control ARNdh (Mann-Whitney suma de rangos, $p = 0.053$). No se encontró diferencia significativa entre los tratamientos que recibieron ARNdh: control ARNdh y ARNdh RHBP (prueba Mann-Whitney suma de rangos, $p = 0.560$). Se encontró una diferencia significativa entre el control de sangre sin ARNdh y ARNdh RHBP (Mann-Whitney suma de rangos, $p = 0.039$). Al analizar la cantidad de proteína del d7 entre tratamientos, no se encontró diferencia significativa entre todos los tratamientos: sangre sin ARNdh (N= 14), control ARNdh (N= 12) y ARNdh RHBP (N= 10) (Mann-Whitney suma de rangos, $p > 0.05$).

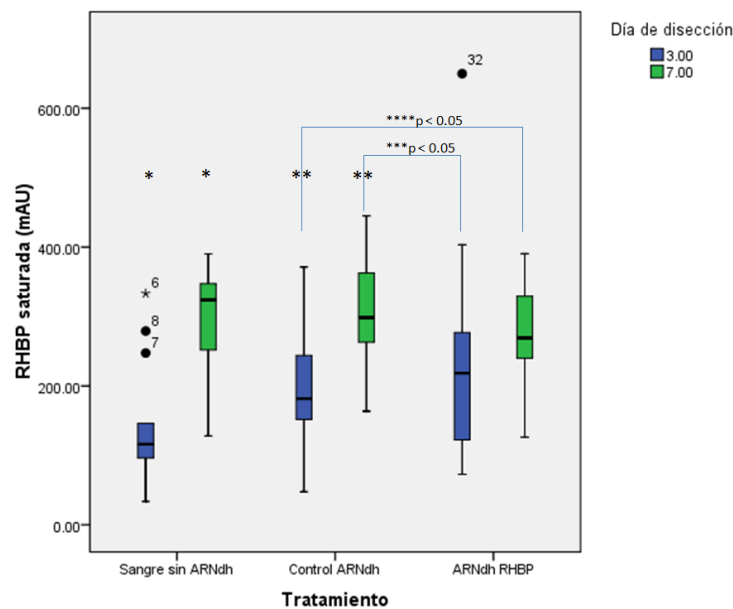
En la comparación, entre el tratamiento control ARNdh d3 y ARNdh RHBP d7, se observó un incremento significativo en la cantidad de proteína circulante, que se encontró en la hemolinfa (prueba Mann-Whitney suma de rangos, $p = 0.022$). Se contempló un incremento significativo de la proteína entre el tratamiento ARNdh RHBP d3 y control ARNdh d7 (prueba Mann-Whitney suma de rangos, $p = 0.039$).

En el Cuadro 6 se puede apreciar el valor de las medianas y los intervalos de confianza. En el tratamiento de Sangre sin ARNdh se observó una diferencia entre medias de 57-126 mAU y con el Control ARNdh se observó una diferencia de 52-117 mAU, esto denota el rango de mAU en el que aumentaron los individuos de cada tratamiento. Esto demuestra

que el incremento en la proteína que tuvieron sus individuos del d3 al d7 en estos tratamientos, es similar. En el tratamiento ARNdh RHBP, se pudo observar una diferencia, entre medias de 35-86 mAU, lo que indica que el aumento en la cantidad de proteína detectada, es menor en este tratamiento en comparación con los dos controles. Esto sugiere que para el d3, la cantidad de proteína en la hemolinfa circulante en el tratamiento ARNdh RHBP, era casi total, mientras que para el tratamiento Control ARNdh, no y su incremento fue significativamente mayor.

Al observar las medianas (Cuadro 6), se aprecia que la cantidad circulante de proteína en el d3 para ARNdh RHBP es mayor que en los dos controles, pero para el d7, esta cantidad es menor en relación a los dos controles, aunque este valor no sea estadísticamente significativo, lo cual puede ser consecuencia del tamaño muestral.

Figura15. Acumulación de la proteína RHBP en la hemolinfa de *R. prolixus* N3 en dos diferentes días luego de la alimentación. Los datos de los tratamientos fueron analizados mediante la prueba de Mann-Whitney. Se observó un incremento significativo en la cantidad de proteína en los tratamiento de sangre sin ARNdh (d3 N=12 y d7 N=14) (* $p < 0.01$) y control ARNdh (d3 N= 14 y d7 N= 12) (** $p < 0.05$). No se observó un incremento significativo en la cantidad de proteína en el tratamiento ARNdh RHBP (d3 N= 12 y en el d7 N= 10) ($p > 0.05$). Se apreció un incremento significativo entre los tratamientos control ARNdh d3 y ARNdh RHBP d7 (** $p < 0.05$) y los tratamientos ARNdh RHBP d3 y control ARNdh d7 (**** $p < 0.05$).



Cuadro 6. Estadística descriptiva de los valores de las áreas mAU de los tratamientos para d3 y d7 del ensayo de ingesta

<i>Intervalo de confianza</i>					
D3	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Nivel de confianza %
<i>Sangre sin ARNdH</i>	12	90.0	187.7	117.8	90
<i>Control ARNdH</i>	14	143.2	218.2	180.1	90
<i>ARNdH RHPB</i>	12	152.5	310.4	215.0	91
D7					
<i>Sangre sin ARNdH</i>	14	258.9	336.7	297.4	90
<i>Control ARNdH</i>	12	262.8	357.4	300.5	90
<i>ARNdH RHPB</i>	10	213.4	323.1	270.1	90

6. **Análisis de las muestras de hemolinfa mediante sus áreas de mAU para el ensayo de inyección.** Se analizaron un total de 50 muestras para este ensayo, las cuales fueron sometidas al mismo análisis que el ensayo anterior. Las muestras faltantes en el ensayo de inyección se debe principalmente a la mortalidad de este proceso (N= 19) y a la falta de alimentación (N= 11). Se pudo observar mediante el boxplot (Fig. 16) un valor atípico (No. 29), el cual fue eliminado del análisis estadístico de los datos, ya que se encuentra afuera del rango del tercer IQ.

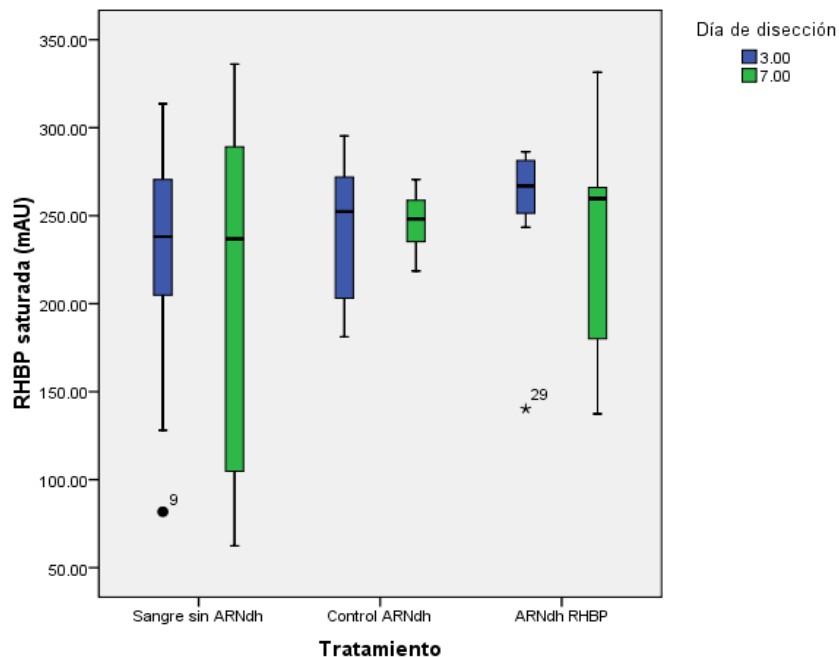
Al analizar el incremento de proteína circulante en la hemolinfa del d3 al d7, no se encontró un incremento significativo en ninguno de los tratamientos: sangre sin ARNdH (d3

N= 11 y d7 N= 6), control ARNdh (d3 N= 11 y d7 N= 6) y ARNdh RHBP (d3 N= 7 y d7 N= 8) (Mann-Whitney suma de rangos, $p > 0.05$). Esto indica que no existe una diferencia en la cantidad de proteína producido entre el d3 y d7, luego de la alimentación. Esto demostró que en el ensayo de inyección el ARNdh no produjo un cambio en la cantidad de proteína RHBP circulante.

Al analizar la cantidad de proteína del d3, no se encontró diferencia significativa en la cantidad de proteína circulante en la hemolinfa entre tratamientos: sangre sin ARNdh, control ARNdh y ARNdh RHBP (Mann-Whitney suma de rangos, $p > 0.05$). Analizando la cantidad de proteína del d7 entre tratamientos, no se encontró diferencia significativa entre todos los tratamientos: sangre sin ARNdh, control ARNdh y ARNdh RHBP (Mann-Whitney suma de rangos, $p > 0.05$). Estos resultados indican algún tipo de infección en los individuos, dado que las concentraciones encontradas en el d3 son de la misma cantidad que las del d7.

En el Cuadro 7 se puede apreciar el valor de las medianas y los intervalos de confianza. Se puede observar que los tratamientos de sangre sin ARNdh y ARNdh RHBP, tienen una menor cantidad de proteína circulante en la hemolinfa para el d7, mientras que en el tratamiento control ARNdh se observa una mayor cantidad. Estas variaciones en las cantidades de RHBP en la hemolinfa son tan leves que no hubo una diferencia significativa entre los tratamientos.

Figura16. Acumulación de la proteína RHBP en la hemolinfa de *R. prolixus* N3 en dos diferentes días luego de la alimentación. Los datos de los tratamientos fueron analizados mediante la prueba de Mann-Whitney. No se observó un incremento significativo en la cantidad de proteína, en los tratamiento de sangre sin ARNdh (d3 N=11 y d7 N=6), control ARNdh (d3 N=11 y d7 N=6) y ARNdh RHBP (d3 N= 7 y d7 N= 8) ($p > 0.05$), ni entre las comparaciones entre tratamientos.

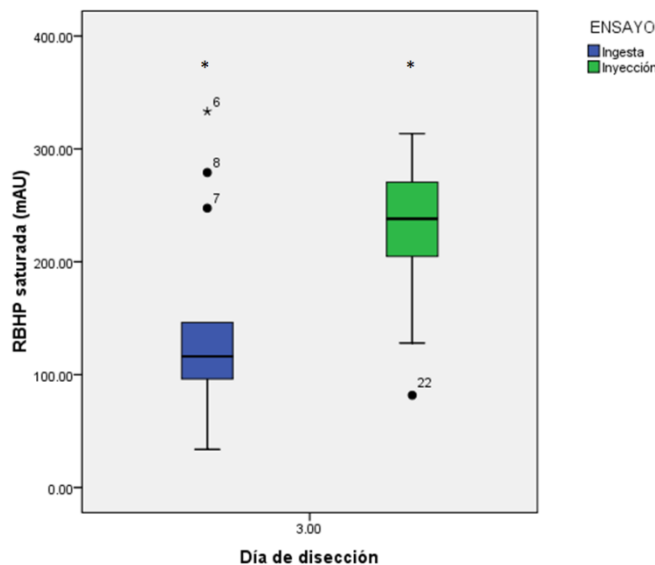


Cuadro 7. Estadística descriptiva de los valores de las áreas mAU de los tratamientos para d3 y d7 del ensayo de inyección

<i>Intervalo de confianza</i>					
D3	N	Mínimo	Máximo	Mediana	Nivel de confianza %
<i>Sangre sin ARNdH</i>	11	183.07	266.57	236.14	92
<i>Control ARNdH</i>	11	218.51	271.64	240.88	91
<i>ARNdH RHPB</i>	7	257.25	282.01	270.64	92
D7					
<i>Sangre sin ARNdH</i>	6	104.73	302.77	200.33	90
<i>Control ARNdH</i>	6	231.57	261.09	246.99	90
<i>ARNdH RHPB</i>	8	197.88	269.59	235.98	92

7. **Análisis de la proteína RHBP en el d3 para el tratamiento Sangre sin ARNdH en los ensayos de ingesta e inyección.** El análisis del incremento de la proteína circulante en la hemolinfa del d3 para el tratamiento sangre sin ARNdH, demostró un incremento significativo entre los dos ensayos: ingesta (N= 12) e inyección (N= 11) (prueba Mann-Whitney suma de rangos, $p= 0.03$). A pesar de que ambos ensayos tuvieron una dosis de ingesta sanguínea igual, se está suscitando una inducción de la proteína RHBP en la hemolinfa circulante para el ensayo de inyección. Esto afirma la noción, que los individuos del ensayo de inyección presentaron algún tipo de infección, como consecuencia de la punción, dado que la proteína RHBP ha sido involucrada en los procesos inmunes de infecciones causadas por hongos (Comunicación personal G. O. Paiva-Silva).

Figura17. Análisis de la cantidad de proteína del d3 para el tratamiento de Sangre sin ARNdH en los ensayos de ingesta e inyección de *R. prolixus* N3. Los datos de los tratamientos fueron analizados mediante la prueba de Mann-Whitney. Se observó un incremento significativo en la cantidad de proteína en el tratamiento sangre sin ARNdH en ambos ensayos $p= 0.03$.



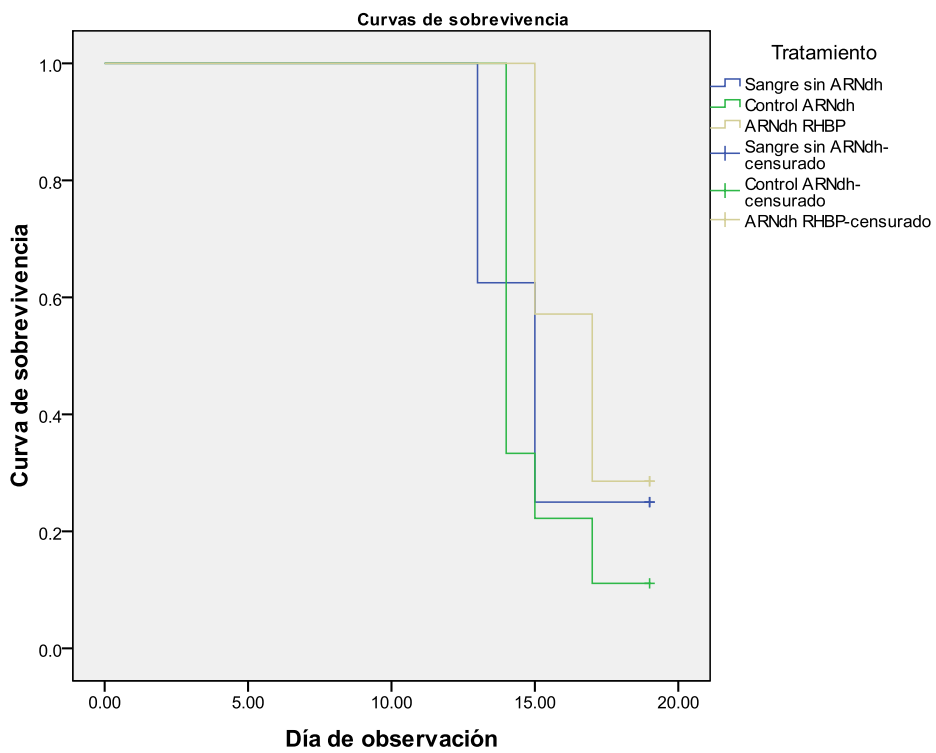
8. Análisis de los efectos de interferencia de ARN sobre la muda de N3 a N4 en el ensayo de ingesta. Se analizaron un total de 24 muestras para este experimento, las cuales fueron sometidas a un análisis de Kaplan-Meier (Curva de sobrevivencia) y a una Mann-Whitney, para determinar si existía una diferencia significativa en el retraso de muda de los individuos. Las muestras faltantes en este experimento (N= 6) se debieron a una ausencia en la alimentación.

Al analizar el tiempo que le tomó en mudar a los individuos a lo largo de 19 días de evaluación, no se encontró una diferencia significativa en ninguno de los tratamientos: sangre sin ARNdh (d3 N= 11 y d7 N= 6), control ARNdh (d3 N= 11 y d7 N= 6) y ARNdh RHBP (d3 N= 7 y d7 N= 8) (Mann-Whitney suma de rangos, $p > 0.05$). Esto indica que no hay evidencia significativa sobre un retraso en la muda de los individuos que fueron sometidos a la alimentación con ARNdh específico, para el gen RHBP. Aunque el retraso en el tiempo de muda no sea significativamente evidente, en el Cuadro 8 se puede observar la estadística descriptiva y la mediana de los datos que muestran un mayor tiempo de muda en el tratamiento de ARNdh RHBP con relación a los dos controles, la significancia podría llegar a obtenerse si se empleara un mayor número de individuos.

Cuadro 8. Estadística descriptiva del experimento de efectos de muda en el retraso de N3 a N4

Ensayo de inyección	N	Intervalo de confianza			Nivel de confianza %
		Mínimo	Máximo	Mediana	
<i>Sangre sin ARNdh</i>	8	13.63	16.86	15.204	92
<i>Control ARNdh</i>	9	13.89	16.11	15.000	90
<i>ARNdh RHBP</i>	7	15.48	17.94	16.714	92

Figura18. Experimento de efectos de la muda de N3 a N4 en *R. prolixus*. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kaplan-Meier (curva de sobrevivencia) y comparada entre sí, mediante una prueba de Mann-Whitney. No se observó una diferencia significativa en el tiempo de muda, en ninguno de los tratamientos: sangre sin ARNdh (N= 8), control ARNdh (N= 9) y ARNdh RHBP (N= 7) (Prueba de Mann-Whitney suma de rangos, $p > 0.05$).



IV. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar dos métodos para inducir interferencia de ARN por medio de ARN de doble hebra en la expresión del gen RHBP (*Rhodnius* Heme Binding Protein) en ninfas de *R. prolixus* Stahl 1859, vector de la enfermedad de Chagas.

Este estudio comprendió distintos aspectos en relación a la medición de los efectos de iARN en *R. prolixus*, con el fin de poder evaluar cual método de inoculación es el más efectivo para observar iARN en el gen RHBP. Para ésto, se llevó a cabo dos ensayos para inocular el ARNdh de distinta manera en los individuos, uno mediante la vía oral (ingesta) y otro mediante la inoculación directa (inyección).

En el ensayo de ingesta, se pudo observar que agregar ARNdh a la muestra de sangre reduce la cantidad de ingesta en un 16-23 % en relación a la sangre sin ARNdh (Fig. 9). En el Cuadro 3 y figuras 9-10, se puede apreciar que la dispersión de pesos que tienen los grupos con ARNdh, es mayor que el tratamiento de sangre sin ARNdh. Esto puede deberse principalmente a una variación en la densidad de la sangre de estos tratamientos, ya que el ARNdh podría conferirle a la sangre una mayor viscosidad. También demuestra que el control de un gen no específico, en este caso ARNdh de *A. thaliana* (control ARNdh), funciona como un mejor control para poder evaluar los efectos fisiológicos de los individuos del tratamiento ARNdh RHBP.

Al comparar los resultados de los ensayos por vía oral y por inyección, se observó un aumento en la cantidad de proteína circulando en la hemolinfa después de la inyección con agua. Esto sugiere que el proceso de inyección indujo la circulación de la proteína. Esto puede deberse a una respuesta inmune a una infección causada durante la inyección.

El ensayo de inyección no fue tan exitoso para poder evaluar los efectos de iARN, específico para el gen RHBP, probablemente debido a que la aguja no fue esterilizada y limpiada con etanol previo a la inyección. Es posible que se haya causado una infección en el insecto, que podría haber afectado la expresión del gen (RHBP ha sido incriminado en la respuesta inmune a hongos, comunicación personal G. O. Silva).

En los experimentos llevados a cabo con el HPLC, se pudo observar la cantidad de proteína acumulada (mAU) en los d3 y d7 luego de la alimentación. El ensayo de ingesta demostró un cambio significativo en la cinética de la acumulación de la proteína RHBP

circulante, en la hemolinfa de insectos del tratamiento ARNdh RHBP, comparado con el control ARNdh. Se observa una mayor dispersión de la proteína en el tratamiento de ARNdh RHBP con relación al Control ARNdh. Ésto puede deberse a las diferencias observadas entre los dos tratamientos en la dispersión de la ingesta relativa (Fig. 14). Zhou *et al* (2008) analizaron la ingesta oral de ARNdh en termitas (*Reticulitermes flavipes*) y encontraron que el peso del insecto y el número de dosis afectan la eficiencia de iARN.

En el análisis de ingesta se encontró un incremento significativo en la cantidad de proteína entre el d3 y d7 para el tratamiento control ARNdh, y no se observó un incremento en la cantidad de proteína para el tratamiento de ARNdh RHBP (Fig. 15). Al analizar los datos entre tratamientos dentro del mismo día (d3 y d7), no se encontró diferencia significativa en la cantidad de proteína. Esto sugiere que la presencia del ARNdh de RHBP tuvo un efecto leve en la acumulación de la proteína en la hemolinfa pero este no llegó a afectar la cantidad total de la proteína circulante.

En el experimento de efectos de muda, no se apreció diferencia significativa en el retraso de muda, en los tres tratamientos: sangre sin ARNdh, control ARNdh y ARNdh RHBP. Esto se debe principalmente al tamaño de la muestra (Fuentelsaz 2004), ya que con un número mayor de individuos, probablemente sí se hubiera visto un retraso en la muda estadísticamente significativo, dado que se logra apreciar en la mediana (Cuadro 8) de los tratamientos, un retraso de un día en el tratamiento de ARNdh RHBP. Si se logra alimentar a los individuos con una concentración de ARNdh mayor, los efectos de muda podrían ser más notorios.

El ensayo de ingesta no demostró efectos de interferencia de ARN a nivel de proteína estadísticamente significativo, lo que si se pudo observar es una diferencia en la acumulación de la proteína en relación al control. Esto sugiere que con una muestra de mayor tamaño los efectos podrían ser más notorios. El ensayo de inyección no se pudo evaluar, posiblemente debido a una infección que ese día en los individuos como consecuencia de la punción.

Debido a la importancia de la fisiología, que se suscita en los organismos sometidos a iARN de un gen específico, se debe considerar una amplia cantidad de factores que son independientes del organismo evaluado, y de sus diferentes etapas de desarrollo. Lo principal que se pudo observar de éste estudio de N3 con *R. prolixus*, fue que se necesita un

mayor tamaño muestral para evaluar con más precisión los efectos de iARN en el retraso de muda. El emplear una mayor cantidad de ARNdh en la sangre puede llegar a generar una mayor viscosidad dificultando la alimentación de los estadios menores a N3 y esto no certifica un mayor efecto de interferencia (Araujo *et al*, 2006; Huvenne y Smagghe 2009). La dosis de ingesta sanguínea es lo que indica cuanto ARNdh están ingiriendo las chinches en la alimentación, por lo que debe ser el parámetro de selección de individuos.

Este proyecto de investigación ha sido desarrollado en conjunto con la cooperación de la Universidad Simon Fraser, la Universidad Federal de Río de Janeiro y el Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala. Los resultados obtenidos de esta tesis serán utilizados en el proyecto "Evaluación de una molécula como candidata para blanco de un insecticida microbiano contra los vectores de la enfermedad de Chagas." y comparado con los datos de: efectos de oviposición en la alimentación con bacterias que expresan ARNdh in vivo, retraso de muda en N1 y el análisis del ARN mensajero (mediante la técnica qRT-PCR) de las muestras obtenidas de éste estudio.

V. CONCLUSIONES

1. El mejor control para el análisis de datos es el de ARNdh de un gen no específico (*A. thaliana*) debido al cambio en la alimentación causado por la presencia del ARNdh.
2. La técnica de HPLC y su metodología descrita en este estudio es eficiente para detectar los cambios en la concentración de la proteína RHBP en muestras de hemolinfa saturada.
3. La cinética de acumulación de proteína en la hemolinfa se ve alterada por el ARNdh en la sangre.
4. La proteína RHBP está involucrada en la respuesta de inmune de *R. prolixus*, aumentando la inducción de la proteína como consecuencia de esto.
5. La presencia del ARNdh de RHBP tuvo un efecto leve en la acumulación de la proteína en la hemolinfa pero este no llegó a afectar la cantidad total de la proteína circulante.

VI. RECOMENDACIONES

Se debería realizar este experimento con *R. prolixus* N5 para facilitar el proceso de inyección y luego de haber realizado la inyección colocar a los individuos en un área estéril para evitar la mayor cantidad de infecciones posible. Realizar el experimento de inyección mediante la inoculación 24 horas antes de la alimentación en un grupo y 24 horas después de la alimentación en otro. Llevar a cabo el experimento de ingesta mediante la alimentación con bacterias que expresen el ARNdh para la proteína RHBP. Analizar la cantidad de proteína a las 48 horas luego de la alimentación. Repetir el efecto de muda con una mayor cantidad de individuos.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Adams, M. 2003. *Control of hormonal development*. University of Arizona, En Encyclopedia of Insects. Editores V. Resh y R. Cardé. Academic Press. Pp 300-304.
2. Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA) y Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2006. *Proyecto regional de control de la enfermedad de Chagas*. 3-7 pp.
3. Agrawal, N.; P. Dasaradhi, A. Mohmmmed, P. Malhotra, R. Bhatnagar y S. Mukherjee. 2003. *RNA interference: biology, mechanism, and applications*. Microbiol Mol Biol Rev **67**(4):657-685.
4. Araujo, R.; A. Santos, F. Pinto, N. Gontijo, M. Lehane y M. Pereira. 2006. *RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug Rhodnius prolixus (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection*. Insect Biochem and Mol Bio **36**:683-693.
5. Beard, C. B. 2004. *Kissing bugs and bedbugs, the heteroptera in biology of disease vectors*. Estados Unidos, Colorado. University Press of Colorado. Pp 20-24.
6. Braz, G.; M. Moreira, H. Masuda y P. Oliveira. 2002. *Rhodnius heme-binding protein (RHBP) is a heme source for embryonic development in the blood-sucking bug Rhodnius prolixus (Hemiptera, Reduviidae)*. Insect Biochem Biol Mol **32**:361-367.
7. Burke, S. 1998. *Missing values, outliers, robust statistics and non-parametric methods*. Statistics and data analysis. RHM technology Bukinghamshire, London. Pp 1-6.
8. Chapman, R. 2003. *Feeding behavior*. University of Arizona, En: Encyclopedia of Insects. Editores V. Resh y R. Cardé. Academic Press, USA. Pp 409-414.
9. Dansa, M.; J. Ribeiro, G. Atella, H. Masuda y P. Oliveira. 1995. *Antioxidant role of Rhodnius prolixus heme-binding Protein*. J Biol Chem Vol 270 (18):10893-10896.
10. Davis E. y P. Sokolove. 1975. *Temperature responses of antennal receptors of the mosquito, Aedes aegypti*. J Comp Physiol **6**:223-236.

11. Dujardin, J.; M. Muñoz, T. Chavez, C. Ponce, C. Moreno y C. Schofield. 1998. *The origin of Rhodnius prolixus in Central America*. Med Vete Entomol **12**:113-115.
12. Fire, A.; S. Xu, M. Montgomery, S. Kostas, S. Driver y C. Mello. 1998. *Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature **391** (6669):806-811.
13. Fuentelsaz, C. 2004. *Cálculo del tamaño de la muestra*. Hospital Universitario de Barcelona, Matronas Profesión **5** (18). Pp 1-9.
14. Halliwell, B. y J. Gutteridge. 1989. *Free radicals in biology and medicine*. Claredon Press, Oxford. 13-47 pp.
15. Huvenne, H. y G. Smagghe. 2009. *Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential for RNAi for pest control: A review*. Journal of Insect Physiology. Article in press.
16. Machado, E.; P. Oliveira, M. Moreira, W. de Souza y H. Masuda. 1998. *Uptake of Rhodnius heme-binding protein (RHBP) by the ovary of Rhodnius prolixus*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology **39**:133-143.
17. Monroy, C.; A. Rodas, M. Mejía, R. Rosales y Y. Tabaru. 2003. *Epidemiology of Chagas disease in Guatemala: infection rate of Triatoma dimidiata, Triatoma nitida and Rhodnius prolixus (Hemiptera, Reduviidae) with Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli (Kinetoplastida, Trypanosomatidae)*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. **98** (3):305-310.
18. Organización Panamericana de la Salud (OPS) 2002. *Manual para capacitadores sobre la enfermedad de Chagas*. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Agencia de Cooperación Internacional del Japón y Organización Panamericana de la Salud. Pp 2-38
19. Paiva, G.; M. Sorgine, C. Benedetti, R. Meneghini, I. Almeida, E. Machado, M. Dansa, G. Yepiz, J. Law, P. Oliveira y H. Masuda. 2002. *On the biosynthesis of Rhodnius heme-binding protein*. Insect Biochem and Mol Biol **32**:1533-1541.
20. Paz-Bailey, G.; C. Monroy, A. Rodas, R. Rosales, Y. Tabau, C. Davies y J. Lines. 2002. *Incidence of Trypanosoma cruzi infection in two Guatemalan communities*. Trans R Soc Trop Med Hyg **96**:42-52.

21. Pennington, P. y C. Beard. 2004. *Care, maintenance and handling of infected triatomines* In *Biology of disease vectors*. University Press of Colorado. Pp 118-129
22. Ponce, C., E. Ponce, M. Ávila y O. Bustillo. 1995. *Ensayos de intervención con nuevas estrategias para el control de la enfermedad de Chagas en Honduras*. Ministerio de Salud, Honduras. Pp 1-7
23. Ponce, C.; E. Ponce, E. Vinelli, A. Montoya, V. Aguilar, A. Gonzáles, B. Zingales, R. Rangel, M. Levin, E. Umezawa, A. Luquetti y J. Silveira. 2005. *Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of Chagas disease by detection of Trypanosoma cruzi-specific antibodies in blood donors and patients in Central America*. J Clin Microbiol **43**:5065-5068.
24. Ponce, Carlos. 2007. *Current situation of Chagas disease in Central America*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. **102** (Suppl. D):41-44.
25. Ramakrishnan, V.; M. Aljamali, J. Sauer y R. Essenberg. 2005. *Application of RNA interference in tick salivary gland research*. J Biomol Tech **16**(4):297-305.
26. Remme, J. H.; P. Feenstra, P. Lever, A. Médici, C. Morel, M. Noma, K. Ramaiah, F. Richards, A. Seketeli, G. Schmunis, W. Brakel y A. Vassall. 2006. *Tropical diseases targeted for elimination: Chagas disease, lymphatic filariasis, onchocerciasis, and leprosy*. Disease Control Priorities in Developing Countries, Capítulo 22. Pp 433-449.
27. Research, T. 2002. *Strategic direction for research: Chagas*. Pp 18-24.
28. Salazar, M. 2004. *Transmisión de la enfermedad de Chagas*. Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM. En: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/chagas/cruzi.html>
29. Sanchez-Martin, M.; M. Feliciangeli, D. Campbell y C. Davies. 2006. *Could the Chagas disease elimination programme in Venezuela be compromised by reinvasion of houses by sylvatic Rhodnius prolixus bug populations?* Tropical Medicine and International Health. **11**(10):1585-1593.
30. Schmunis, G. 2000. *A tripanossomiase Americana e seu impacto na saude publica das Américas*. En *Trypanosoma cruzi e doenca de Chagas* 2^{da} edición. Editores Z. Brener, Z. Andrade y M. Barral. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. Pp 110-121.

31. Schofield, C. J. 1994. *Triatominae: biología y control*. West Sussex, Eurocommunica Publications. Pp 37-45
32. Schofield, C.; J. Jannin y R. Salvatella. 2006. *The future of Chagas disease control*. Trends Parasitol **22**(12):583-588.
33. Scott, D. y J. Blair. 2004. *Finding outliers in models of spatial data*. Rice University, Houston. Pp 1-6.
34. Stram, Y. y L. Kuzntzova. 2006. *Inhibition of viruses by RNA interference*. Virus Genes **32**(3):299-306.
35. Superlano, Y.; E. Lizano, I. Galíndez y E. Aldana. 2006. *Aislamiento reproductivo postcigótico entre *Rhodnius prolixus* Stahl 1859 y *R. robustus* Larrousse 1927 (Heteroptera, Triatominae)*. Parasitol Latinoam **61**:23-31.
36. Timmons, L. y A. Fire. 1998. *Specific interference by ingested dsRNA*. Nature **395**:854.
37. Timmons, L.; H. Tabara, C. Mello y A. Fire. 2003. *Inducible systemic RNA silencing in *Caenorhabditis elegans**. Mol Biol Cell **14**(7):2972-2983.
38. Vassena, C.; M. Picollo y E. Zerba. 2000. *Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus**. Med Vet Entomol **14**(1):51-55.
39. Wheeler, D. 2003. *Female: hormonal control of reproduction*. University of Arizona. En: Encyclopedia of Insects. Editores V. Resh y R. Cardé. Academic Press, Arizona. Pp 994-997.
40. WHO (World Health Organization). 1991. *Control of Chagas disease: report of a WHO Expert Committee*. Technical Report 811. Geneva. Pp 260.
41. WHO. 2002d. *The World Health Report 2002: reducing risks, promoting healthy life*. Technical Report 248. Geneva. Pp 310.
42. Wigglesworth, V. 1965. *The principles of insect physiology*. 6^{ta} Edición. Methuen, London. Pp 808.
43. Yeung, E. y R. Synovec. 1986. *Detectors for liquid chromatography*. Anal Chem **58**:2-5.

44. Zeledón, R. 2004. *Some historical facts and recent issues related to the presence of Rhodnius prolixus (Stal, 1859) (Hemiptera: Reduviidae) in Central America.* Entomol Vect **11**:233-246.
45. Zhou, X., M. Wheeler, F. Oi y M. Scharf. 2008. *RNA interference in the termite Reticulitermes flavipes through ingestion of double-stranded RNA.* Insect Biochemistry and Molecular Biology **38**:805-815.

VIII. ANEXOS

A. Cromatogramas de las muestras del ensayo de ingesta

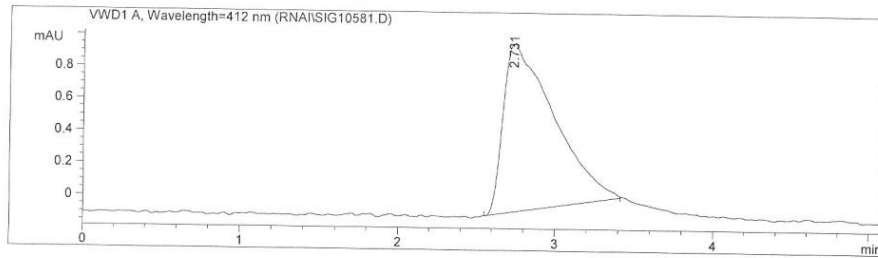
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10581.D

Sample Name: RHPB 1ug/ul-3

Proteina liofilizada resuspendida en H2O DEPC

=====
Injection Date : 10/8/2009 10:43:32 AM
Sample Name : RHPB 1ug/ul-3 Location : Vial 1
Acq. Operator : AdEM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed : 10/8/2009 9:22:03 AM by GC2
(modified after loading)

Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	2.731	BB	0.2963	23.37076		1.04916	100.0000

Totals : 23.37076 1.04916

Results obtained with enhanced integrator!

=====
*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10580.D

Sample Name: RHPB lug/ul-2

Proteina liofilizada resuspendida en H2O DEPC

```

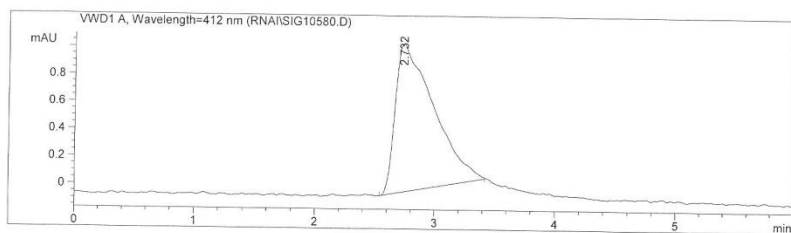
=====
Injection Date   : 10/8/2009 10:37:05 AM
Sample Name     : RHPB lug/ul-2           Location : Vial 1
Acq. Operator   : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method          : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 10/8/2009 9:22:03 AM by GC2
                  (modified after loading)

```

```

Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.732	BB	0.2940	24.00715	1.08111	100.0000

```
Totals :                24.00715  1.08111
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/8/2009 10:43:12 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10579.D

Sample Name: RHPB lug/ul

Proteina liofilizada resuspendida en H2O DEPC

```

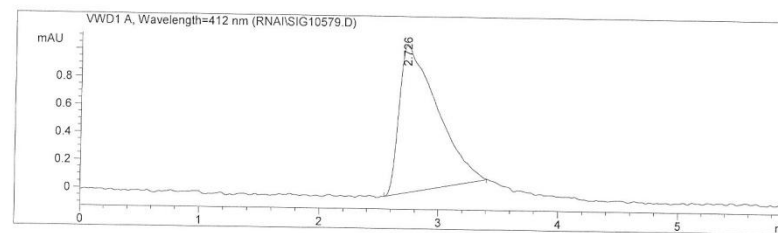
=====
Injection Date   : 10/8/2009 10:30:32 AM
Sample Name     : RHPB lug/ul           Location : Vial 1
Acq. Operator   : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method          : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 10/8/2009 9:22:03 AM by GC2
                  (modified after loading)

```

```

Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.726	PB	0.2885	23.50995	1.06967	100.0000

```
Totals :                23.50995  1.06967
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/8/2009 10:36:38 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10568.D

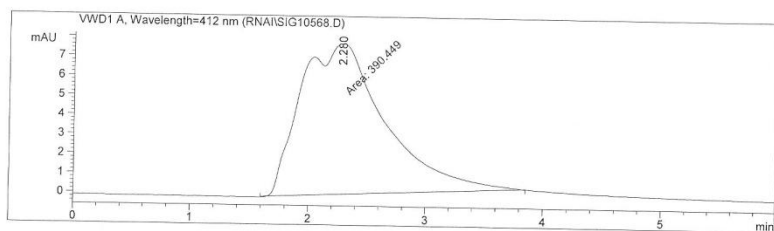
Sample Name: O7R4R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 5:53:58 PM
Sample Name    : O7R4R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed  : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.280	MM	0.8405	390.44910	7.74205	100.0000

```
Totals :                390.44910    7.74205
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 6:00:20 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10567.D

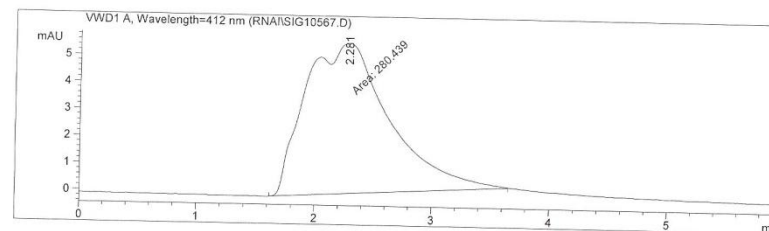
Sample Name: O7R2R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 5:46:52 PM
Sample Name    : O7R2R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed  : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.281	MM	0.8383	280.43872	5.57580	100.0000

```
Totals :                280.43872    5.57580
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 5:53:29 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10566.D

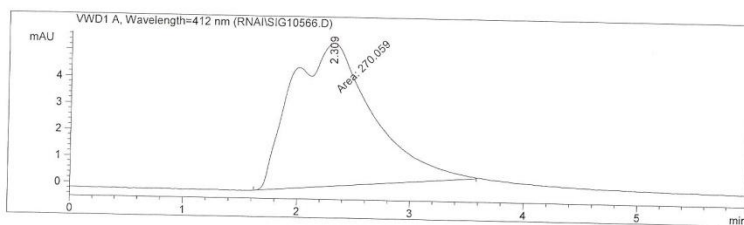
Sample Name: O7R1R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 5:40:01 PM
Sample Name : O7R1R2-4
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.309	MM	0.8374	270.05896	5.37496	100.0000

```
Totals :                270.05896  5.37496
```

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 5:46:29 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10565.D

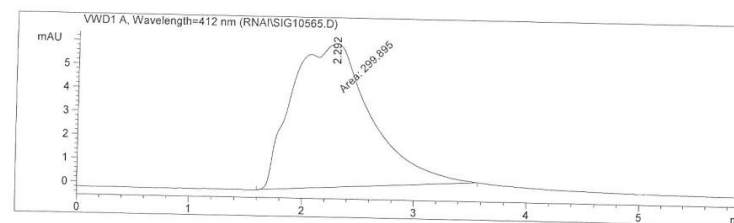
Sample Name: O7P3R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 5:33:03 PM
Sample Name : O7P3R2-4
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.292	MM	0.8209	299.89532	6.08894	100.0000

```
Totals :                299.89532  6.08894
```

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 5:39:46 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10564.D

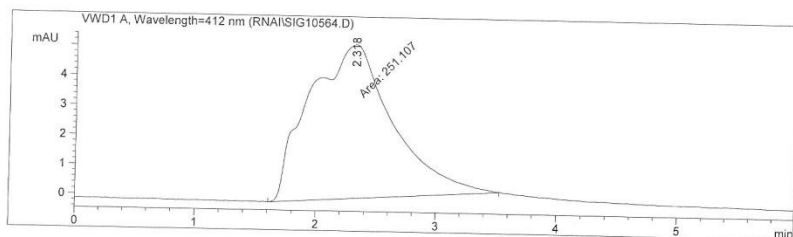
Sample Name: O7P3R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 5:24:40 PM
Sample Name    : O7P3R2-4
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.318	MM	0.8089	251.10704	5.17378	100.0000
Totals :				251.10704	5.17378	

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 5:31:19 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10563.D

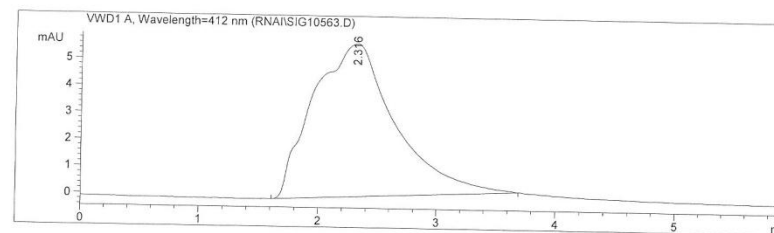
Sample Name: O7P2R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 5:18:10 PM
Sample Name    : O7P2R2-4
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.316	BB	0.6385	274.57697	5.69174	100.0000
Totals :				274.57697	5.69174	

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 5:24:16 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10562.D

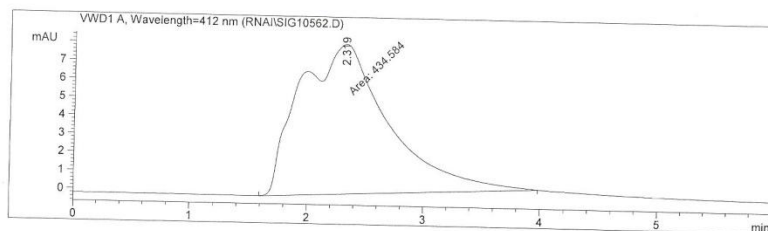
Sample Name: O7P1R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 5:11:09 PM
Sample Name     : O7P1R2-4
Acq. Operator   : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                 (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.319	MM	0.8888	434.58356	8.14942	100.0000

```
Totals : 434.58356 8.14942
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 5:17:34 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10561.D

Sample Name: O7C5R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

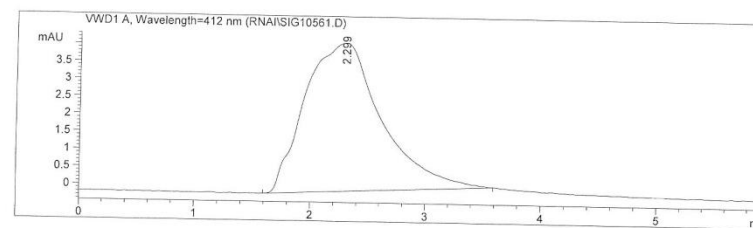
=====
Injection Date   : 9/29/2009 5:04:28 PM
Sample Name     : O7C5R2-4
Acq. Operator   : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                 (modified after loading)

```

```

Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.299	BB	0.6161	195.99939	4.22047	100.0000

```
Totals : 195.99939 4.22047
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 5:10:34 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10560.D

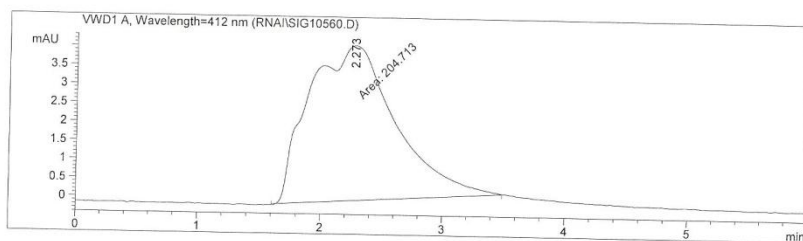
Sample Name: O7C4R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 4:57:22 PM
Sample Name     : O7C4R2-4                      Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height *s [mAU]	Area %
1	2.273	MM	0.8266	204.71346	4.12776	100.0000

```
Totals :                204.71346  4.12776
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***
=====

```

Instrument 2 9/29/2009 5:04:03 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10559.D

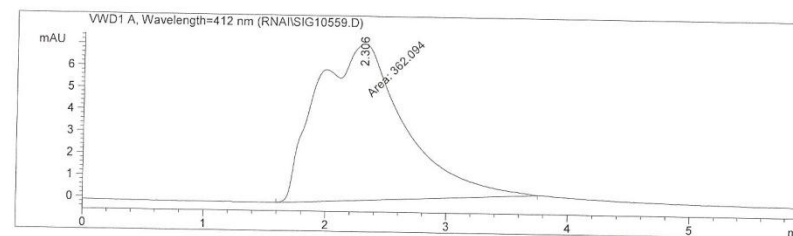
Sample Name: O7C3R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 4:50:16 PM
Sample Name     : O7C3R2-4                      Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height *s [mAU]	Area %
1	2.306	MM	0.8458	362.09424	7.13500	100.0000

```
Totals :                362.09424  7.13500
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***
=====

```

Instrument 2 9/29/2009 4:56:59 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10558.D

Sample Name: O7C2R2-4

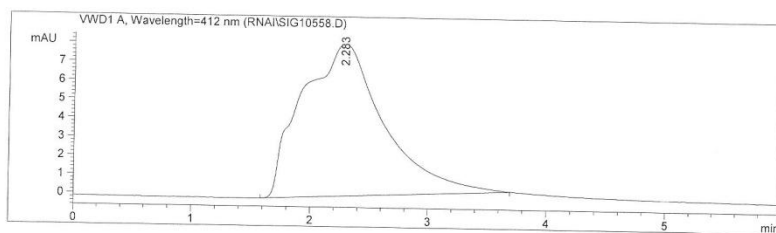
Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 4:43:40 PM
Sample Name    : O7C2R2-4
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Location       : Vial 1

Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.283	BB	0.6362	390.15112	8.07874	100.0000

```
Totals :                390.15112    8.07874
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***
=====

```

Instrument 2 9/29/2009 4:49:46 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10557.D

Sample Name: O7C1R2-4

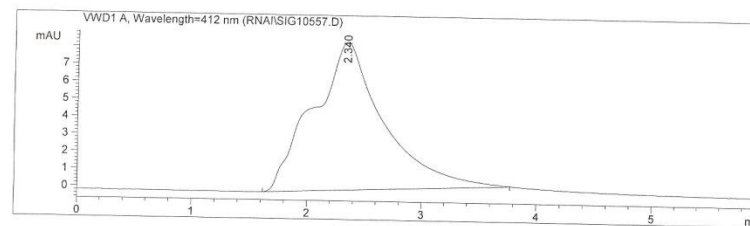
Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 4:37:01 PM
Sample Name    : O7C1R2-4
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Location       : Vial 1

Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.340	PB	0.5640	363.15884	8.47484	100.0000

```
Totals :                363.15884    8.47484
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***
=====

```

Instrument 2 9/29/2009 4:43:08 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10556.D

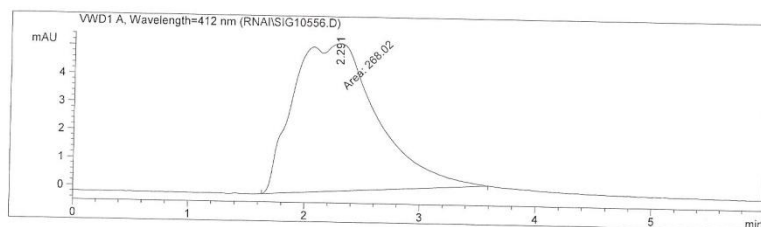
Sample Name: O7R5R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 4:30:03 PM
Sample Name    : O7R5R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.291	MM	0.8527	268.02045	5.23867	100.0000

```
Totals :                268.02045  5.23867
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 4:36:29 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10555.D

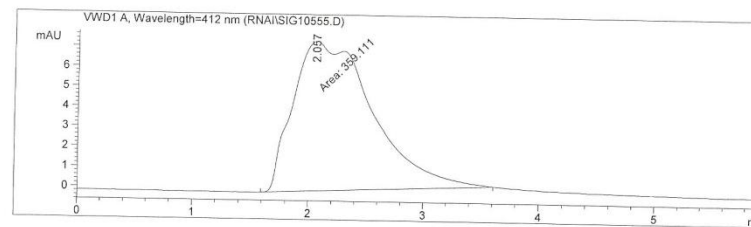
Sample Name: O7R4R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 4:23:18 PM
Sample Name    : O7R4R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.057	MM	0.8016	359.11087	7.46692	100.0000

```
Totals :                359.11087  7.46692
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 4:29:45 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10554.D

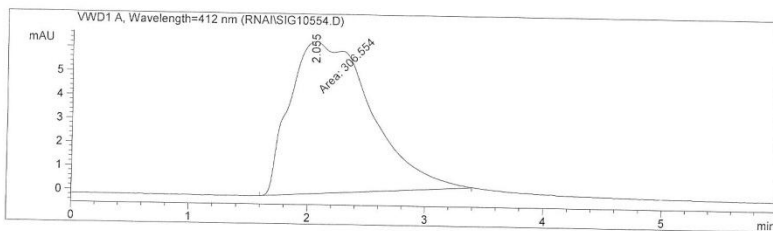
Sample Name: O7R3R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 4:16:38 PM
Sample Name : O7R3R1-4
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.055	MM	0.7986	306.55414	6.39812	100.0000

```
Totals :                306.55414    6.39812
```

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 4:23:00 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10553.D

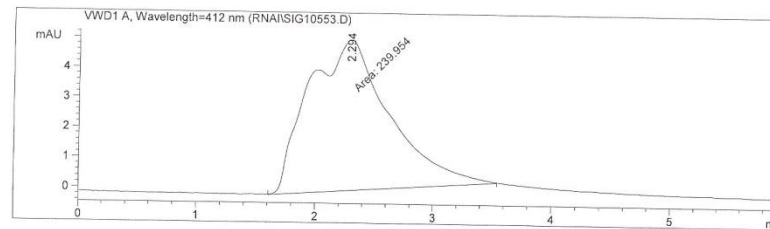
Sample Name: O7R1R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 4:09:54 PM
Sample Name : O7R1R1-4
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.294	MM	0.7976	239.95425	5.01426	100.0000

```
Totals :                239.95425    5.01426
```

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 4:16:18 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10552.D

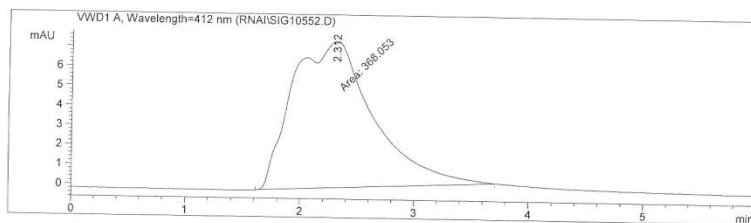
Sample Name: O7P5R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 4:03:06 PM
Sample Name    : O7P5R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.312	MM	0.8237	368.05322	7.44694	100.0000

```
Totals :                368.05322    7.44694
```

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 4:09:29 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10551.D

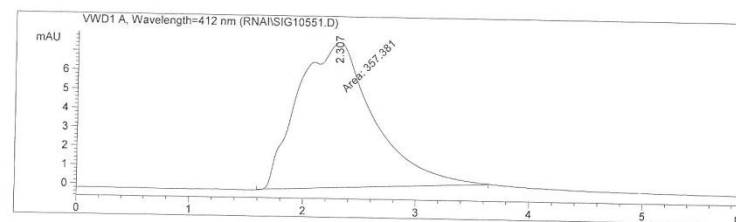
Sample Name: O7P3R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 3:55:30 PM
Sample Name    : O7P3R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.307	MM	0.7812	357.38120	7.62492	100.0000

```
Totals :                357.38120    7.62492
```

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 4:02:47 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10550.D

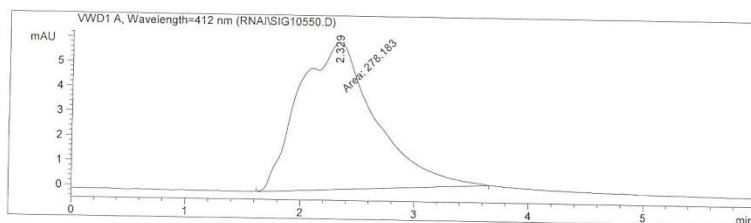
Sample Name: O7P2R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 3:48:09 PM
Sample Name     : O7P2R1-4
Acq. Operator   : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                 (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.319	MM	0.7783	278.18274	5.95679	100.0000

Totals : 278.18274 5.95679

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 3:55:08 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10549.D

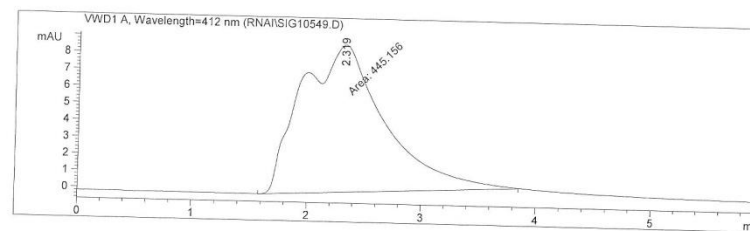
Sample Name: O7P1R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 3:40:25 PM
Sample Name     : O7P1R1-4
Acq. Operator   : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                 (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.319	MM	0.8503	445.15637	8.72597	100.0000

Totals : 445.15637 8.72597

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 3:47:46 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10548.D

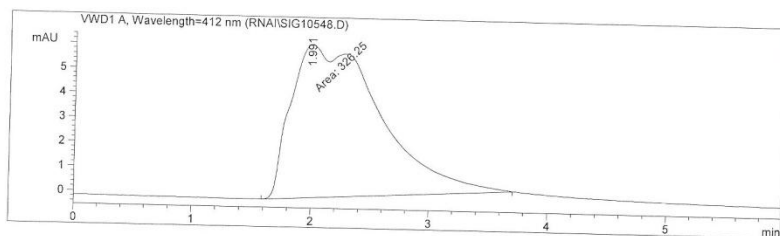
Sample Name: O7C5R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 3:32:05 PM
Sample Name     : O7C5R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.991	MM	0.8755	326.25009	6.21068	100.0000

```
Totals :                326.25009  6.21068
```

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 3:38:39 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10547.D

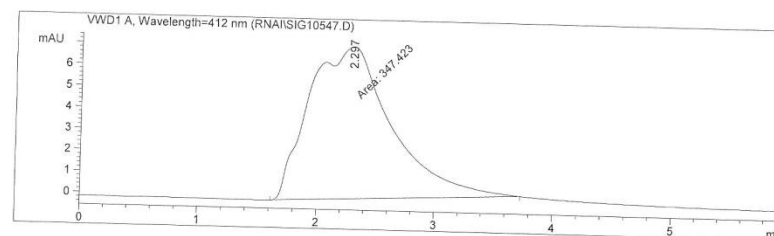
Sample Name: O7C4R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 3:25:18 PM
Sample Name     : O7C4R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.297	MM	0.8162	347.42258	7.09471	100.0000

```
Totals :                347.42258  7.09471
```

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 3:31:45 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10546.D

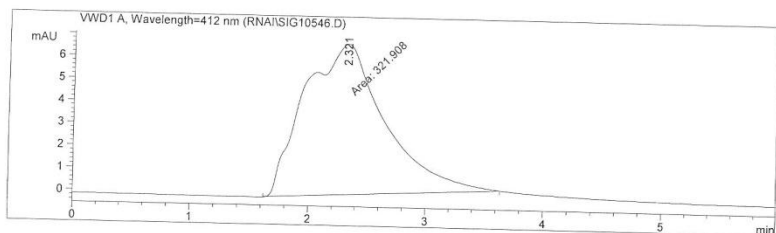
Sample Name: O7C3R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 3:18:29 PM
Sample Name : O7C3R1-4
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```

Location : Vial 1



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.321	MM	0.7975	321.90842	6.72755	100.0000

Totals : 321.90842 6.72755

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10545.D

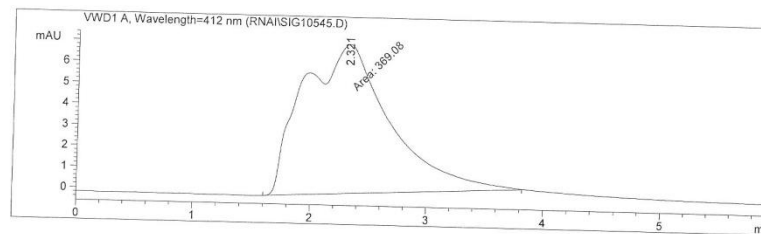
Sample Name: O7C2R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 3:11:03 PM
Sample Name : O7C2R1-4-2
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```

Location : Vial 1



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.321	MM	0.8685	369.08035	7.08259	100.0000

Totals : 369.08035 7.08259

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10544.D

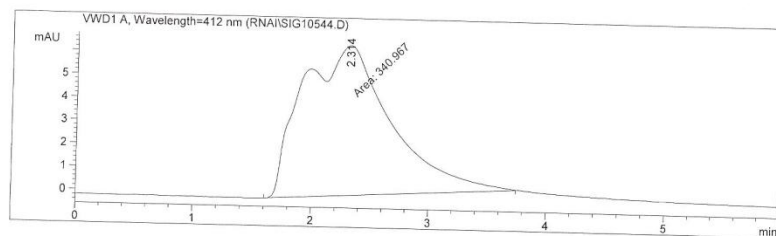
Sample Name: O7C2R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 3:02:42 PM
Sample Name     : O7C2R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.314	MM	0.8780	340.96719	6.47261	100.0000

Totals : 340.96719 6.47261

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 3:10:40 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10543.D

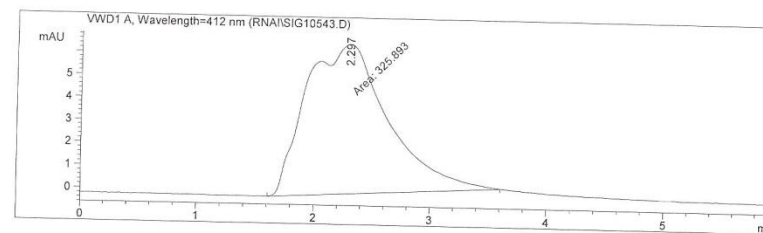
Sample Name: O7C1R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 2:55:54 PM
Sample Name     : O7C1R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.297	MM	0.8238	325.89282	6.59311	100.0000

Totals : 325.89282 6.59311

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 3:02:21 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10542.D

Sample Name: O3R4R2-4

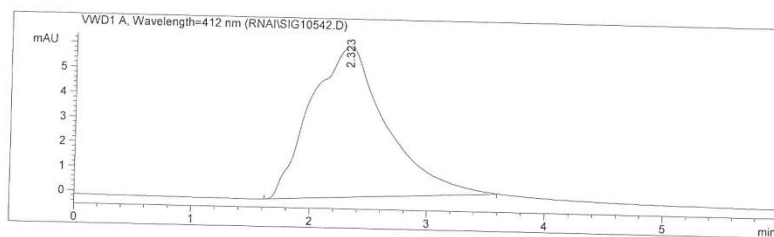
Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 2:48:20 PM
Sample Name     : O3R4R2-4
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
  
```

```

Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
  
```



```

=====
Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.323	BB	0.5958	273.56281	6.10238	100.0000

```
Totals :                273.56281    6.10238
```

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 2:54:26 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10541.D

Sample Name: O3R4R2-4

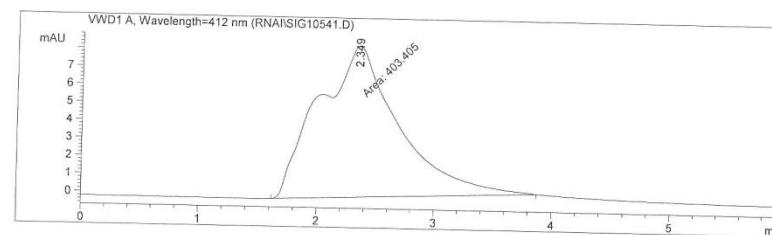
Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 2:41:42 PM
Sample Name     : O3R4R2-4
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
  
```

```

Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
  
```



```

=====
Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.349	MM	0.7952	403.40509	8.45468	100.0000

```
Totals :                403.40509    8.45468
```

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 2:48:04 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10540.D

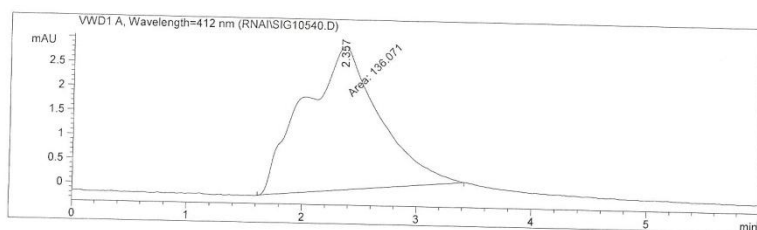
Sample Name: O3R1R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 2:34:46 PM
Sample Name : O3R1R2-4
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
Location : Vial 1
(modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.357	MM	0.7657	136.07137	2.96187	100.0000

Totals : 136.07137 2.96187

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 2:41:07 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10539.D

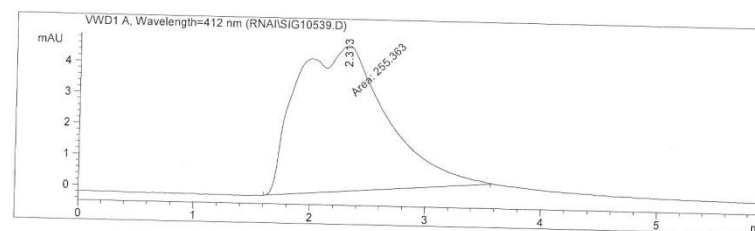
Sample Name: O3P4R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 2:27:51 PM
Sample Name : O3P4R2-4
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
Location : Vial 1
(modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.313	MM	0.9102	255.36258	4.67592	100.0000

Totals : 255.36258 4.67592

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 2:34:23 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10538.D

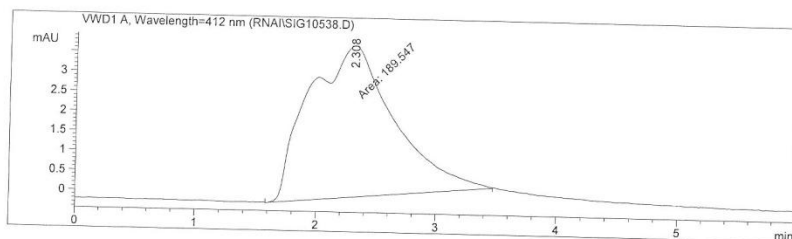
Sample Name: O3P2R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 2:21:07 PM
Sample Name    : O3P2R2-4
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.308	MM	0.8266	189.54742	3.82184	100.0000

```
Totals :                189.54742    3.82184
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 2:27:30 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10537.D

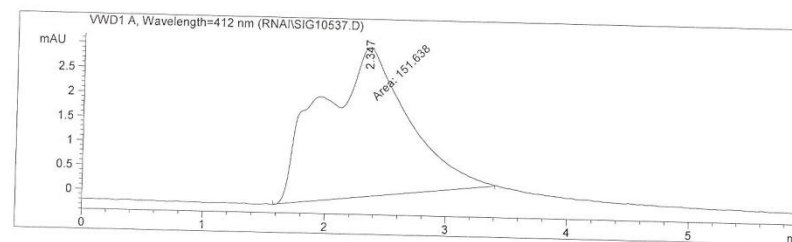
Sample Name: O3P2R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 2:14:22 PM
Sample Name    : O3P2R2-4
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.347	MM	0.8294	151.63765	3.04730	100.0000

```
Totals :                151.63765    3.04730
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 2:20:46 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10536.D

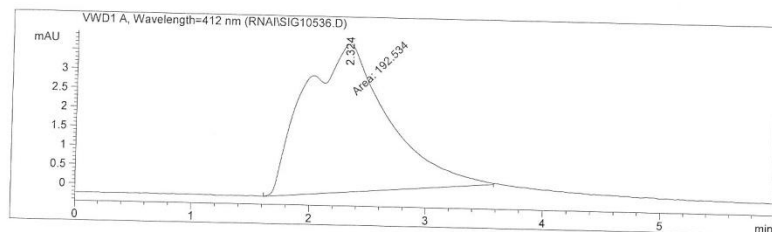
Sample Name: O3P1R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 2:06:44 PM
Sample Name      : O3P1R2-4
Acq. Operator    : AdeM
Acq. Instrument  : Instrument 2
Acq. Method      : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed     : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                  (modified after loading)
Analysis Method  : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed     : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Sample Amount   : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.324	MM	0.8317	192.53362	3.85843	100.0000

Totals : 192.53362 3.85843

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 2:13:06 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10535.D

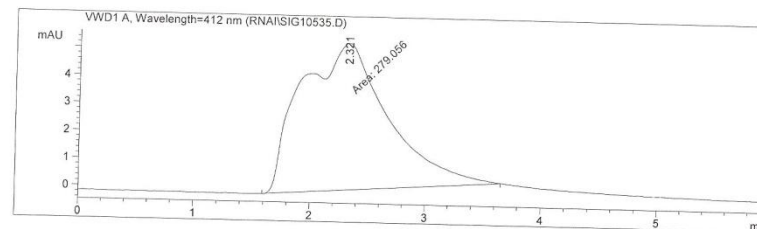
Sample Name: O3C4R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 1:55:55 PM
Sample Name      : O3C4R2-4
Acq. Operator    : AdeM
Acq. Instrument  : Instrument 2
Acq. Method      : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed     : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                  (modified after loading)
Analysis Method  : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed     : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Sample Amount   : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.321	MM	0.8750	279.05551	5.31537	100.0000

Totals : 279.05551 5.31537

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 2:05:57 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10534.D

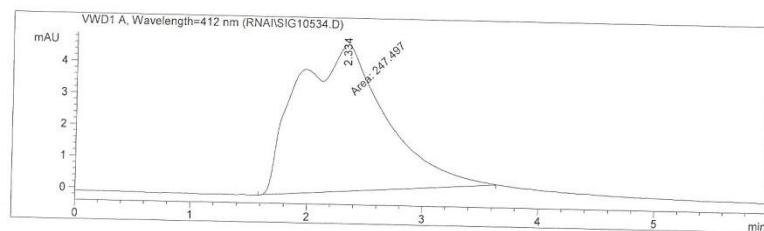
Sample Name: O3C3R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 1:47:47 PM
Sample Name    : O3C3R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.334	MM	0.8914	247.49734	4.62766	100.0000

Totals : 247.49734 4.62766

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 1:55:28 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10533.D

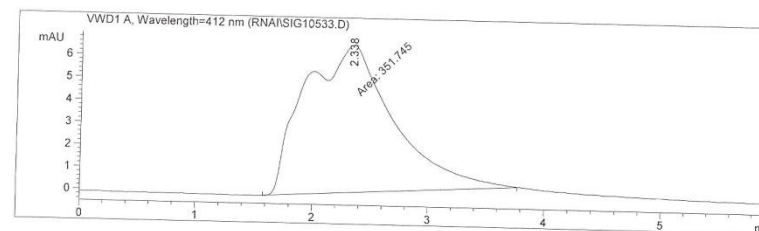
Sample Name: O3C2R2-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 1:40:24 PM
Sample Name    : O3C2R2-4-2            Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 8/29/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.338	MM	0.8926	351.74542	6.56745	100.0000

Totals : 351.74542 6.56745

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 1:46:52 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10532.D

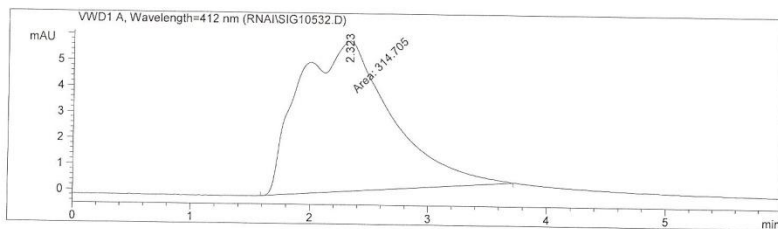
Sample Name: O3C2R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 1:33:36 PM
Sample Name    : O3C2R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.323	MM	0.9058	314.70514	5.79047	100.0000

Totals : 314.70514 5.79047

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 1:40:03 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10531.D

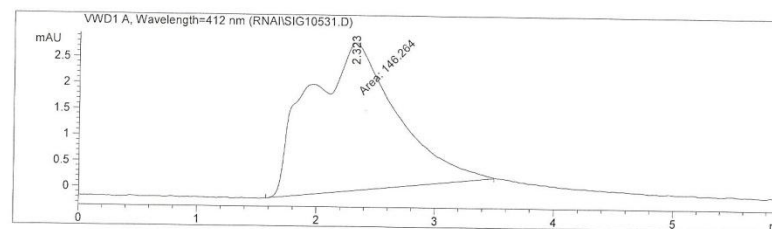
Sample Name: O3C1R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 1:26:21 PM
Sample Name    : O3C1R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.323	MM	0.8556	146.26366	2.84900	100.0000

Totals : 146.26366 2.84900

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 1:32:46 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10530.D

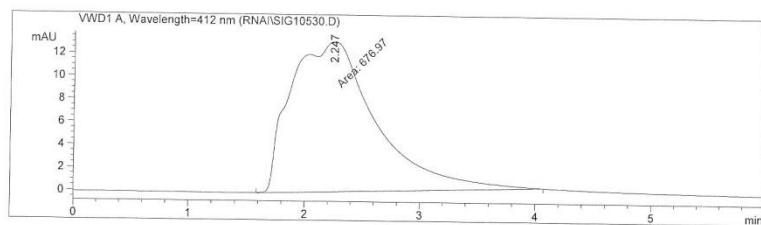
Sample Name: O3R5R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 1:15:19 PM
Sample Name     : O3R5R1-4-2           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GP-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.247	MM	0.8608	676.96979	13.10745	100.0000

Totals : 676.96979 13.10745

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 1:22:49 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10529.D

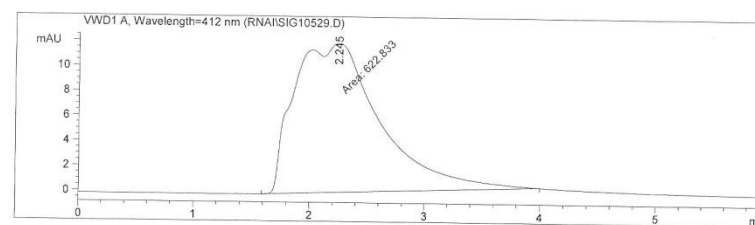
Sample Name: O3R4R1-4-3

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 1:08:05 PM
Sample Name     : O3R4R1-4-3           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GP-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.245	MM	0.8702	622.83344	11.92881	100.0000

Totals : 622.83344 11.92881

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 1:14:55 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10528.D

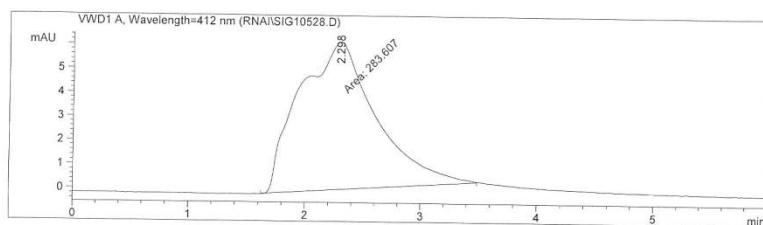
Sample Name: O3R4R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 1:00:17 PM
Sample Name     : O3R4R1-4-2           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.298	MM	0.7716	283.60733	6.12622	100.0000

```
Totals :                283.60733    6.12622
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 1:07:12 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10526.D

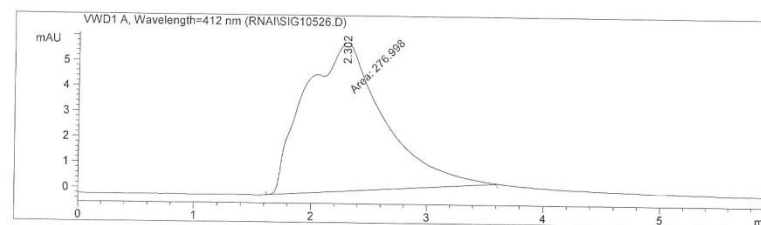
Sample Name: O3R3R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 12:45:02 PM
Sample Name     : O3R3R1-4-2           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.302	MM	0.7880	276.99817	5.85831	100.0000

```
Totals :                276.99817    5.85831
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 12:52:36 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10525.D

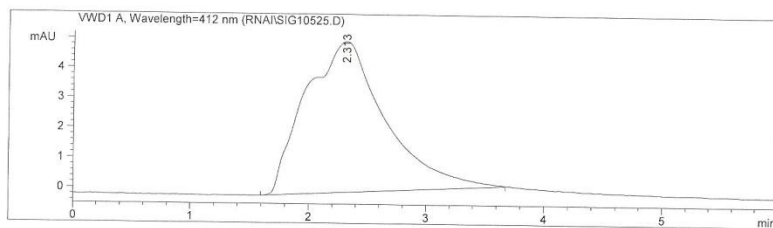
Sample Name: O3R3R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 12:37:17 PM
Sample Name    : O3R3R1-4-2          Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.313	BB	0.6217	238.88586	5.05097	100.0000

```
Totals :                238.88586    5.05097
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 12:43:24 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10524.D

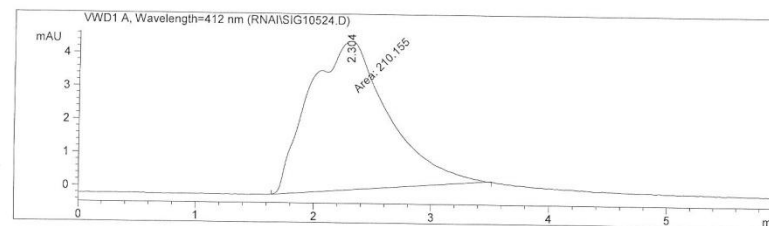
Sample Name: O3R3R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 12:29:57 PM
Sample Name    : O3R3R1-4          Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.304	MM	0.7834	210.15546	4.47123	100.0000

```
Totals :                210.15546    4.47123
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 12:36:53 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10523.D

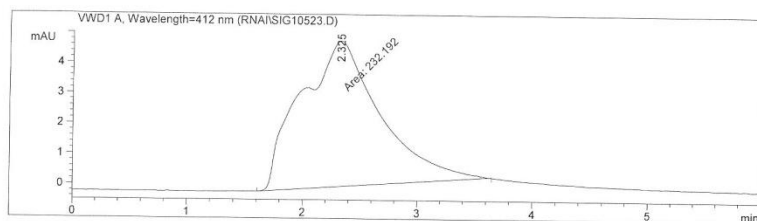
Sample Name: O3R2R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 12:21:30 PM
Sample Name    : O3R2R1-4-2          Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument: Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.325	MM	0.8029	232.19247	4.81992	100.0000

```
Totals :                232.19247    4.81992
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 12:28:08 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10522.D

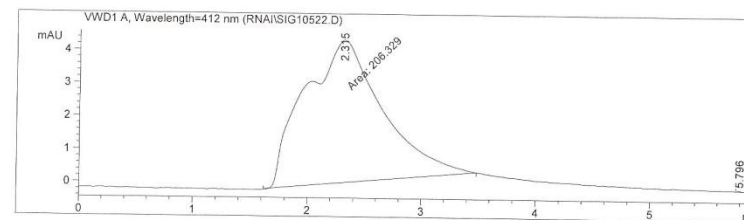
Sample Name: O3R2R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 12:11:19 PM
Sample Name    : O3R2R1-4          Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument: Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.315	MM	0.7933	206.32918	4.33466	99.9763
2	5.796	PB	0.0349	4.88936e-2	2.17606e-2	0.0237

```
Totals :                206.37807    4.35642
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 12:20:23 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10521.D

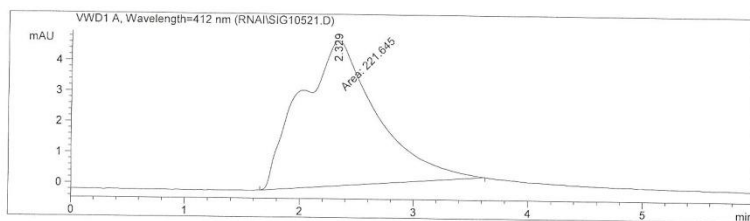
Sample Name: O3R1R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 12:03:39 PM
Sample Name     : O3R1R1-4-2           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.329	MM	0.7763	221.64523	4.75842	100.0000

Totals :				221.64523	4.75842	
----------	--	--	--	-----------	---------	--

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 12:10:05 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10520.D

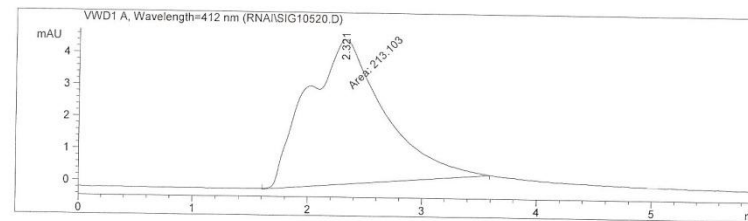
Sample Name: O3R1R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 11:55:49 AM
Sample Name     : O3R1R1-4           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.321	MM	0.7822	213.10298	4.54048	100.0000

Totals :				213.10298	4.54048	
----------	--	--	--	-----------	---------	--

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 12:02:13 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10519.D

Sample Name: O3P5R1-4-2

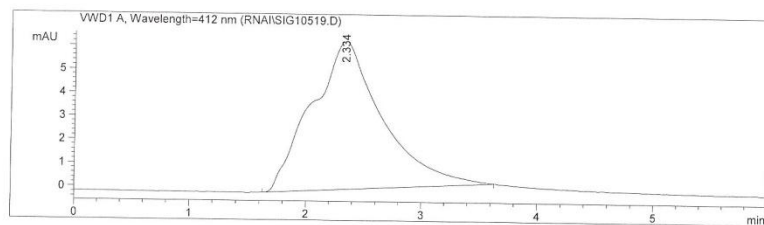
Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 11:48:21 AM
Sample Name    : O3P5R1-4-2                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
  
```

```

Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
  
```



```

=====
Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.334	PB	0.5660	268.25180	6.29009	100.0000

```
Totals :                268.25180    6.29009
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***
  
```

Instrument 2 9/29/2009 11:54:28 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10518.D

Sample Name: O3P5R1-4

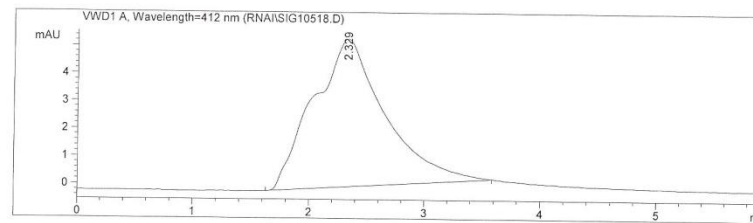
Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 11:41:54 AM
Sample Name    : O3P5R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
  
```

```

Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
  
```



```

=====
Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.329	PB	0.5680	231.58980	5.36191	100.0000

```
Totals :                231.58980    5.36191
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***
  
```

Instrument 2 9/29/2009 11:48:01 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10517.D

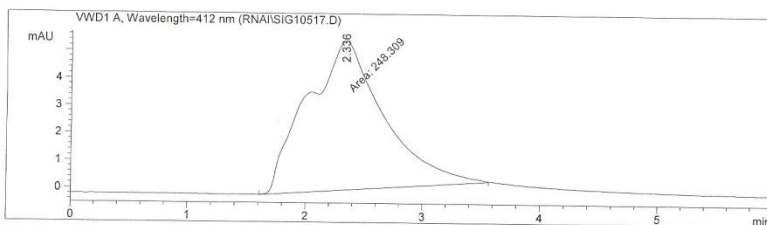
Sample Name: O3P4R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 11:32:51 AM
Sample Name     : O3P4R1-4-2           Location : Vial 1
Acq. Operator   : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.336	MM	0.7616	248.30945	5.43424	100.0000

```
Totals :                248.30945    5.43424
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***
=====

```

Instrument 2 9/29/2009 11:40:13 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10516.D

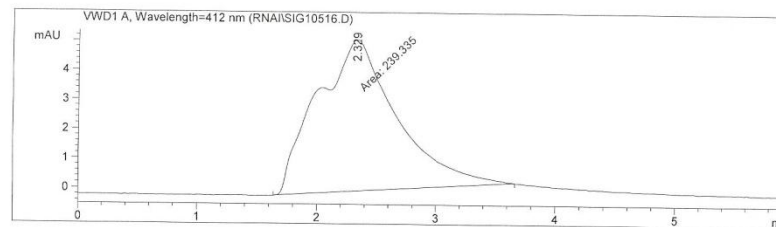
Sample Name: O3P4R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 11:24:33 AM
Sample Name     : O3P4R1-4           Location : Vial 1
Acq. Operator   : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.329	MM	0.7749	239.33470	5.14758	100.0000

```
Totals :                239.33470    5.14758
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***
=====

```

Instrument 2 9/29/2009 11:31:50 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10515.D

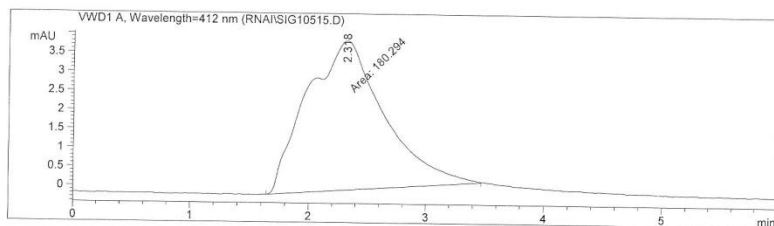
Sample Name: O3P3R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 11:16:45 AM
Sample Name : O3P3R1-4-2 Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
              (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.318	MM	0.7656	180.29419	3.92488	100.0000

Totals : 180.29419 3.92488

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 11:23:12 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10514.D

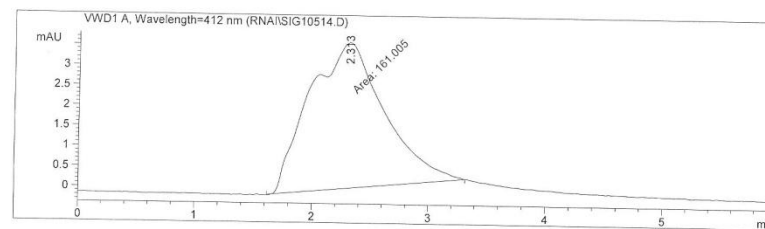
Sample Name: O3P3R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 11:09:55 AM
Sample Name : O3P3R1-4 Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
              (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.313	MM	0.7475	161.00471	3.58997	100.0000

Totals : 161.00471 3.58997

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 11:16:30 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10513.D

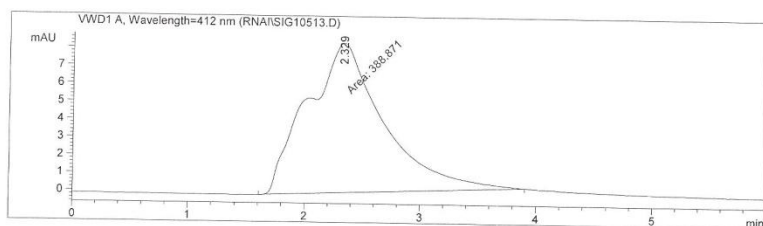
Sample Name: O3P2R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 11:02:17 AM
Sample Name    : O3P2R1-4-2                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.329	MM	0.7725	388.87079	8.38981	100.0000

```
Totals :                388.87079    8.38981
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 11:09:33 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10512.D

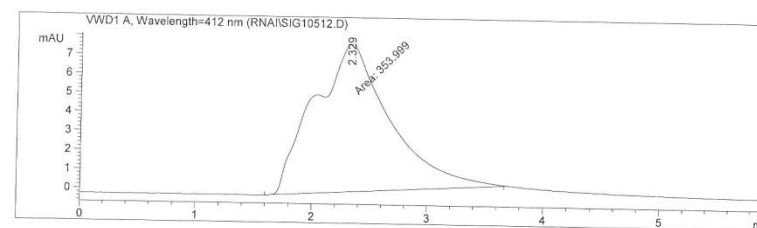
Sample Name: O3P2R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 10:55:14 AM
Sample Name    : O3P2R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.329	MM	0.7636	353.99933	7.72698	100.0000

```
Totals :                353.99933    7.72698
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 11:01:56 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10511.D

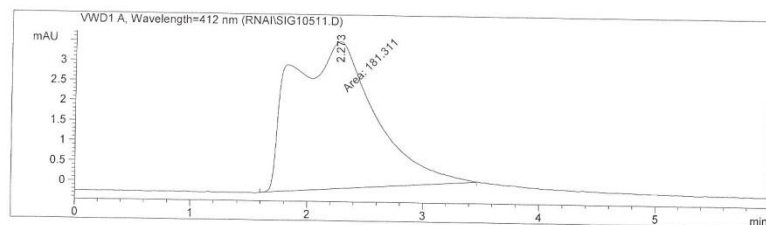
Sample Name: O3P1R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 10:46:12 AM
Sample Name     : O3P1R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator   : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height *s	Area %
1	2.273	MM	0.8230	181.31133	3.67192	100.0000

```
Totals :                181.31133    3.67192
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 10:53:13 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10510.D

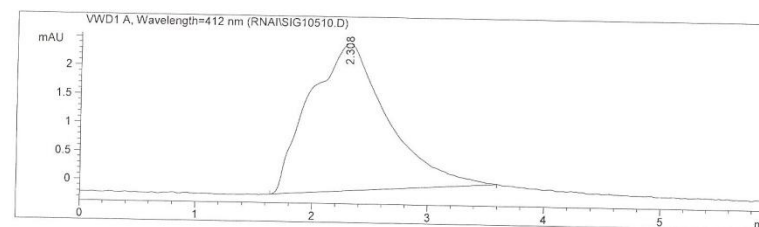
Sample Name: O3C5R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date   : 9/29/2009 10:37:09 AM
Sample Name     : O3C5R1-4-2            Location : Vial 1
Acq. Operator   : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method     : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height *s	Area %
1	2.308	BB	0.6138	121.17358	2.58533	100.0000

```
Totals :                121.17358    2.58533
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 10:43:16 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10509.D

Sample Name: O3C5R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

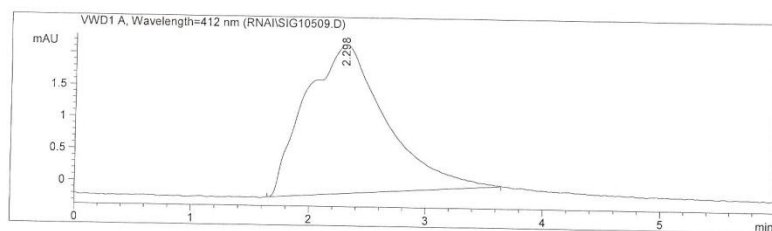
=====
Injection Date : 9/29/2009 10:30:08 AM
Sample Name    : O3C5R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)

```

```

Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	*s	Height [mAU]	Area %
1	2.298	BB	0.6276	111.55715		2.33344	100.0000

```
Totals :                111.55715    2.33344
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 10:36:15 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10508.D

Sample Name: O3C4R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

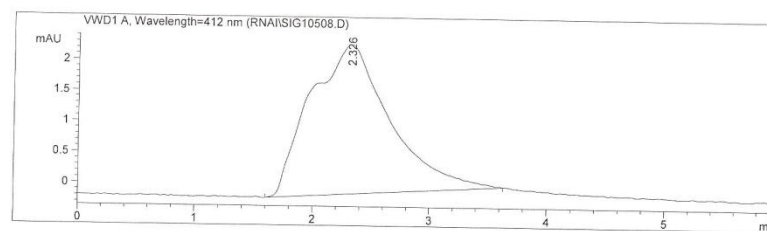
=====
Injection Date : 9/29/2009 10:23:13 AM
Sample Name    : O3C4R1-4-2            Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)

```

```

Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	*s	Height [mAU]	Area %
1	2.326	BB	0.5982	115.46160		2.43543	100.0000

```
Totals :                115.46160    2.43543
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 10:29:19 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10507.D

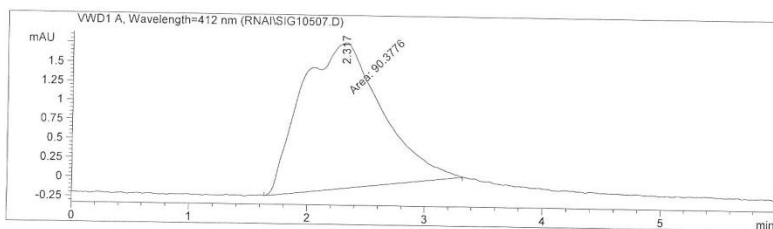
Sample Name: O3C4R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 10:16:46 AM
Sample Name    : O3C4R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	*s	Height [mAU]	Area %
1	2.317	MM	0.7933	90.37759		1.89887	100.0000

```
Totals :                90.37759  1.89887
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 10:23:41 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10506.D

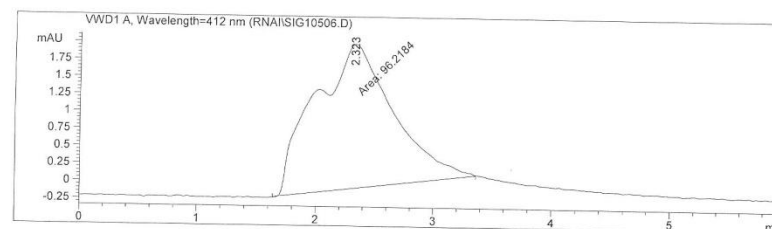
Sample Name: O3C3R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 10:09:16 AM
Sample Name    : O3C3R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	*s	Height [mAU]	Area %
1	2.323	MM	0.7723	96.21840		2.07634	100.0000

```
Totals :                96.21840  2.07634
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 10:15:54 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10505.D

Sample Name: O3C2R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

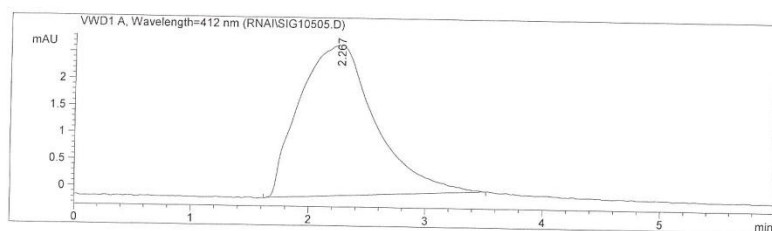
=====
Injection Date : 9/29/2009 10:01:00 AM
Sample Name    : O3C2R1-4-2          Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method        : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)

```

```

Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.267	BP	0.5719	127.25233	2.81058	100.0000

```
Totals :                127.25233    2.81058
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 10:07:06 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10504.D

Sample Name: O3C2R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

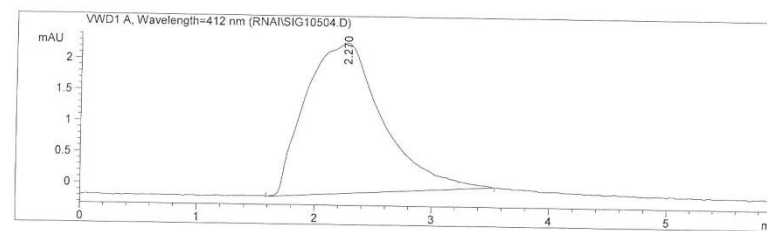
=====
Injection Date : 9/29/2009 9:54:24 AM
Sample Name    : O3C2R1-4          Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method        : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)

```

```

Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.270	BB	0.5839	111.40159	2.41891	100.0000

```
Totals :                111.40159    2.41891
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 9/29/2009 10:00:30 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10578.D

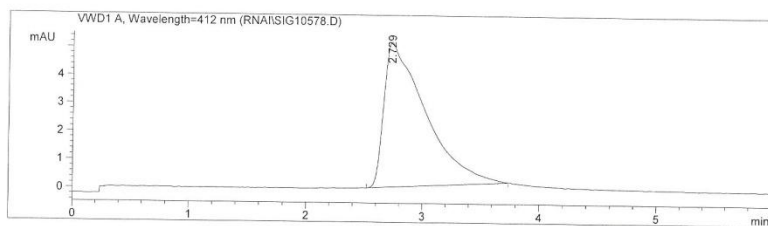
Sample Name: RHPB 3ug/ul

Proteina liofilizada resuspendida en H2O DEPC

```

=====
Injection Date : 10/8/2009 10:22:59 AM
Sample Name    : RHPB 3ug/ul           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method        : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/8/2009 9:22:03 AM by GC2
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	2.729	PB	0.3218	127.79634	5.14559	5.14559	100.0000

```
Totals :                127.79634    5.14559
```

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 10/8/2009 10:29:05 AM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10569.D

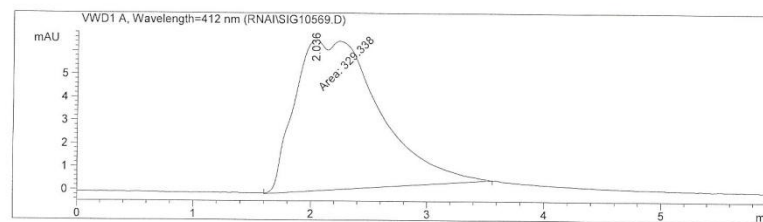
Sample Name: O7R5R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20).

```

=====
Injection Date : 9/29/2009 6:00:43 PM
Sample Name    : O7R5R2-4           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 9/29/2009 9:03:01 AM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	2.036	MM	0.8395	329.33826	6.53826	6.53826	100.0000

```
Totals :                329.33826    6.53826
```

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 9/29/2009 6:07:05 PM AdeM

Page 1 of 1

B. Cromatogramas de las muestras del ensayo de inyección

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10585.D

Sample Name: RHPBcontrol

Proteina liofilizada

```

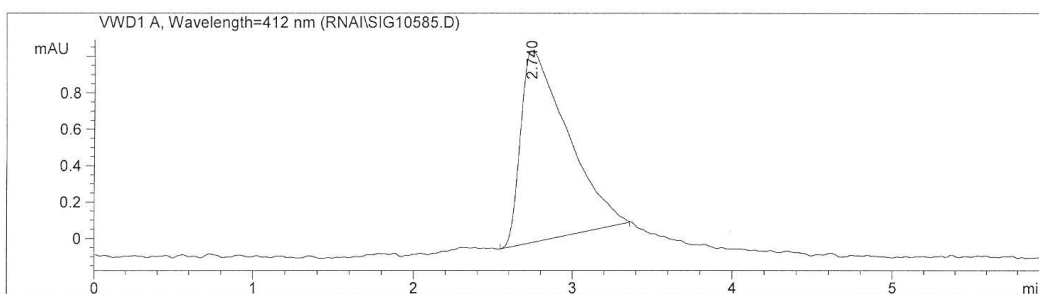
=====
Injection Date   : 10/13/2009 9:58:07 AM
Sample Name      : RHPBcontrol                Location : Vial 1
Acq. Operator   : AdeM
Acq. Instrument  : Instrument 2
Method          : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed    : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                  (modified after loading)

```

```

Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.740	BB	0.2761	21.56820	1.05613	100.0000

Totals : 21.56820 1.05613

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

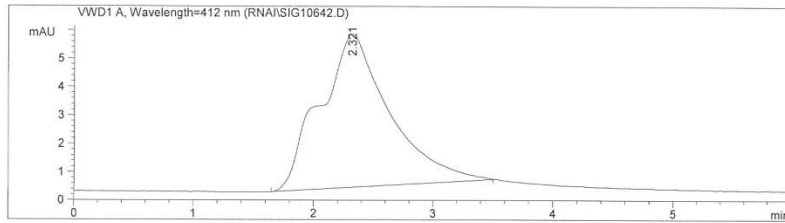
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10642.D

Sample Name: P7P1R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 5:04:20 PM
Sample Name : P7P1R2-4 Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.321	BB	0.5390	218.48845	5.41721	100.0000

Totals : 218.48845 5.41721

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

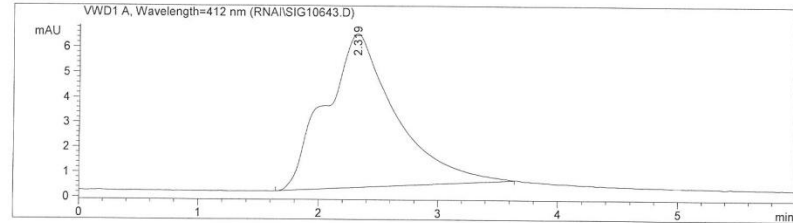
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10643.D

Sample Name: P7P2R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 5:11:59 PM
Sample Name : P7P2R2-4 Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.319	BB	0.5531	251.58841	6.14854	100.0000

Totals : 251.58841 6.14854

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10644.D

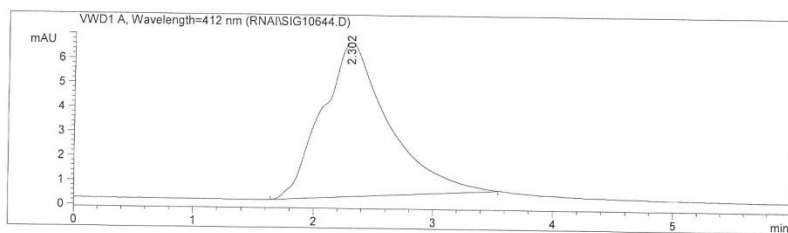
Sample Name: P7P4R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date   : 10/13/2009 5:19:51 PM
Sample Name     : P7P4R2-4           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.302	BB	0.5202	244.64537	6.29797	100.0000

Totals : 244.64537 6.29797

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 5:25:53 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10646.D

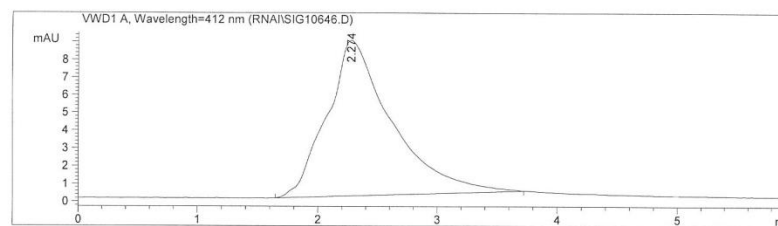
Sample Name: P7R3R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date   : 10/13/2009 5:31:16 PM
Sample Name     : P7R3R2-4           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.274	BB	0.5104	331.40787	8.77700	100.0000

Totals : 331.40787 8.77700

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 5:37:18 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10647.D

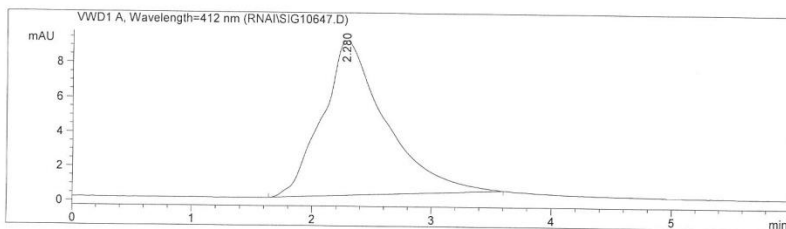
Sample Name: P7R3R2-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date   : 10/13/2009 5:38:50 PM
Sample Name     : P7R3R2-4-2           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.280	BB	0.5022	331.66797	8.98123	100.0000

```
Totals :                331.66797    8.98123
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 5:44:52 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10648.D

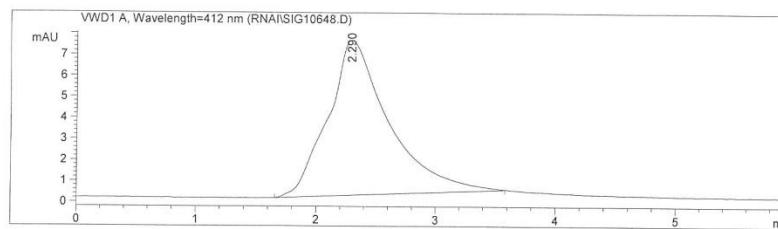
Sample Name: P7R4R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date   : 10/13/2009 5:46:47 PM
Sample Name     : P7R4R2-4           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.290	PB	0.4859	261.11652	7.34898	100.0000

```
Totals :                261.11652    7.34898
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 5:52:49 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10649.D

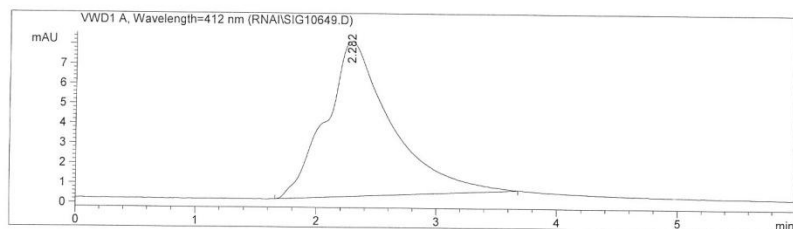
Sample Name: P7R5R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 5:53:18 PM
Sample Name    : P7R5R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdEM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method        : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdEM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	2.282	PB	0.5074	296.59464	7.80564	7.80564	100.0000

```
Totals :                296.59464    7.80564
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 5:59:21 PM AdEM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10586.D

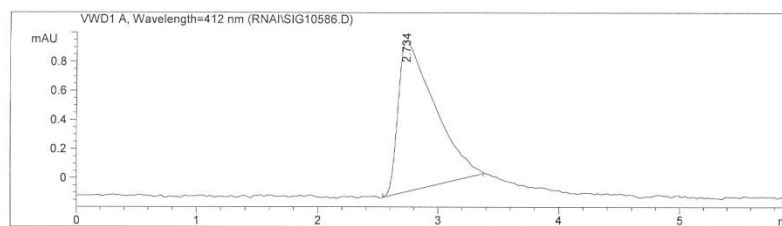
Sample Name: RHPBcontrol-2

Proteina liofilizada

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 10:04:51 AM
Sample Name    : RHPBcontrol-2          Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdEM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method        : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdEM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	2.734	BB	0.2824	21.84944	1.04226	1.04226	100.0000

```
Totals :                21.84944    1.04226
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 10:10:54 AM AdEM

Page 1 of 1

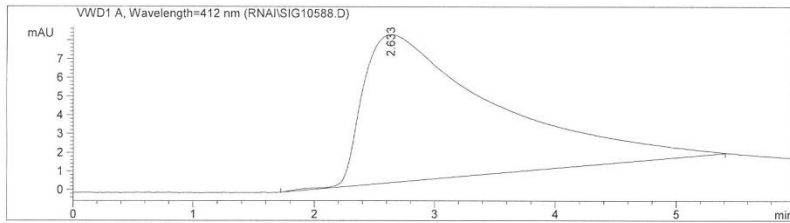
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10588.D

Sample Name: Hemina 1mM

Hemina 1mM

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 10:18:28 AM
Sample Name    : Hemina 1mM                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument: Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.633	PB	1.0176	601.45624	7.94069	100.0000

Totals : 601.45624 7.94069

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

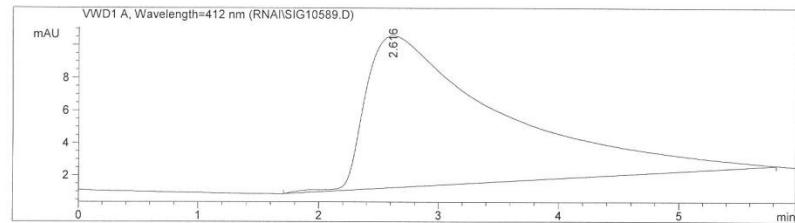
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10589.D

Sample Name: Hemina 1mM-2

Hemina 1mM

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 10:26:30 AM
Sample Name    : Hemina 1mM-2            Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument: Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.616	PB	1.0496	736.04852	9.33392	100.0000

Totals : 736.04852 9.33392

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10591.D

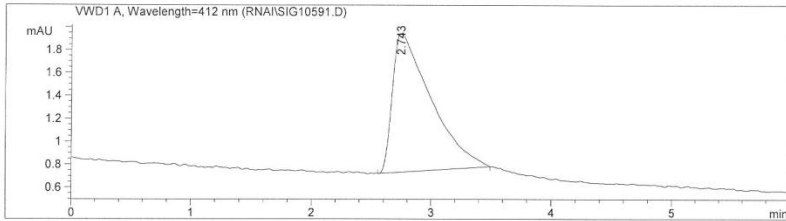
Sample Name: RHBP lug/ul

RHBP liofilizado lug/ul sin hemina

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 10:41:36 AM
Sample Name : RHBP lug/ul Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
              (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.743	BB	0.3001	27.15289	1.21494	100.0000

Totals : 27.15289 1.21494

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10592.D

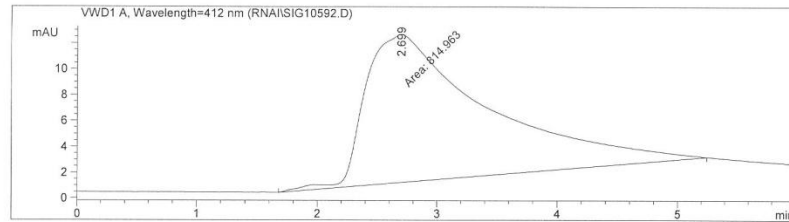
Sample Name: RHBP lug/ul hem

RHBP liofilizado lug/ul hemina

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 10:50:02 AM
Sample Name : RHBP lug/ul hem Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Acq. Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
              (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 8/28/2009 8:27:53 AM by AdeM
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.699	MM	1.1867	814.96277	11.44534	100.0000

Totals : 814.96277 11.44534

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

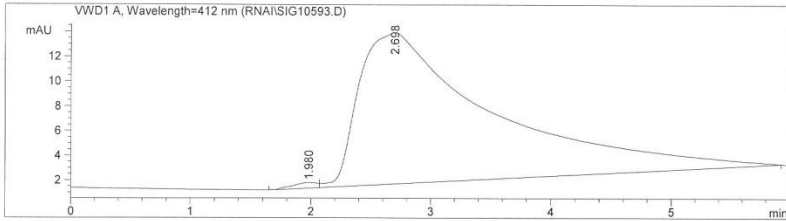
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10593.D

Sample Name: RHBP lug/ulhem-2

RHBP liofilizado lug/ul hemina

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 11:00:51 AM
Sample Name   : RHBP lug/ulhem-2           Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method        : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed  : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: WWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	1.980	BV	0.2059	6.42302	4.42001e-1	0.6664
2	2.698	VB	0.9480	957.46906	12.25317	99.3336

Totals : 963.89208 12.69517

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

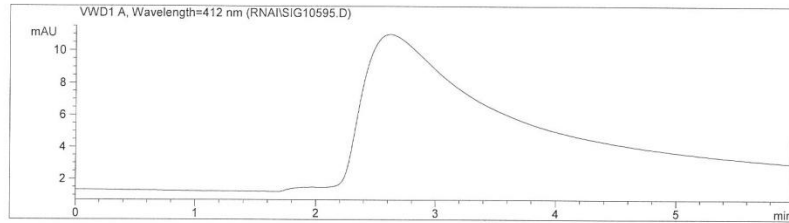
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10595.D

Sample Name: Hemina 1mM

Hemina 1mM

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 11:15:37 AM
Sample Name   : Hemina 1mM               Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method        : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed  : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

No peaks found

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10597.D

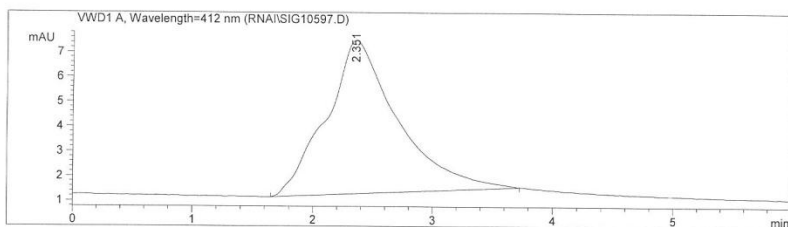
Sample Name: P3C2R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date   : 10/13/2009 11:31:29 AM
Sample Name     : P3C2R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdEM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdEM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height *s	Area %
1	2.351	BB	0.5689	257.33633	6.19727	100.0000

```
Totals :                257.33633    6.19727
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 11:37:32 AM AdEM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10598.D

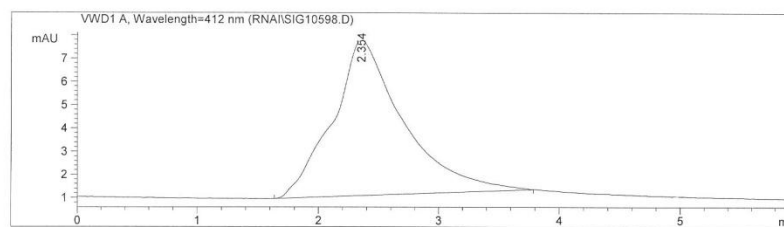
Sample Name: P3C2R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date   : 10/13/2009 11:38:29 AM
Sample Name     : P3C2R1-4-2            Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdEM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdEM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height *s	Area %
1	2.354	BB	0.5516	274.62723	6.69180	100.0000

```
Totals :                274.62723    6.69180
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 11:44:32 AM AdEM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10599.D

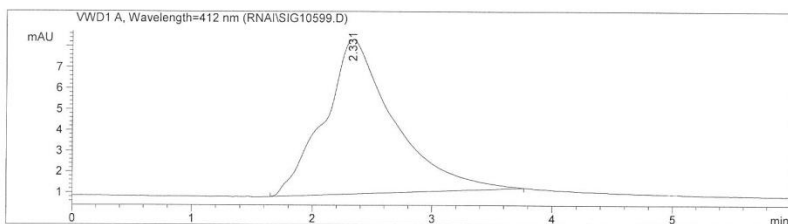
Sample Name: P3C3R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 11:45:52 AM
Sample Name    : P3C3R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument: Instrument 2
Method        : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.331	BB	0.5477	300.30746	7.40026	100.0000

```
Totals :                300.30746    7.40026
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10600.D

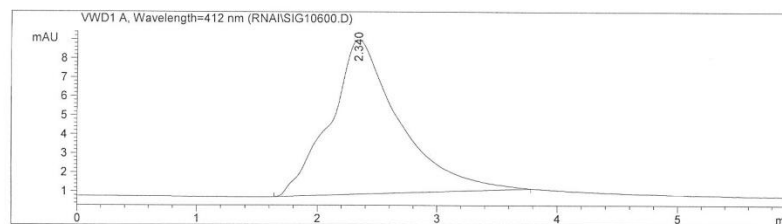
Sample Name: P3C3R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 11:52:38 AM
Sample Name    : P3C3R1-4-2            Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument: Instrument 2
Method        : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.340	BB	0.5423	326.95221	8.14938	100.0000

```
Totals :                326.95221    8.14938
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

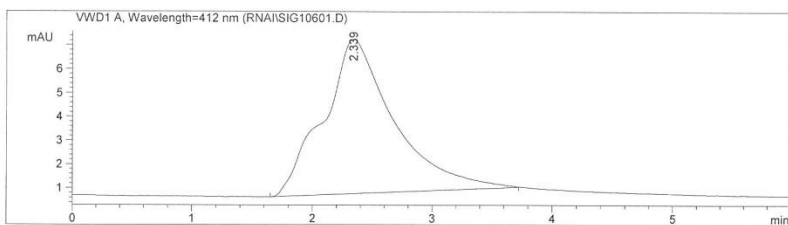
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10601.D

Sample Name: P3C4R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 11:59:29 AM
Sample Name : P3C4R1-4 Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
              (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.339	PB	0.5481	264.86148	6.48175	100.0000

Totals : 264.86148 6.48175

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

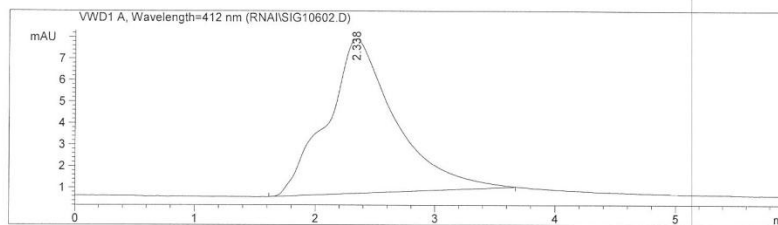
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10602.D

Sample Name: P3C4R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 12:06:24 PM
Sample Name : P3C4R1-4-2 Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
              (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.338	BB	0.5419	285.20386	7.20569	100.0000

Totals : 285.20386 7.20569

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

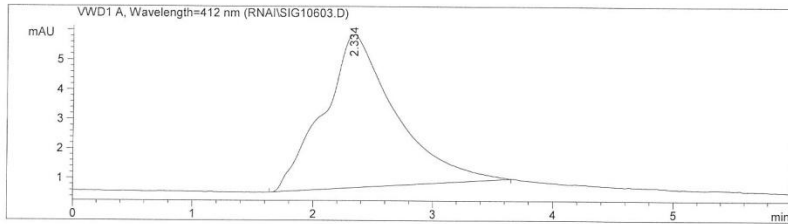
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10603.D

Sample Name: P3C5R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 12:12:57 PM
Sample Name    : P3C5R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.334	PB	0.5605	217.32263	5.18275	100.0000

Totals : 217.32263 5.18275

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

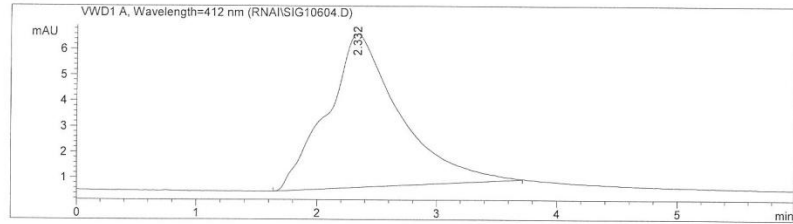
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10604.D

Sample Name: P3C5R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 12:19:44 PM
Sample Name    : P3C5R1-4-2            Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.332	BB	0.5631	252.79955	5.99733	100.0000

Totals : 252.79955 5.99733

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10605.D

Sample Name: P3P1R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

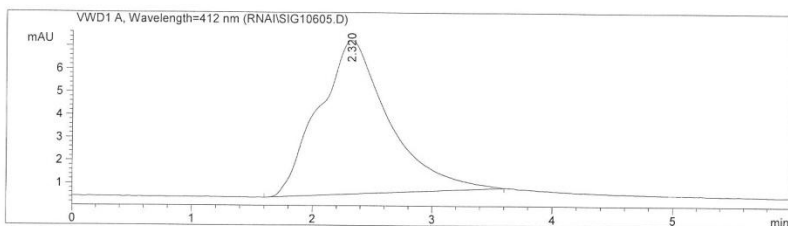
=====
Injection Date : 10/13/2009 12:28:32 PM
Sample Name   : P3P1R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method       : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed  : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)

```

```

Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.320	BB	0.5506	273.52222	6.71924	100.0000

```
Totals :                273.52222    6.71924
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 12:34:35 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10606.D

Sample Name: P3P2R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

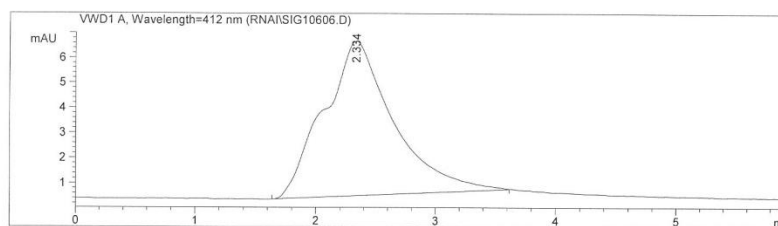
=====
Injection Date : 10/13/2009 12:36:01 PM
Sample Name   : P3P2R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method       : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed  : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)

```

```

Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.334	PB	0.5322	250.81192	6.19329	100.0000

```
Totals :                250.81192    6.19329
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 12:42:04 PM AdeM

Page 1 of 1

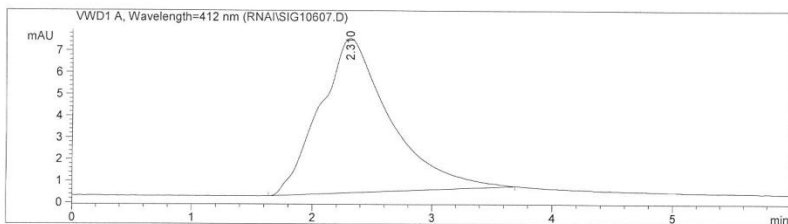
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10607.D

Sample Name: P3P3R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 12:44:16 PM
Sample Name    : P3P3R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : Adem
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by Adem
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.310	PB	0.5424	290.91840	7.11655	100.0000

Totals : 290.91840 7.11655

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

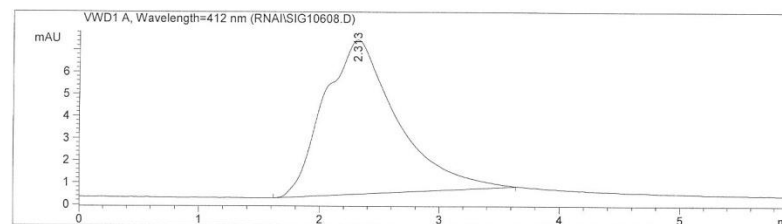
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10608.D

Sample Name: P3P4R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 12:52:08 PM
Sample Name    : P3P4R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : Adem
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by Adem
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.313	PB	0.5606	295.32007	6.97972	100.0000

Totals : 295.32007 6.97972

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

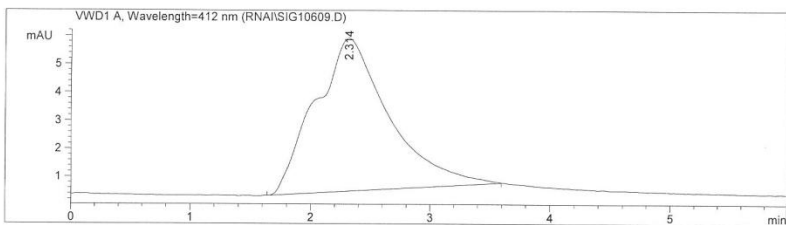
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10609.D

Sample Name: P3R1R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 12:58:45 PM
Sample Name    : P3R1R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument: Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.314	PB	0.5772	234.51450	5.43999	100.0000

Totals : 234.51450 5.43999

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

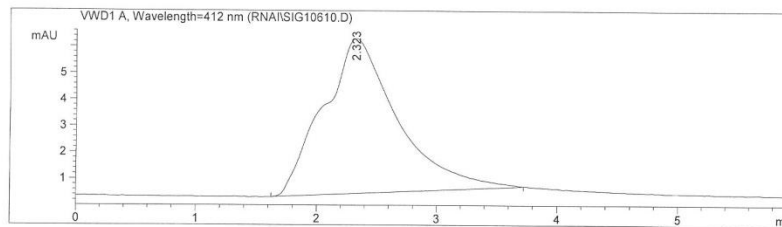
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10610.D

Sample Name: P3R1R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 1:05:35 PM
Sample Name    : P3R1R1-4-2            Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument: Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	2.323	PB	0.5753	252.36118	5.85970	100.0000

Totals : 252.36118 5.85970

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10611.D

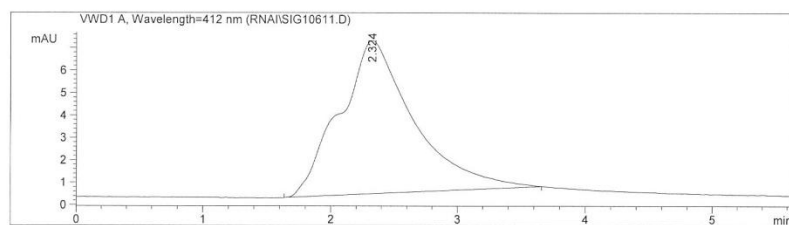
Sample Name: P3R3R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 1:11:57 PM
Sample Name    : P3R3R1-4-2           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	2.324	PB	0.5423	277.73694	6.83767	6.83767	100.0000

```
Totals :                277.73694    6.83767
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 1:17:39 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10612.D

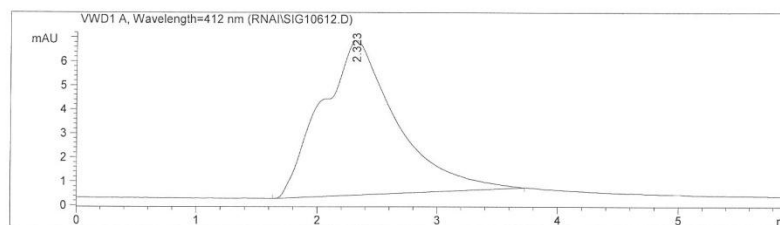
Sample Name: P3R5R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 1:19:26 PM
Sample Name    : P3R5R1-4-2           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	2.323	PB	0.5700	280.41238	6.44709	6.44709	100.0000

```
Totals :                280.41238    6.44709
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 1:25:30 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10613.D

Sample Name: P3R5R1-4

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10614.D

Sample Name: P3R5R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

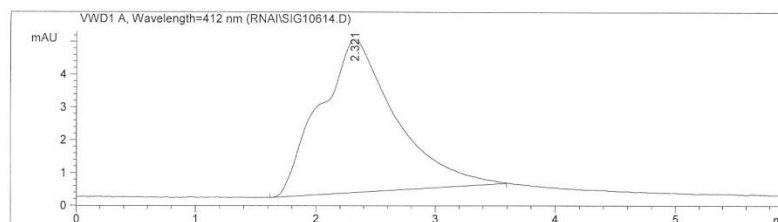
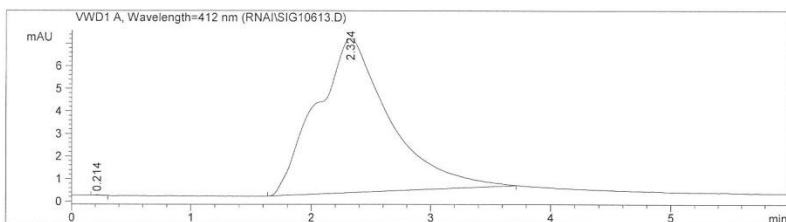
```

=====
Injection Date : 10/13/2009 1:28:48 PM
Sample Name    : P3R5R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 1:36:26 PM
Sample Name    : P3R5R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %	Height [mAU]
1	0.214	BB	0.0587	9.76250e-2	0.0334	2.49822e-2
2	2.324	FB	0.5740	292.07169	99.9666	6.83847

Totals : 292.16931 6.86345

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %	Height [mAU]
1	2.321	BB	0.5879	205.46516	100.0000	4.68051

Totals : 205.46516 4.68051

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10615.D

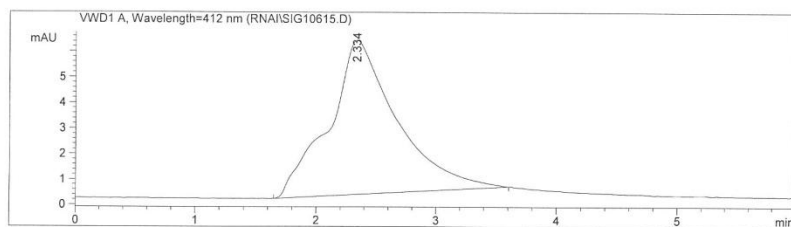
Sample Name: P3C2R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 1:43:30 PM
Sample Name    : P3C2R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument: Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.334	BB	0.5234	238.07208	6.04670	100.0000

Totals : 238.07208 6.04670

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 10/13/2009 1:49:32 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10616.D

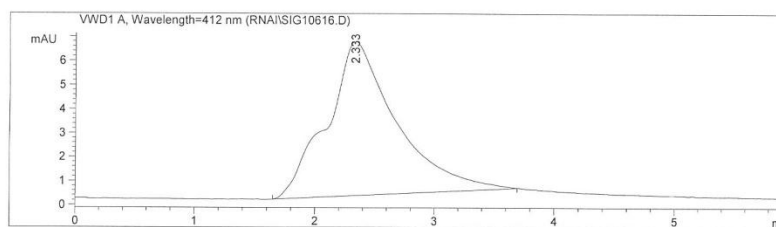
Sample Name: P3C3R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 1:50:22 PM
Sample Name    : P3C3R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument: Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.333	BB	0.5375	258.58121	6.41095	100.0000

Totals : 258.58121 6.41095

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 10/13/2009 1:56:24 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10617.D

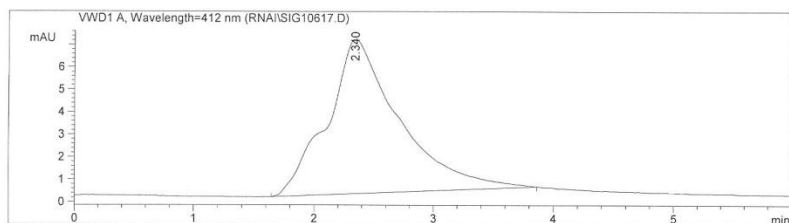
Sample Name: P3C5R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 1:57:09 PM
Sample Name    : P3C5R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount   :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %	Height [mAU]	Area %
1	2.340	BB	0.5532	288.29431	100.0000	6.87579	100.0000

```
Totals :                288.29431    6.87579
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 2:03:11 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10618.D

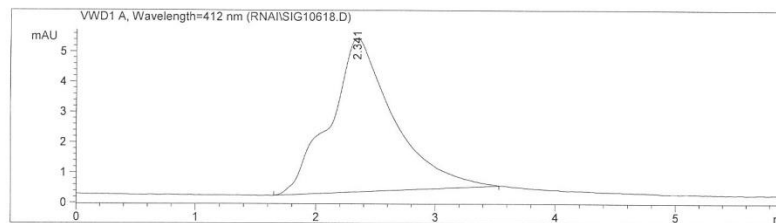
Sample Name: P3P2R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 2:04:04 PM
Sample Name    : P3P2R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount   :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %	Height [mAU]	Area %
1	2.341	BB	0.4931	188.23227	100.0000	5.10158	100.0000

```
Totals :                188.23227    5.10158
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 2:10:07 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10619.D

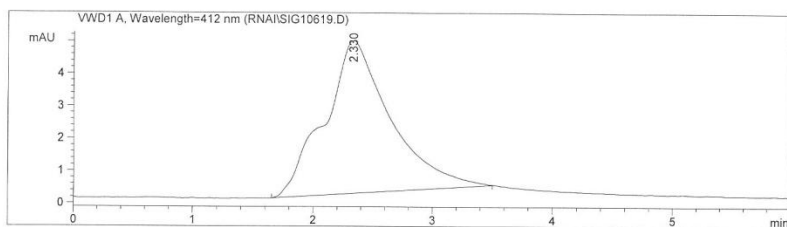
Sample Name: P3P3R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 2:15:15 PM
Sample Name    : P3P3R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.330	BB	0.5168	181.20238	4.73013	100.0000

Totals : 181.20238 4.73013

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 10/13/2009 2:21:17 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10620.D

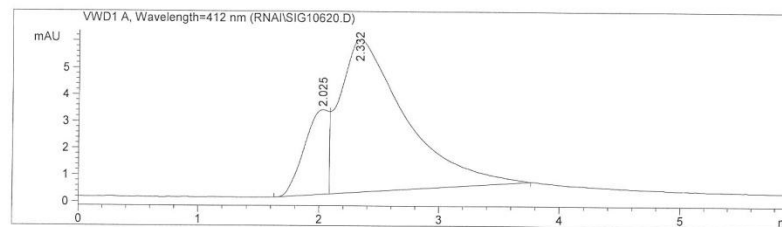
Sample Name: P3P4R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 2:22:15 PM
Sample Name    : P3P4R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.025	BV	0.2144	43.41356	3.15574	16.6620
2	2.332	VB	0.5052	217.14035	5.70534	83.3380

Totals : 260.55391 8.86108

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 10/13/2009 2:28:17 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10621.D

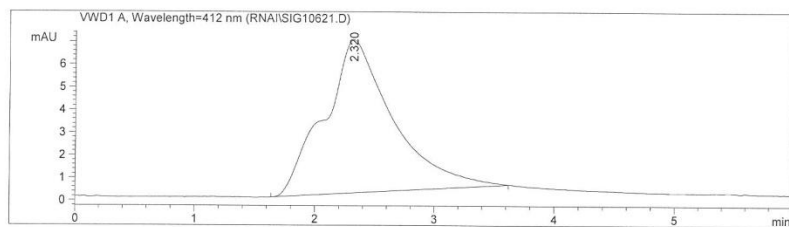
Sample Name: P3P5R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 2:33:40 PM
Sample Name    : P3P5R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument: Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	2.320	PB	0.5341	270.29672	6.75128	100.0000	

Totals : 270.29672 6.75128

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 2:39:42 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10622.D

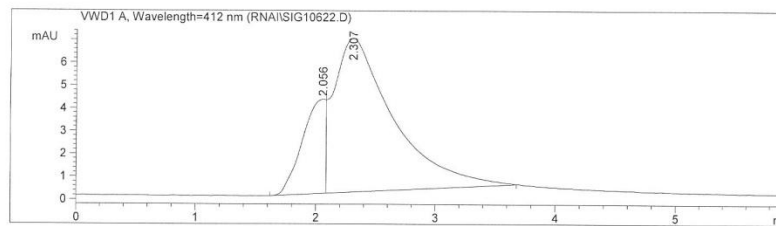
Sample Name: P3R1R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 2:42:40 PM
Sample Name    : P3R1R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument: Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	2.056	BV	0.2143	54.60752	4.12059	19.0240	
2	2.307	VB	0.4718	232.43846	6.72223	80.9760	

Totals : 287.04598 10.84282

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 2:48:42 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10623.D

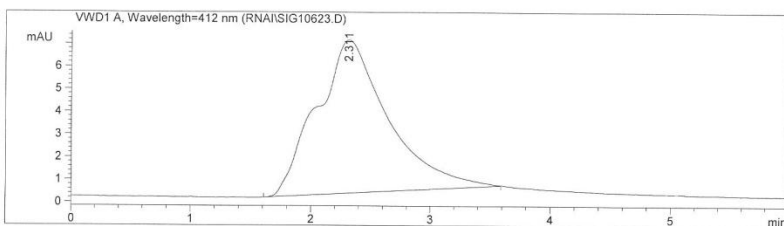
Sample Name: P3R1R2-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 2:49:36 PM
Sample Name    : P3R1R2-4-2           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument: Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %	Height [mAU]
1	2.311	BB	0.5589	283.03903	100.0000	6.79276

Totals : 283.03903 6.79276

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 2:55:38 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10624.D

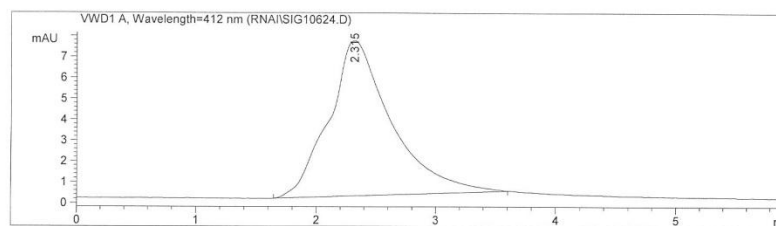
Sample Name: P3R3R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 2:56:43 PM
Sample Name    : P3R3R2-4           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument: Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %	Height [mAU]
1	2.315	BB	0.4979	271.07050	100.0000	7.43951

Totals : 271.07050 7.43951

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 3:02:45 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10625.D

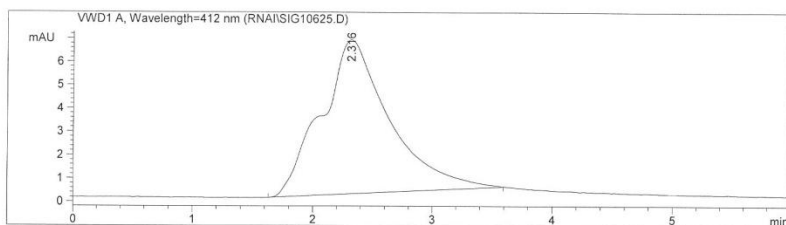
Sample Name: P3R5R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 3:04:31 PM
Sample Name    : P3R5R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method        : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed  : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	*s	Height [mAU]	Area %
1	2.316	BB	0.5331	262.69586		6.61611	100.0000

Totals : 262.69586 6.61611

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 10/13/2009 3:10:34 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10626.D

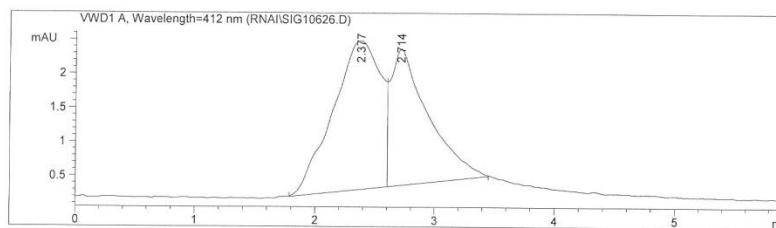
Sample Name: P7C5R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 3:12:28 PM
Sample Name    : P7C5R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method        : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed  : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	*s	Height [mAU]	Area %
1	2.377	BV	0.3960	60.60781		2.18759	57.8707
2	2.714	VB	0.2928	44.12184		2.00735	42.1293

Totals : 104.72965 4.19495

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 10/13/2009 3:18:30 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10627.D

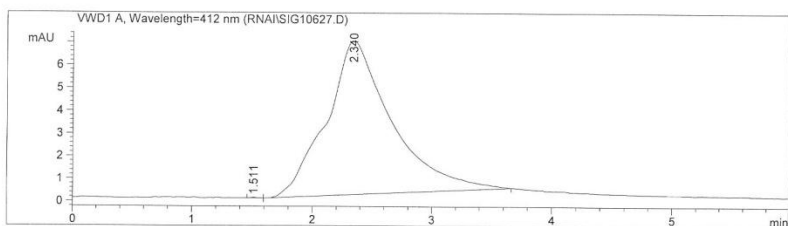
Sample Name: P7P1R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 3:19:41 PM
Sample Name    : P7P1R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method        : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed  : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier    :      1.0000
Dilution      :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	1.511	BP	0.0545	9.78440e-2	2.85513e-2	2.85513e-2	0.0378
2	2.340	VB	0.5157	258.61240	6.79031	6.79031	99.9622

```
Totals :                258.71024    6.81886
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 3:25:44 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10628.D

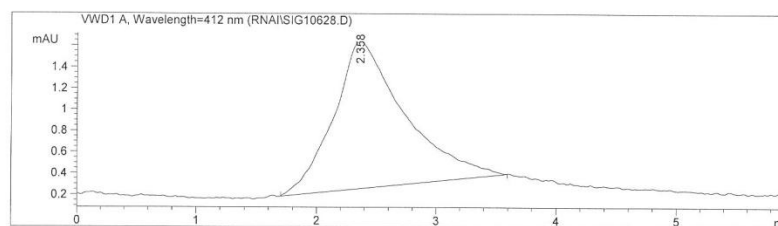
Sample Name: Hemina 1mM

Hemina 1mM fresca calibracion

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 3:26:28 PM
Sample Name    : Hemina 1mM             Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method        : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed  : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier    :      1.0000
Dilution      :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	2.358	BB	0.5382	56.95119	1.38021	1.38021	100.0000

```
Totals :                56.95119    1.38021
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 3:32:30 PM AdeM

Page 1 of 1

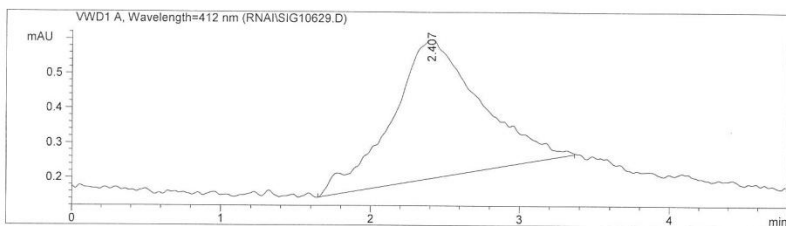
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10629.D

Sample Name: Hemina 1mM-2

Hemina 1mM fresca calibracion

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 3:33:59 PM
Sample Name    : Hemina 1mM-2          Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height *s [mAU]	Area %
1	2.407	BB	0.5014	16.54349	4.01250e-1	100.0000

Totals : 16.54349 4.01250e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

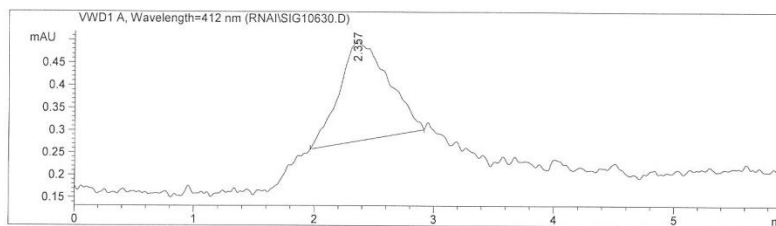
Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10630.D

Sample Name: Hemina 1mM-3

Hemina 1mM fresca calibracion

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 3:39:16 PM
Sample Name    : Hemina 1mM-3          Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height *s [mAU]	Area %
1	2.357	BV	0.3390	6.32903	2.25531e-1	100.0000

Totals : 6.32903 2.25531e-1

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10631.D

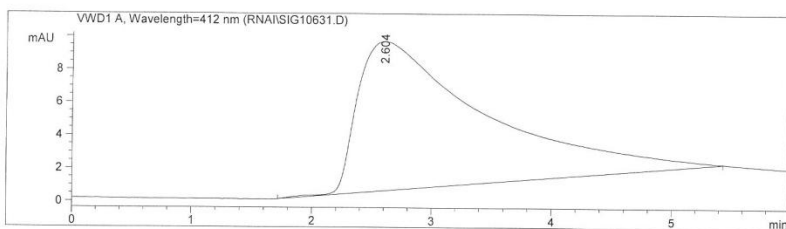
Sample Name: Hemina 1mM-3

Hemina 1mM calibracion

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 3:45:56 PM
Sample Name : Hemina 1mM-3 Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
              (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.604	PB	0.9786	669.41864	9.05861	100.0000

```
Totals :                669.41864    9.05861
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 3:51:58 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10633.D

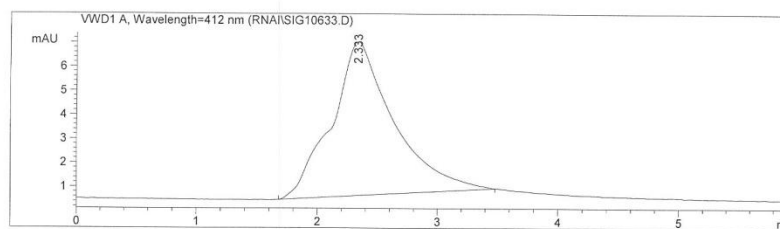
Sample Name: P7P5R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 4:01:43 PM
Sample Name : P7P5R1-4 Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
              (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.333	BB	0.4838	230.42719	6.40540	100.0000

```
Totals :                230.42719    6.40540
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 4:07:45 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10634.D

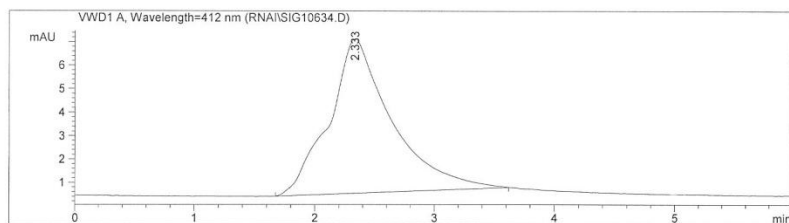
Sample Name: P7P5R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 4:08:32 PM
Sample Name : P7P5R1-4-2
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height *s [mAU]	Area %
1	2.333	BB	0.4940	240.12741	6.60626	100.0000

```
Totals :                240.12741    6.60626
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 4:14:34 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10635.D

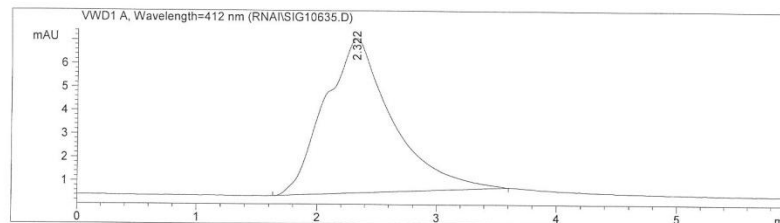
Sample Name: P7R1R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 4:14:57 PM
Sample Name : P7R1R1-4-2
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPB
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height *s [mAU]	Area %
1	2.322	PB	0.5170	258.31885	6.59034	100.0000

```
Totals :                258.31885    6.59034
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 4:20:59 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10636.D

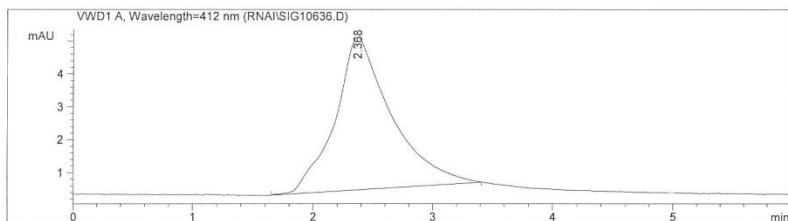
Sample Name: P7R4R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 4:22:05 PM
Sample Name : P7R4R1-4-2
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	*s	Height [mAU]	Area %
1	2.368	BB	0.4320	151.80380		4.64827	100.0000

```
Totals : 151.80380 4.64827
```

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 10/13/2009 4:28:07 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\R\NAI\SIG10637.D

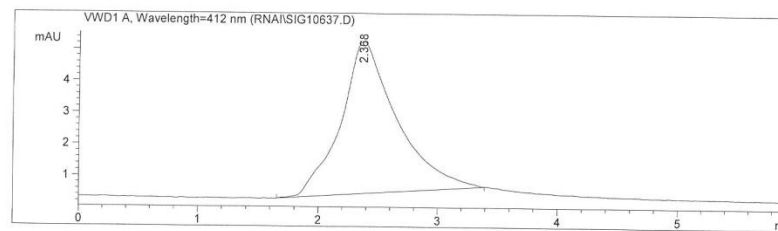
Sample Name: P7R4R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 4:28:43 PM
Sample Name : P7R4R1-4
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\R\NAI.M
Last changed : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	*s	Height [mAU]	Area %
1	2.368	PB	0.4423	157.91898		4.83349	100.0000

```
Totals : 157.91898 4.83349
```

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 10/13/2009 4:34:45 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10638.D

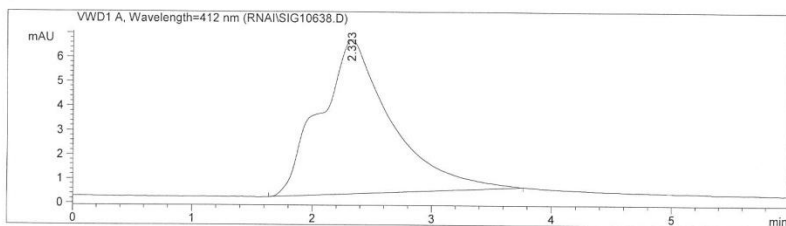
Sample Name: P7R5R1-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 4:35:18 PM
Sample Name    : P7R5R1-4                Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method        : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed  : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier    :      1.0000
Dilution      :      1.0000
Sample Amount :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	2.323	PB	0.5480	263.61679	6.35573	6.35573	100.0000

```
Totals :                263.61679    6.35573
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 4:41:21 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10639.D

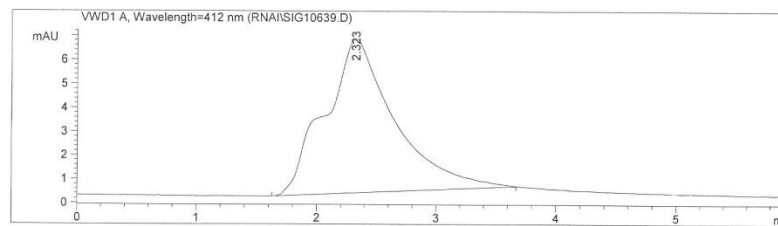
Sample Name: P7R5R1-4-2

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 4:41:50 PM
Sample Name    : P7R5R1-4-2            Location : Vial 1
Acq. Operator : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method        : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed  : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier    :      1.0000
Dilution      :      1.0000
Sample Amount :      5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	2.323	PB	0.5428	261.19400	6.44362	6.44362	100.0000

```
Totals :                261.19400    6.44362
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Instrument 2 10/13/2009 4:47:52 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10640.D

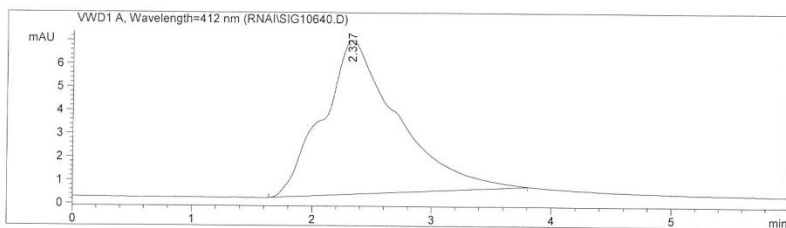
Sample Name: P7C4R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 4:49:24 PM
Sample Name    : P7C4R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====

```

Signal 1: WWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.327	BB	0.5813	289.14105	6.61524	100.0000

Totals : 289.14105 6.61524

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 10/13/2009 4:55:27 PM AdeM

Page 1 of 1

Data File C:\HPCHEM\2\DATA\RNAI\SIG10641.D

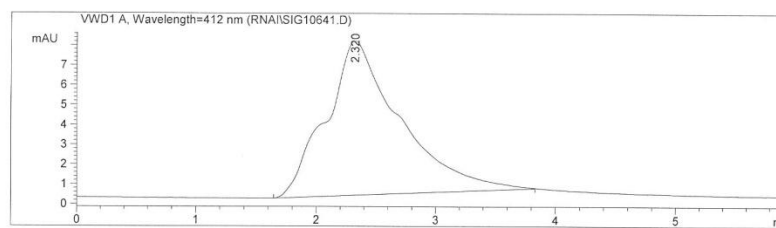
Sample Name: P7C5R2-4

Experimento 4 N3 repeticion 1 (2:20)

```

=====
Injection Date : 10/13/2009 4:56:08 PM
Sample Name    : P7C5R2-4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : Instrument 2
Method         : C:\HPCHEM\2\METHODS\RNAI.M
Last changed   : 10/13/2009 8:47:53 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinacion de RBPH
Columna ZORBAX GF-250 4.6 x 250mm 4um
Pre-columna ZORBAX DIOL 4.6 x 12.5mm 4 Um
Fase Movil 100 % Buffer TRIS NaCl Isocratico
Flujo 1 ml/min
Volumen de inyeccion 5uL (con Loop)
Para pruebas se haran lecturas variando la longitud de onda
=====

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 5.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====

```

Signal 1: WWD1 A, Wavelength=412 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.320	PB	0.5700	336.15692	7.79600	100.0000

Totals : 336.15692 7.79600

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Instrument 2 10/13/2009 5:02:11 PM AdeM

Page 1 of 1

