

**Nuria Rodríguez Fariñas**

**DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS  
DE INTERÉS FARMACOLÓGICO  
EN FLUIDOS BIOLÓGICOS POR TÉCNICAS  
ELECTROFORÉTICAS Y ELECTROQUÍMICAS**

I.S.B.N. Ediciones de la UCLM  
84-8427-455-1



Ediciones de la Universidad  
de Castilla-La Mancha

Cuenca, 2006





UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA  
Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos

**Determinación de compuestos de interés farmacológico en  
fluidos biológicos por técnicas electroforéticas y  
electroquímicas**

**Nuria Rodríguez Fariñas**

**Tesis doctoral  
Ciudad Real, 2004**

UMI Number: 3220266



---

UMI Microform 3220266

Copyright 2006 by ProQuest Information and Learning Company.  
All rights reserved. This microform edition is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.

---

ProQuest Information and Learning Company  
300 North Zeeb Road  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346



**UNIVERSIDAD DE  
CASTILLA - LA MANCHA**

**DEPARTAMENTO DE  
QUIMICA ANALÍTICA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Determinación de compuestos de interés farmacológico en fluidos  
biológicos por técnicas electroforéticas y electroquímicas.**

por

**Nuria Rodríguez Fariñas**

Visado en Ciudad Real, 16 de Enero de 2004

Fdo.: Juana Rodríguez Flores  
Profesora Titular del  
Departamento de Química  
Analítica y Tecnología de  
Alimentos de la Universidad  
de Castilla-La Mancha

Trabajo presentado para optar al Grado  
de Doctor en Ciencias Químicas

Fdo.: Gregorio Castañeda Peñalvo  
Profesor Titular del  
Departamento de Química  
Analítica y Tecnología de  
Alimentos de la Universidad  
de Castilla-La Mancha

Fdo. Nuria Rodríguez Fariñas



**UNIVERSIDAD DE  
CASTILLA - LA MANCHA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA  
Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**JOSE MARÍA LEMUS GALLEGO**, Profesor Titular de Universidad y Secretario del Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Castilla-La Mancha,

### **CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de investigación titulado “Determinación de compuestos de interés farmacológico en fluidos biológicos por técnicas electroforéticas y electroquímicas” constituye la Tesis Doctoral que presenta **D<sup>a</sup>. Nuria Rodríguez Fariñas** para aspirar al Grado de Doctor en Química, y ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento bajo la dirección la **Dra. D<sup>a</sup>. Juana Rodríguez Flores** y del **Dr. D. Gregorio Castañeda Peñalvo**.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Ciudad Real a dieciséis de enero de dos mil cuatro.

**Vº Bº**

Fdo. Maria Dolores Cabezudo Ibáñez  
Directora del Departamento

Fdo. José Maria Lemus Gallego  
Secretario del Departamento

*Una vez concluido este trabajo, no podría olvidarme de aquellas personas que han compartido conmigo estos últimos años y a los que desearía expresar mi gratitud.*

*En primer lugar, al Dr. Juan José Berzas Nevado por haberme brindado la oportunidad de trabajar en este grupo de investigación.*

*A la Dra. Juana Rodríguez Flores y al Dr Gregorio Castañeda Peñalvo, directores de este trabajo, por el constante interés, paciente apoyo y por supuesto, la inapreciable ayuda que me han prestado en todo momento. Gracias.*

*A mis compañeros del laboratorio de Química Analítica de Ciudad Real porque siempre que les he necesitado han estado ahí para echarme una mano. Tampoco me puedo olvidar de los de Toledo, María, Sara y especialmente Rosa y Javi, gracias por ayudarme sobre todo en los últimos momentos.*

*A mis padres, hermanas y abuelo, por su comprensión y cariño y sobre todo paciencia. Porque me habéis aguantado cuando era insoportable, me habéis animado a llegar y sin vosotros no hubiera sido posible.*

*Ismael, ¿qué te voy a decir que no sepas?, solamente decirte... gracias por tu apoyo incondicional y por estar siempre a mi lado.*

*A mis amigas Carol, Raquel, Eva, Henar y Susana por su amistad, consejos y apoyo que nunca me han faltado.*

*Juli, gracias por el tiempo que me has dedicado. Has sido la "gota" que ha colmado este trabajo.*

*A mis padres*

*A Ismael*



## ÍNDICE

<b>OBJETO DE LA TESIS.</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b> .....	3
<b>1.1. Historia, evolución y metabolismo de fármacos</b> .....	5
<b>1.2. Aspectos farmacológicos y bibliográficos de los compuestos en estudio.</b> .....	13
<b>1.2.A.</b> Aspectos farmacológicos de la leucemia crónica. ....	15
<b>1.2.B.</b> Aspectos farmacológicos de la disfunción eréctil.....	30
<b>1.2.C.</b> Aspectos farmacológicos del aborto .....	52
<b>1.3. Aspectos teóricos de las técnicas utilizadas.</b> .....	63
<b>1.3.A.</b> Electroforesis Capilar .....	65
Definición de electroforesis y principios generales de la técnica. ....	66
<b>Teoría de la electroforesis</b> .....	70
Aspectos teóricos de la electroforesis capilar .....	70
El fenómeno de electroforesis y el flujo electroosmótico .....	73
El tampón de separación .....	80

Parámetros determinantes de la separación .....	84
Factores que afectan al desarrollo de la separación .....	87
<b>Aspectos instrumentales y operacionales de la electroforesis capilar .....</b>	<b>93</b>
Inyección de la muestra .....	94
Concentración de la muestra en el capilar .....	100
Fuente de alto voltaje .....	106
Capilar.....	107
Sistemas de termostatación del capilar .....	112
Sistemas de detección.....	114
<b>Optimización de la precisión de las medidas en electroforesis capilar ..</b>	<b>129</b>
<b>Aplicaciones de la electroforesis capilar .....</b>	<b>131</b>
<b>1.3.B. Técnicas Electroquímicas. ....</b>	<b>133</b>
Clasificación de las técnicas electroanalíticas.....	134
<b>Polarografía .....</b>	<b>136</b>
El polarograma .....	137
Características del electrodo de gotas de mercurio .....	141

<b>Técnicas polarográficas</b> .....	143
Polarografía diferencial de pulso .....	143
<b>Técnicas voltamperométricas</b> .....	147
Sistema voltamperométrico .....	148
Microelectrodos .....	149
<b>Técnicas voltamperométricas utilizadas</b> .....	152
Voltamperometría cíclica .....	152
Voltamperometría de onda cuadrada .....	156
Voltamperometría por redisolución .....	159
<b>Grupos funcionales reactivos</b> .....	166
<b>1.4. Sistema de tratamiento de muestras biológicas</b> .....	173
<b>1.5. Análisis estadístico elemental</b> .....	187
Parámetros estadísticos descriptivos clásicos .....	189
Métodos de correlación .....	191
Rectas de calibrado(Regresión por mínimos cuadrados) .....	192
Test de la F.....	197

Test de la $t$ .....	198
Comparación de rectas de calibrado. Análisis de varianza (ANOVA) ....	199
Otros usos de la calibración. Comparación de las pendientes de dos rectas de calibrado.....	205

## PARTE EXPERIMENTAL

<b>2. MATERIAL Y DISOLUCIONES</b> .....	211
<b>2.A. Instrumentación utilizada.</b> .....	213
<b>2.B. Disoluciones utilizadas.</b> .....	215

## DETERMINACIÓN DE IMATINIB Y SU METABOLITO

<b>3. Determinación de Imatinib y su metabolito en orina mediante electroforesis capilar en zona</b> .....	221
<b>3.1. Condiciones de operación.</b> .....	226
<b>3.2. Condiciones de medida.</b> .....	227
<b>3.3. Obtención de la orina.</b> .....	228
<b>3.4. Estudios preliminares.</b> .....	228

3.5. Influencia del pH en la separación.....	230
3.6. Influencia de la concentración del tampón de separación. ....	233
3.7. Estudio de la influencia del voltaje sobre la separación. ....	235
3.8. Efecto de la temperatura en la separación. ....	238
3.9. Influencia del tiempo de inyección de la muestra.....	240
3.10. Condiciones químicas e instrumentales finales. ....	242
3.11. Límites de detección y cuantificación.....	244
3.12. Calibrado y estudio estadístico.....	247
3.13. Precisión. ....	252
3.14. Aplicaciones.....	253
<b>4. Determinación conjunta de Imatinib y su metabolito mediante técnicas electroquímicas en muestras de orina. ....</b>	<b>257</b>
4.1. Estudio de imatinib por voltamperometría cíclica.....	260
4.2. Estudios preliminares. Selección de la técnica instrumental. ....	266
4.3. Optimización del proceso redox mediante voltamperometría de redisolución adsortiva por onda cuadrada.....	270

<b>4.3.1.</b> Influencia del pH.....	270
<b>4.3.2.</b> Influencia de la fuerza iónica.....	278
<b>4.3.3.</b> Optimización de los parámetros instrumentales .....	279
<b>a.</b> Influencia del tiempo de acumulación .....	280
<b>b.</b> Influencia del potencial de acumulación .....	281
<b>c.</b> Influencia de la frecuencia .....	283
<b>d.</b> Influencia del incremento de scan .....	285
<b>e.</b> Influencia de la magnitud del pulso aplicado.....	286
<b>f.</b> Influencia del área del electrodo de trabajo.....	287
<b>g.</b> Condiciones químicas e instrumentales.....	289
<b>4.3.4.</b> Calibrado y estudio estadístico .....	290
<b>4.3.5.</b> Determinación de imatinib y su principal metabolito en orina .....	293

## DETERMINACIÓN DE CITRATO DE SILDENAFILO Y SU METABOLITO

<b>5. Determinación de citrato de sildenafil y su principal metabolito (UK-103,320) en suero mediante electroforesis capilar electrocinética micelar .....</b>	<b>313</b>
<b>5.1. Condiciones de operación. ....</b>	<b>318</b>

<b>5.2.</b> Condiciones de medida. ....	319
<b>5.3.</b> Pretratamiento de la muestra.....	320
<b>5.3.1.</b> Obtención del suero.....	320
<b>5.3.2.</b> Tratamiento del suero humano .....	320
<b>5.4.</b> Estudios preliminares. Optimización de las condiciones de separación en ECZ .....	324
<b>5.5.</b> Estudios preliminares en ECEM.....	325
<b>5.6.</b> Influencia de la concentración del tampón de separación. ....	327
<b>5.7.</b> Influencia de la concentración de SDS .....	329
<b>5.8.</b> Estudio de la influencia del voltaje sobre la separación. ....	332
<b>5.9.</b> Efecto de la temperatura en la separación. ....	335
<b>5.10.</b> Influencia del tiempo de inyección de la muestra.....	338
<b>5.11.</b> Condiciones químicas e instrumentales finales. ....	340
<b>5.12.</b> Límites de detección y cuantificación.....	341
<b>5.13.</b> Calibrado y estudio estadístico.....	343
<b>5.14.</b> Aplicaciones.....	347

<b>6. Determinación de citrato de sildenafilo y su principal metabolito (UK-103,320) en suero mediante electroforesis capilar con preconcentración por amplificación de campo.</b> .....	349
<b>6.1.</b> Condiciones de operación .....	351
<b>6.2.</b> Condiciones de medida .....	356
<b>6.3.</b> Estudios preliminares .....	357
<b>6.4.</b> Influencia de la fuerza iónica de la muestra .....	359
<b>6.5.</b> Influencia de la concentración del tampón de separación .....	360
<b>6.6.</b> Influencia de la concentración de SDS .....	362
<b>6.7.</b> Optimización del voltaje de separación .....	364
<b>6.8.</b> Estudio de la influencia del voltaje y tiempo de preconcentración en la etapa de inversión de polaridad .....	365
<b>6.9.</b> Influencia del tiempo de inyección de la muestra .....	368
<b>6.10.</b> Condiciones químicas e instrumentales finales .....	370
<b>6.11.</b> Límites de detección y cuantificación .....	371
<b>6.12.</b> Calibrado y estudio estadístico .....	373
<b>6.13.</b> Aplicaciones .....	380



<b>7. Determinación conjunta de citrato de sildenafilo y su principal metabolito (UK-103,320) mediante técnicas electroquímicas en muestras de suero y orina.....</b>	<b>383</b>
<b>7.1. Estudio de UK-103,320 por voltamperometría cíclica .....</b>	<b>386</b>
<b>7.2. Estudios preliminares. Selección de la técnica instrumental .....</b>	<b>392</b>
<b>7.3. Optimización del proceso redox mediante voltamperometría de redisolución adsortiva por onda cuadrada.....</b>	<b>395</b>
<b>7.3.1. Influencia del pH .....</b>	<b>395</b>
<b>7.3.2. Influencia de la fuerza iónica.....</b>	<b>399</b>
<b>7.3.3. Optimización de los parámetros instrumentales.....</b>	<b>400</b>
<b>a. Influencia del tiempo de acumulación .....</b>	<b>400</b>
<b>b. influencia del potencial de acumulación.....</b>	<b>403</b>
<b>c. Influencia de la frecuencia.....</b>	<b>404</b>
<b>d. Influencia del incremento de scan.....</b>	<b>406</b>
<b>e. Influencia de la magnitud del pulso aplicado .....</b>	<b>407</b>
<b>f. Influencia del área del electrodo de trabajo .....</b>	<b>409</b>
<b>g. Condiciones químicas e instrumentales finales .....</b>	<b>410</b>

7.3.4. Determinación de citrato de sildenafil y UK-103,320 en suero humano .....	411
7.3.5. Determinación de citrato de sildenafil y UK-103,320 en orina.....	422

## DETERMINACIÓN DE MIFEPRISTONE

<b>8. Determinación de Mifepristone mediante técnicas electroquímicas en muestras de orina.</b> .....	433
8.1. Estudio de mifepristone por voltamperometría cíclica .....	436
8.2. Estudios preliminares. Selección de la técnica instrumental .....	442
8.3. Optimización del proceso redox mediante voltamperometría de redisolución adsorbtiva por onda cuadrada .....	445
8.3.1. Influencia del pH.....	446
8.3.2. Influencia de la fuerza iónica.....	453
8.3.3. Optimización de los parámetros instrumentales .....	454
a. Influencia del tiempo de acumulación .....	455
b. Influencia del potencial de acumulación .....	457
c. Influencia de la frecuencia .....	458
d. Influencia del incremento de scan .....	460

<b>e.</b> Influencia de la magnitud del pulso aplicado .....	462
<b>f.</b> Influencia del área del electrodo de trabajo .....	464
<b>g.</b> Condiciones químicas e instrumentales.....	465
<b>8.3.4.</b> Calibrado y estudio estadístico .....	466
<b>8.3.5.</b> Determinación de mifepristone en orina .....	470
<b>CONCLUSIONES</b> .....	483
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	487
<b>PUBLICACIONES</b> .....	503



## ***OBJETO DE LA TESIS***

Esta Memoria tiene por objeto establecer nuevos métodos analíticos que, mediante técnicas electroforéticas y electroquímicas, permitan de una manera rápida, sensible y precisa, identificar y cuantificar algunas drogas de nueva generación y sus principales metabolitos en fluidos biológicos. La finalidad es aportar nuevas metodologías válidas para su posible uso en la práctica clínica y forense.



## 1. Introducción





## **1.1. Historia, evolución y metabolismo de fármacos**

---



Los fármacos pueden ser considerados como el descubrimiento más importante del siglo XX, ya que la vida del hombre se encuentra, en mayor o menor medida, relacionada con estos productos desde su nacimiento hasta su muerte. Aunque la utilización de plantas y minerales para restablecer la salud perdida, modificar la conducta, etc, se conoce desde la antigüedad, los medicamentos con el sentido y forma en que los conocemos actualmente son relativamente recientes y, más concretamente, de los últimos 50 años.

La historia del descubrimiento de los fármacos se encuentra íntimamente relacionada con el desarrollo de las ciencias experimentales, en general, y de la química orgánica, en particular, al menos hasta los últimos 20 años, en que se produce la explosión de los métodos biológicos. Con el desarrollo de métodos de síntesis, la aparición de técnicas instrumentales que han originado métodos de análisis poderosos, la aplicación de la informática, así como el desarrollo de la biología molecular, se ha podido conocer la estructura de los receptores o se tiene una idea aproximada de los mismos y, en muchos casos, se ha establecido la relación entre la estructura química de un fármaco y su acción biológica.

Un **fármaco**, o principio activo, se define como una sustancia pura, químicamente definida, extraída de fuentes naturales o sintetizada en el laboratorio, dotada de una acción biológica, que puede o no ser aprovechada por sus efectos terapéuticos. La lengua castellana, a diferencia de otras, distingue entre fármaco y **droga**, que, estrictamente, significa una materia prima, de origen vegetal o animal, que contiene uno o varios principios activos y que no ha sufrido manipulación, salvo la necesaria para su conservación.

Cuando un fármaco tiene una actividad biológica útil desde el punto de vista terapéutico, se hace necesario su desarrollo hasta dar lugar a un medicamento, lo que supone las siguientes características:

- ✓ Se presenta como una *forma farmacéutica* (inyectables, comprimidos, etc), constituida por uno o varios principios activos y, generalmente, por uno o varios excipientes.
- ✓ Ha sido aprobado oficialmente para su comercialización tras superar una serie de controles analíticos (composición química, pureza, etc) y farmacológico-toxicológico (actividad, efectos laterales y secundarios, ausencia de actividad carcinógena y teratógena, etc).

La síntesis y el análisis de los fármacos son aplicaciones directas de la síntesis orgánica y de la química analítica, respectivamente.

Los fármacos se pueden clasificar de muchas maneras. Una primera clasificación sería según una perspectiva estructural:

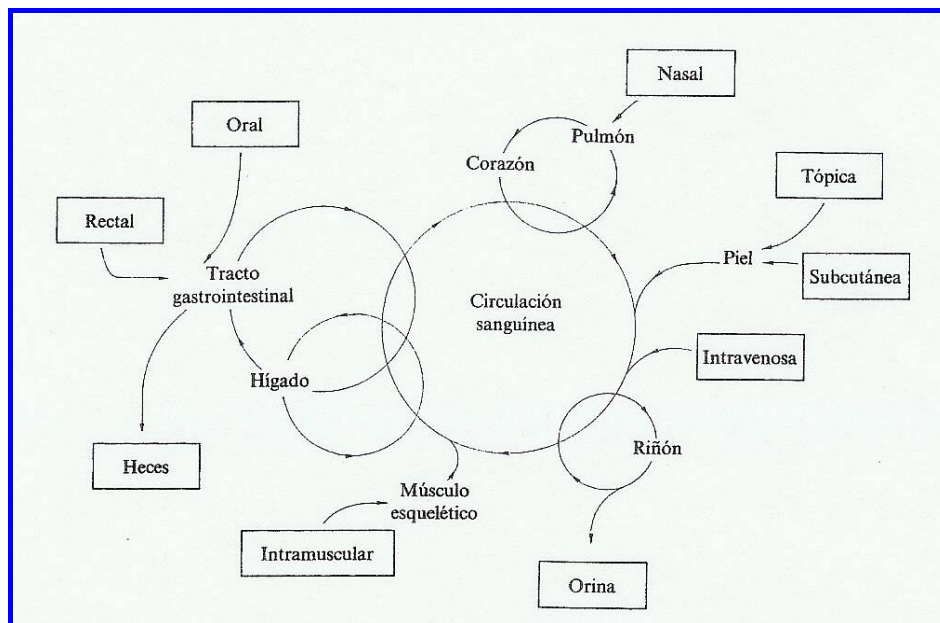
- Estructuralmente inespecíficos: incluye aquellos fármacos cuya acción no está directamente relacionada con su estructura, o esta relación no se conoce. La acción se explica por su capacidad para modificar las propiedades fisicoquímicas de un medio biológico, con frecuencia una membrana. Por tanto, compuestos de estructuras muy diferentes pueden ejercer la misma acción.
- Estructuralmente específicos: mínimos cambios estructurales pueden dar lugar a un compuesto inactivo o con una actividad biológica diferente, a veces inesperada.

La clasificación tradicional de tipo farmacológico, empleada en los textos de farmacología y de química farmacéutica, se organiza de acuerdo con la acción terapéutica de los fármacos sobre órganos (sistema nervioso central, glándula tiroidea, etc), síndromes patológicos (anticonvulsivos, antilipidémicos, etc) o efectos idénticos (anestésicos locales, antihipertensores, etc). Esta clasificación se estructura, a su vez, sobre subdivisiones basadas en la similitud estructural de sus componentes.

Finalmente, los fármacos también se distinguen entre agentes quimioterápicos y farmacodinámicos. La primera denominación corresponde a lo que se utilizan en la defensa frente a microorganismos y parásitos (antimicrobianos, antivirales, etc) alterando su ciclo vital por interacción con sus procesos bioquímicos, aprovechando las diferencias entre éstos y los de los organismos superiores. La segunda corresponde a los que modulan las funciones fisiológicas. En los organismos superiores, dichas funciones se regulan a través de diversas biomoléculas, tales como enzimas, hormonas, neurotransmisores, etc, cuya alteración puede corregirse mediante el empleo de sustancias externas al organismo (xenobióticos), que imiten o antagonicen la acción de dichas biomoléculas, o que modulen su biosíntesis, liberación, almacenamiento o metabolismo. Ambas modalidades de acción se engloban dentro de los agentes farmacodinámicos.

La acción de los fármacos no depende únicamente de su capacidad para desarrollar una respuesta farmacológica. Es también de importancia crítica que posean propiedades farmacocinéticas que les permitan alcanzar el lugar requerido para su acción y que su toxicidad sea mínima.

Las principales rutas de absorción, distribución y excreción de los fármacos se resumen en la figura 1.1.



**Figura 1.1.** Vías principales de administración, absorción, distribución y excreción de fármacos.

Las membranas biológicas son las barreras que debe atravesar un fármaco para llegar a su lugar de acción. El transporte a través de la membrana puede producirse por filtración, pinocitosis, difusión pasiva, difusión facilitada o

transporte activo. Los fármacos que se asemejan a metabolitos naturales utilizan, en general, el mismo mecanismo de transporte que ellos.

Los fármacos, excepto los que se administran por vía intravenosa, deben absorberse para poder actuar en la vía sistémica o general. En cuanto a la distribución de un fármaco en los diferentes líquidos del organismo está influenciada por la naturaleza de las barreras de su entorno y por la presencia de macromoléculas que puedan modificar la concentración de fármaco libre.

El proceso conjunto de metabolismo y excreción finaliza la acción de los fármacos. El metabolismo es esencialmente un mecanismo de detoxificación aunque, en ciertos casos, la toxicidad de un fármaco se debe a la formación de determinados metabolitos. Aunque algunos fármacos no experimentan ninguna transformación metabólica, la mayoría sí lo hacen. Las biotransformaciones de los fármacos van dirigidas a la formación de metabolitos más hidrosolubles, por desenmascaramiento o introducción de grupos polares, tales como COOH, OH y NH<sub>2</sub>, o incluso desmetilaciones.

Un fármaco, o sus metabolitos, puede excretarse simultáneamente por varias vías: orina, bilis, saliva, respiración, etc. En la mayor parte de los casos, sólo la excreción renal y la biliar tienen importancia cuantitativa.

A continuación se pasará a describir tres fármacos de nueva generación así como su acción terapéutica: imatinib mesilato (Gleevec), citrato de sildenafil (Viagra) y mifepristone (Mifegine).

## 1.2. Aspectos farmacológicos y bibliográficos de los compuestos en estudio

---



### ***1.2.A. Aspectos farmacológicos de la leucemia crónica***

El término cáncer quizás sea una de las palabras más utilizada y que más asusta cuando se habla de salud y de su reverso, la enfermedad. Este término se emplea para un grupo de enfermedades que tienen un denominador común: la transformación de la célula normal en otra que se comporta de forma muy peligrosa para el cuerpo humano.

En todas las formas de cáncer las células del cuerpo cambian y crecen sin control. La mayoría de las células cancerosas forman una protuberancia llamada tumor (maligno), a excepción de las células sanguíneas. Las células del tumor pueden desprenderse y trasladarse a otras partes del cuerpo. En este nuevo sitio, pueden continuar creciendo y formar más tumores. A este proceso de propagación se le llama metástasis. Cuando el cáncer se propaga a un nuevo sitio, se le sigue llamando por el nombre de la parte del cuerpo en donde se originó. Por ejemplo, si el cáncer de pulmón se propaga a los huesos, se llamará metástasis pulmonar y no cáncer de huesos. En el caso de la sangre, que como ya se ha mencionado no hay formación tumoral, hablaremos de leucemia.

Los factores de riesgo del cáncer están relacionados con el estilo de vida, el ambiente o la genética (factores hereditarios).

Algunos factores de riesgo relacionados con el estilo de vida, para algunos tipos de cáncer, son el hábito de fumar, una dieta baja en fibra o la exposición sin protección a la luz solar intensa. El único factor de riesgo

demostrado para la leucemia que está relacionado con el estilo de vida es el hábito de fumar. En general, existen pocos factores de riesgo ambientales conocidos para las leucemias crónicas. Los factores de riesgo ambientales son influencias en nuestro alrededor, tales como la radiación, sustancias químicas e infecciones.

La leucemia crónica es un tipo de cáncer que se inicia en las células de la médula ósea que producen sangre. Existen varios tipos de leucemias crónicas según sean las células alteradas. Por un lado, están los síndromes linfoproliferativos crónicos y, por otro, los síndromes mieloproliferativos crónicos.

Los síndromes linfoproliferativos crónicos son una serie de enfermedades producidas por el aumento descontrolado de linfocitos de aspecto maduro y que cursan con una afectación de la sangre periférica. La mayoría de estos síndromes están producidos por el crecimiento y multiplicación anormal de los linfocitos B. La leucemia linfática crónica es, dentro de estos síndromes, la más frecuente en la población occidental.

Los síndromes mieloproliferativos crónicos son debidos a una alteración de las células madre o formadoras de sangre, que hace que se aumente el número de las células precursoras y de las células maduras que derivan de ellas. Dentro de estos síndromes se encuentra la leucemia mieloide crónica, la cual pasaremos a comentar más adelante.

### ***Médula ósea***

La médula ósea, que está en el interior de los huesos, está compuesta por células hematopoyéticas (productoras de sangre), por células grasas y por tejidos de sostén (ayudan en el crecimiento de las células productoras de sangre).

Las células madre hematopoyéticas se reproducen continuamente para formar nuevas células. Algunas de éstas serán a su vez nuevas células madre y otras, al madurar, se transformarán en glóbulos rojos, glóbulos blancos y en plaquetas.

Los glóbulos rojos, eritrocitos o hematíes se encargan, a través de un componente llamado hemoglobina, de transportar el oxígeno de los pulmones a los tejidos y el monóxido de carbono en sentido contrario. Los hematíes se producen en la médula ósea a razón de unos dos millones por segundo. Si éstos disminuyen se producirá una anemia y no llegará la suficiente cantidad de oxígeno a los tejidos.

Las plaquetas son fragmentos de células de la médula ósea que circulan por la sangre y cuya función principal se encuentra en el mecanismo de la coagulación. Si no hay suficiente cantidad de plaquetas, al dañarse o producirse un traumatismo en los vasos sanguíneos, se pueden dar hemorragias debido a que no hay ningún elemento que tapone la herida del vaso.

Los glóbulos blancos o leucocitos participan en la defensa del organismo frente a cualquier microorganismo dañino, también actúan destruyendo las células cancerosas.

## Capítulo 1

---

Los glóbulos blancos están formados por tres tipos de células denominadas linfocitos, monocitos y granulocitos.

La célula inmadura de los granulocitos se llama mieloblasto (de éste viene el nombre de leucemia mieloide). Una vez maduros, se diferencian en tres tipos de células llamadas neutrófilos, eosinófilos y basófilos, éstos se distinguen por el tamaño y por el color de sus gránulos. Estos gránulos contienen enzimas y otras sustancias que son las que contrarrestan la acción de los elementos químicos que producen los microorganismos invasores.

Los monocitos protegen al organismo de las bacterias. Al igual que los granulocitos sufren un proceso de maduración, en su inicio se denominan monoblastos. Circulan por la sangre durante 24 horas, tras lo cual pasan a los tejidos donde se convierten en macrófagos, gracias a esto destruyen a los gérmenes.

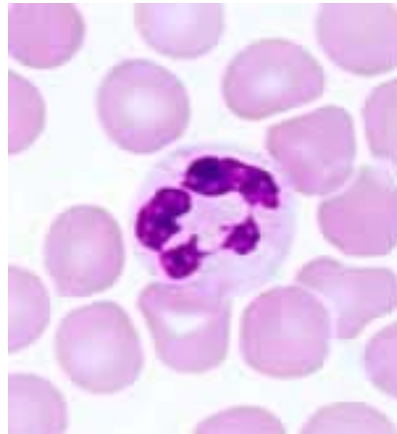
El tejido linfático se encuentra en distintas zonas del cuerpo como son los ganglios linfáticos, el bazo, el timo, las amígdalas, las adenoides y la médula ósea. Este tejido está formado por diferentes tipos de células, la principal se denomina linfocito y, entre otras funciones, se encargan de la defensa del cuerpo humano. Hay dos tipos de linfocitos, linfocitos B y linfocitos T.

Los linfocitos B reconocen las bacterias y se unen a ellas. Los granulocitos y los monocitos únicamente pueden reconocer y destruir a las bacterias cuando los linfocitos están unidos a éstas.

Los linfocitos T reconocen a las células infectadas por los virus y las destruyen con ayuda de los macrófagos.

### ***Leucemia Mieloide Crónica (LMC)***

Esta leucemia consiste en una transformación de la célula madre hematopoyética, o formadora de sangre, a una célula cancerosa dando lugar a un crecimiento descontrolado de glóbulos blancos (la serie mieloide: granulocitos y monocitos). Esto provoca, si no se controla, un aumento masivo de su concentración en sangre.



***Figura 1.2. Glóbulos blancos que se multiplican de manera anormal en pacientes con LMC***

La diferencia entre la leucemia mieloide aguda y la crónica, es que en ésta última hay un desarrollo de glóbulos blancos maduros que generalmente funcionan normalmente. Esto hace que el curso de la enfermedad sea más lento y menos serio.

La mayor parte de los pacientes pasan por una fase de transformación o aceleración de la enfermedad, con progresiva resistencia al tratamiento y exacerbación de la sintomatología.

Se ha observado que las células de los pacientes con esta leucemia tienen una alteración en sus cromosomas. Una célula normal tiene 46 cromosomas agrupados en 23 pares. Los cromosomas 9 y 22 de estos pacientes son anormales. Lo que ocurre es que en esos cromosomas se separan trozos, que se intercambian de un cromosoma a otro. Este intercambio anormal de cromosomas se llama traslocación. Esta traslocación ocurre sólo en las células progenitoras y en las células sanguíneas derivadas de ellas y no aparece en los demás tejidos. Al cromosoma cambiado o mutado, se le denomina cromosoma Filadelfia (Figura 1.3) y da como resultado una proteína anormal o mutada (denominada BCR-abl), la cual es responsable del desarrollo de la enfermedad (1-6). No se conoce por qué ocurre esta mutación o alteración, aunque se ha observado que se puede desarrollar leucemia mieloide crónica tras exposición a radiaciones y solventes industriales.



**Figura 1.3.** *Cromosoma Filadelfia que intercambia información genética*

La LMC tiene 3 fases (7-9):

- ✓ Fase crónica: en esta fase, que puede durar meses o años, se encuentran pocos mieloblastos tanto en la sangre como en la médula ósea. (10-17)
- ✓ Fase acelerada: aparecen mieloblastos en la sangre y en la médula con disminución de células normales. La duración media de esta fase es de seis a nueve meses. (9)
- ✓ Fase blástica: por lo menos un tercio de las células de la sangre y médula son mieloblastos, pueden aparecer acúmulos de estas células en forma de tumores a nivel de huesos o ganglios. (8,9,18)
- ✓ Fase refractaria: cuando los mieloblastos no disminuyen a pesar del tratamiento.

En las primeras fases de la LMC algunos pacientes no presentan síntomas, y cuando estos aparecen se pueden encontrar: cansancio intenso, febrícula, falta de apetito, sudoración nocturna y sensación de distensión abdominal.

### ***Tratamiento para la LMC***

La LMC es una enfermedad incurable en la mayoría de los casos. El tratamiento va dirigido a controlar los síntomas, prevenir la transformación blástica de la enfermedad y erradicar la población clonal. Dependiendo de la fase en la que esté la enfermedad, así se administrará un tratamiento u otro:

- ✓ Quimioterapia: hidroxiurea y busulfán. Es un tratamiento del cáncer que utiliza medicamentos para interrumpir la proliferación de células cancerosas, mediante la eliminación de las células o evitando su división.
- ✓ Radioterapia, que destruye las células tumorales.
- ✓ Transplante de médula ósea: se realiza destruyendo totalmente la médula del paciente y luego se sustituye por otra médula, de un donante cuyas características sean similares. Por ello se eligen donantes compatibles.
- ✓ Cirugía para extraer el bazo (esplenectomía)
- ✓ Interferón-alfa (IFN- $\alpha$ ): forma parte de una familia de proteínas naturales que se producen en respuesta a división celular y estímulos virales. Aunque no está claro su mecanismo de acción en la LMC, este agente tiene diversos efectos



biológicos conocidos, entre ellos la inhibición del crecimiento de células y la regulación inmunitaria. (9)

✓ Inmunoterapia con factores estimuladores o inhibidores de colonias de células: indicado para tratar a pacientes en las tres primeras etapas de la LMC. Imatinib (Gleevec) es un nuevo tipo de medicamento contra el cáncer, denominado inhibidor de la tirosina quinasa. Bloquea la enzima tirosina quinasa (Bcr-Abl) que hace que las células primarias se desarrollen como glóbulos blancos (granulocitos o blastocitos) en mayor cantidad de los que necesita el cuerpo. Las características principales de este fármaco son las que pasamos a desarrollar a continuación.

### ***GLEEVEC***

Muchas de las drogas recientemente lanzadas al mercado americano para combatir el cáncer pertenecen a un nuevo grupo de drogas que constituyen la denominada terapia biológica o inmunoterapia. Estas drogas son más específicas que las drogas normalmente utilizadas en los tratamientos de tipo quimioterapia. La base de estas nuevas drogas está en la utilización de recursos y estrategias adoptadas normalmente por nuestro sistema inmunológico en el combate a diferentes enfermedades.

La LMC es un blanco atractivo para un programa de creación de medicamentos diseñados de manera racional. El dato característico de la LMC, el cromosoma Filadelfia (1,3), contiene la anomalía genética causal

específica que da por resultado la activación constitutiva de la tirosina quinasa (Bcr-Abl). Gleevec se dirige hacia la causa molecular de la LMC y es un tratamiento eficaz y bien tolerado por vía oral. Al inhibir únicamente la causa específica de la enfermedad, Gleevec lleva a buen término el objetivo de tratamiento dirigido al ámbito molecular.

Gleevec constituye el inicio de una nueva era de farmacoterapia dirigida, diseñada de manera racional, y establece un paradigma para la creación futura de medicamentos.

Gleevec está indicado para el tratamiento de pacientes con LMC en fase crónica, fase acelerada o fase blástica después de fracaso del tratamiento con IFN- $\alpha$ .

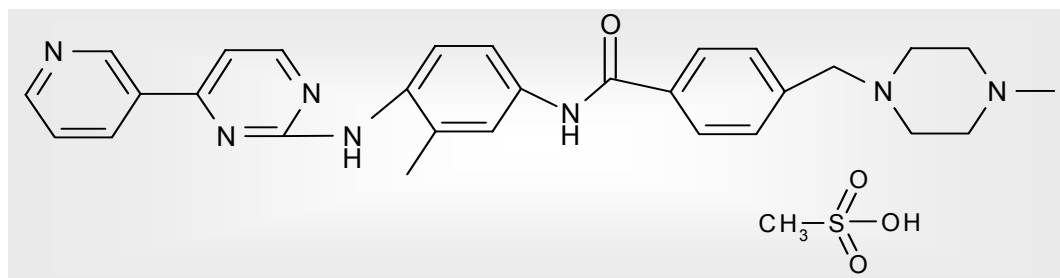
El objetivo inmediato del tratamiento de pacientes con LMC es estabilizar los recuentos de células en la sangre y lograr una respuesta hematológica y citogenética. Una respuesta hematológica comprende disminuir los recuentos leucocíticos hasta valores normales, lo que elimina células mieloides inmaduras de la sangre periférica y erradica los signos y los síntomas de la enfermedad. La respuesta citogenética se basa en el estudio de aspirados de médula ósea y la reducción de células Ph<sup>+</sup> (células que contienen el cromosoma Filadelfia) o su eliminación.

Además Gleevec está indicado para el tratamiento de tumores del estroma gastrointestinal maligno no resecable (cáncer del estómago e intestino). Se origina por un crecimiento celular incontrolado de los tejidos de soporte de estos órganos. Gleevec inhibe el crecimiento de estas células.

No hay estudios controlados sobre el beneficio clínico (mejora de los síntomas de la enfermedad o aumento de supervivencia, sólo hay estudios en los cuales se han realizado estimaciones). Tampoco hay ensayos clínicos comparativos con otros fármacos utilizados en la LMC (interferon- $\alpha$ , hidroxiurea, busulfan) aunque se ha visto que, indirectamente, las tasas de respuesta tanto hematológica como citogenética son superiores en pacientes tratados con imatinib. En la actualidad, se encuentra iniciado un estudio comparativo entre imatinib e interferon- $\alpha$ +citarabina en pacientes con LMC, pero no habrá resultados hasta dentro de un año (2005). (19,20)

Gleevec se presenta como cápsulas duras que contienen un polvo seco. Cada cápsula puede contener 50, 100 ó 400 mg de sustancia activa. El principio activo de Gleevec es Imatinib mesilato, un derivado de la 2-fenilamonopirimidina (figura 1.4), es una pequeña molécula antagonista, con actividad contra la proteína tirosina quinasa. Los demás componentes de este fármaco son celulosa microcristalina, crospovidona, estearato de magnesio y sílice coloidal anhidra. La cubierta de la cápsula está compuesta por gelatina, amarillo óxido de hierro y dióxido de titanio.

El imatinib es, por tanto, un nuevo principio activo con actividad antineoplástica no relacionado ni química ni farmacológicamente con otros fármacos antineoplásicos, por lo que representa una nueva entidad química y farmacológica en el tratamiento del cáncer.



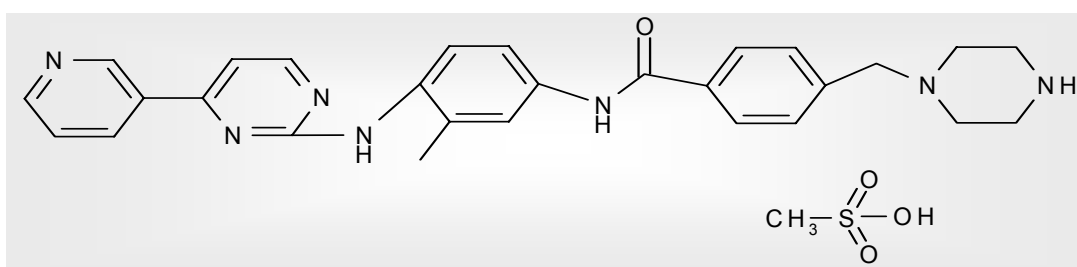
*Figura 1.4. Estructura química de Imatinib mesilato*

La dosis en LMC varía dependiendo de la fase: 400 mg/día para la fase crónica y 600 mg/día para la fase acelerada y para la fase blástica. En el tumor del estroma gastrointestinal no resecable la dosis es de 400 mg/día.

Imatinib mesilato se absorbe bien alcanzando su concentración máxima a las 2-4 horas de su administración oral con una biodisponibilidad absoluta del 98% (que se modifica si se administra con alimentos ricos en grasa) y alta unión a proteínas plasmáticas (95%), en particular albúmina y glucoproteína alfa-1-ácida, con poca unión a lipoproteínas. La vida media terminal de este principio activo es de alrededor de 18 a 22 horas, lo que sugiere que la dosificación una vez al día es apropiada. La cinética no cambia después de una dosificación repetida, y la acumulación es de 1.5 a 2.5 veces a estado estable cuando se administra la dosificación una vez al día. (21)

Se metaboliza a nivel hepático por el citocromo P-450 a un metabolito activo, N-desmetil imatinib (Figura 1.5). Alrededor del 81% de imatinib se elimina en el transcurso de siete días después de su ingestión. Imatinib y su metabolito se

excretan principalmente por las heces (68%) y una fracción mucho menor por la orina (13%). (5)



**Figura 1.5.** Estructura química del principal metabolito del Imatinib mesilato

Aunque los datos obtenidos hasta la fecha son limitados, la eficacia del imatinib es evidente en la LMC, sobre todo en aquellos pacientes que no han respondido a otros tratamientos (interferon- $\alpha$ ); por otro lado, comparando indirectamente con otros fármacos, debido a la ausencia de estudios comparativos, los resultados han sido superiores.

Todo ello unido a la ventaja de su administración oral, le hace ser en algunos casos el tratamiento de elección, además de que supone una nueva entidad tanto química como farmacológica en el tratamiento de estas patologías.

### ***Antecedentes bibliográficos de Imatinib mesilato***

Gleevec o imatinib mesilato es una droga, como se ha dicho anteriormente, de muy reciente lanzamiento para el tratamiento de la LMC. En la bibliografía, por tanto, se han encontrado muy pocas referencias que hayan abordado el estudio de imatinib y su principal metabolito.

Bakhtiar y col. (22) propusieron un método para cuantificar imatinib y su metabolito en plasma de mono utilizando un sistema semiautomático de extracción en fase sólida y realizando el análisis mediante HPLC acoplado a un detector de masas. Para llevar a cabo el análisis utilizaron una columna Shield-RP<sub>8</sub> (50 × 4.6 mm d.i.) y como fase móvil metanol-agua (78:28, v/v) en acetato amónico (0.05%). El rango de linealidad estudiado estaba comprendido entre 1 y 1000 ng/mL para imatinib y entre 2 y 1000 ng/mL para su metabolito en plasma de mono. El método fue aplicado a muestras de diferentes plasma de monos a los cuales se les había administrado imatinib durante 13 semanas consecutivas.

Además, Bakhtiar y col. (23) propusieron un nuevo método para cuantificar imatinib y su principal metabolito en plasma humano utilizando un sistema semiautomático para precipitar las proteínas de las muestras biológicas con acetonitrilo y realizando posteriormente el análisis de las muestras mediante HPLC acoplado a un detector de masas. Para realizar el análisis utilizaron una columna Shield-RP<sub>8</sub> (50 × 4.6 mm d.i.) y como fase móvil metanol-agua (78:28, v/v) en acetato amónico (0.05%). El rango de linealidad estudiado estaba comprendido entre 4 y 10000 ng/mL de Imatinib y metabolito en plasma humano. El método fue aplicado en muestras reales. Además, este método lo

aplicaron para el análisis de biopsias de tumor gastrointestinal y estudios toxicocinéticos.

Parise y col. (24) desarrollaron un método para cuantificar imatinib y su principal metabolito en plasma mediante HPLC-MS. Las muestras de plasma fueron inicialmente desproteinizadas con acetonitrilo. Para el análisis utilizaron una columna Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (5 mm, 50 × 4.6 mm) en fase reversa y como fase móvil en gradiente ácido fórmico (0.1%) en metanol-agua. El límite de cuantificación para imatinib y su metabolito fue de 30 ng/mL y el rango de linealidad estudiado estaba comprendido entre 30 y 10000 ng/mL para ambos compuestos. El método lo aplicaron para cuantificar estos compuestos en muestras de plasma de un paciente que había sido tratado con 200 mg de imatinib.

### ***1.2.B. Aspectos farmacológicos de la disfunción eréctil***

La impotencia sexual masculina o disfunción eréctil se define como la incapacidad persistente para conseguir o mantener una erección que permita una relación sexual satisfactoria. Debe diferenciarse de otros problemas de la esfera sexual como son la falta de deseo, alteraciones de la eyaculación (eyaculación prematura, eyaculación retrasada, ausencia de eyaculación) o trastornos del orgasmo.

La impotencia es una enfermedad muy frecuente que puede afectar las relaciones de quien la padece con su pareja, con la familia, así como con el entorno laboral y social. La disfunción eréctil es un problema relativamente frecuente del varón y relacionado con la edad, estimándose una prevalencia cercana al 3% en menores de 45 años y del 25% en mayores de 65 años.

Existen una serie de factores de riesgo que pueden favorecer la disfunción eréctil: diabetes mellitus, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, trastornos psiquiátricos, tabaquismo, consumo de alcohol y determinados fármacos, etc.

El pene humano es un órgano vascular, el cual está bajo el control de fibras musculares lisas. La erección es un evento hemodinámico que requiere la integridad de varios mecanismos fisiológicos (neurológicos, vasculares y hormonales). Durante la flaccidez la sangre fluye perfectamente desde las arterias cavernosas, a través de pequeños vasos nutrientes de las trabéculas, hacia las venas emisarias y sale del cuerpo cavernoso. En la erección la sangre fluye desde las arterias cavernosas y arteriolas a través de las arterias helicinas



hacia los sinusoides. Este proceso precisa que las fibras relajadas del músculo liso del cuerpo cavernoso ocluyan el flujo sanguíneo hacia las pequeñas venas emisarias. De este modo la presión intracorporal se modifica desde 5 mm Hg hasta igualar la presión sistólica sistemática, creándose pues en los espacios sinusoidales un sistema cerrado de alta presión.

El último control de la contracción y relajación de la musculatura lisa del cuerpo cavernoso está realizado por la concentración intracelular del ión calcio. Cualquier acción que inhiba la entrada de calcio en la célula a través de sus canales o el flujo intracelular de estos iones o de los receptores asociados al segundo mensajero, impactará directamente en el grado de contracción de la célula muscular lisa del cuerpo cavernoso. Dos factores modifican principalmente el flujo del calcio en estas células:

- ✘ Las alteraciones de los distintos tipos de canales de potasio (cualquier manipulación que induzca la salida del  $K^+$  del interior de la célula provoca una hiperpolarización celular produciendo una entrada intracelular del  $Ca^{2+}$  a través de canales voltaje-dependientes y, consecuentemente, la relajación celular y la erección).
- ✘ La prolongación de la acción de las moléculas que actúan como segundo mensajero (adenosín monofosfato cíclico – AMPc – y guanósín monofosfato cíclico – GMPc –) sobre los niveles intracelulares de calcio en los miofilamentos (25-28).

La excitación de los nervios cavernosos por estímulos centrales o periféricos determinan la dilatación arteriolar, la relajación del músculo liso

intracavernoso y el desencadenamiento del mecanismo venooclusivo. Una alteración en cualquiera de estos pasos puede determinar la disfunción eréctil.

### ***Causas que provocan la disfunción eréctil***

Las causas que provocan una disfunción eréctil pueden ser clasificadas de la siguiente manera:

✓ Causas psicológicas: El pene no tiene ninguna alteración física, pero problemas psicológicos como la ansiedad (provocada con frecuencia por el miedo a no conseguir una erección o a defraudar a la mujer), la depresión o los problemas con la pareja pueden afectar al acto sexual.

También la preocupación excesiva por los problemas laborales, sociales o familiares implican que no se dedique la atención necesaria al acto sexual. La fatiga, la inapetencia, la falta de ejercicio, el insomnio o un fracaso laboral también desequilibran los reflejos sexuales.

✓ Causas vasculares: Son muy habituales, el pene no puede acumular la sangre necesaria para que se dé la erección, debido a un déficit de vascularización producida por trastornos vasculares. Estos trastornos son provocados por diferentes factores entre los que destacan la hipertensión arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia y tabaquismo.

✓ Causas neurológicas: En estos procesos se produce una interrupción en la transferencia de mensajes desde el cerebro al pene porque existe una lesión en las vías implicadas. Esto ocurre en las lesiones y enfermedades neurológicas como, las lesiones de la médula espinal, la esclerosis múltiple o algunas intervenciones quirúrgicas de la pelvis.

✓ Causas hormonales: Son poco frecuentes. Generalmente se deben a un déficit de hormonas sexuales masculinas (testosterona).

✓ Causas farmacológicas: Existen varios fármacos que tienen como efecto secundario la impotencia. Entre ellos están algunos fármacos para tratar enfermedades cardíacas, algunos antihipertensivos y antidepresivos.

### ***Personas que padecen la disfunción eréctil***

La impotencia aparece con mayor frecuencia en hombres de más de 40 años. Entre los 40 y los 70 años, se ha comprobado que 30 de cada 100 hombres sufren algún tipo de impotencia, que puede ser más o menos severa. En su aparición influyen una serie de factores:

- ✗ Tabaquismo.
- ✗ Diabetes mellitus.
- ✗ Hipertensión arterial.
- ✗ Cardiopatías.

- ✗ Hipercolesterolemia.
- ✗ Depresiones.
- ✗ Determinados fármacos (algunos antihipertensivos y antidepresivos).

En ocasiones, la disfunción eréctil o impotencia puede ser el primer síntoma de una enfermedad más importante como la diabetes o cardiopatías, por lo que debe ser estudiada de manera adecuada. En líneas generales es importante diferenciar entre problemas físicos (falta de vascularización, fallo en la retención de sangre en el interior del pene, alteraciones hormonales, afectación de los nervios, etc) y trastornos psicológicos (temor de ejecución, depresión, etc). En la actualidad todas la impotencias tienen solución. A partir del estudio de la causa es posible establecer el mejor tratamiento adaptado a las alteraciones y circunstancias de cada paciente.

La frecuencia y rigidez de las erecciones disminuye con la edad, porque el pene pierde poco a poco la dureza que tenía cuando el hombre era más joven. Muchos hombres mayores de 50 años tienen dificultades para mantener una erección. Es muy importante que la impotencia se considere como un trastorno temporal en la vida sexual. Cualquier hombre, incluso el más fuerte y más viril, sin importar la edad, puede experimentar algún episodio de impotencia.

### ***Diagnóstico de la disfunción eréctil***

El diagnóstico de la disfunción eréctil se hace a partir de la historia clínica y una correcta anamnesis (entrevista con el paciente, recogiendo datos clínicos así como antecedentes personales y familiares). Una entrevista con el afectado puede revelar factores psicológicos involucrados en el trastorno de la erección. También es útil entrevistar a la pareja sexual para determinar dichos factores y obtener determinadas percepciones de la vida sexual desde otro punto de vista.

Tras la anamnesis y exploración física del paciente, se realizan pruebas complementarias necesarias como analítica de sangre y orina para detectar los niveles de glucosa y poder así diagnosticar o descartar una diabetes. También se recomienda medir los niveles de testosterona (hormona sexual masculina), especialmente si la impotencia está asociada a la falta de deseo.

En el caso de pacientes jóvenes con problemas específicos puede ser necesario realizar pruebas más complejas: medición-monitorización del pene durante la noche, inyección de fármacos en el pene o un Doppler.

### ***Tratamiento para la disfunción eréctil***

Muchos médicos sugieren que la elección de los tratamientos contra disfunción eréctil que han de seguirse, deberían ir del menos al más invasivo.

## Capítulo 1

---

Primero, el abandono de drogas; segundo, psicoterapia y modificación de comportamientos; luego, aparatos de vacío o fármacos; y, por último, cirugía.

✓ Ayuda psicológica: Es recomendable en hombres de menos de 40 años, ya que la causa de la enfermedad suele ser mental. Incluso en casos de impotencia por problemas físicos, muchos hombres necesitan ayuda psicológica para poder superar problemas de autoestima derivados de esta enfermedad.

✓ Asesoramiento y tratamiento psiquiátrico: Es aconsejable si el paciente sufre depresiones u otros problemas psicológicos que puedan tener como resultado la impotencia.

✓ Tratamiento hormonal: Cuando la impotencia viene originada por un déficit hormonal. Se administra en forma de parches, píldoras o inyecciones. Es poco frecuente.

✓ Tratamiento farmacológico: La sustancia que lleva por nombre sildenafil, conocida comercialmente como Viagra, actúa potenciando la irrigación sanguínea del pene, facilitando así la erección. Se ha comprobado su efecto positivo en un 40-80% de los hombres. Debe tomarse una hora antes de empezar la actividad sexual y no tiene ningún efecto indeseado sobre el deseo sexual. Sin embargo, puede provocar efectos secundarios, como cefalea, sofocos, trastornos gastrointestinales o visuales. No pueden tomarla hombres que sufran de retinitis pigmentosa o que estén tomando nitratos. En cualquier caso, antes de empezar a tomar esta píldora siempre hay que acudir al médico.

✓ Terapia transuretral: Consiste en la aplicación local de fármacos a través de la uretra, el conducto por el que pasa la orina (es importante orinar inmediatamente después para facilitar la absorción del medicamento). La

erección tarda entre diez y quince minutos en producirse, y el fármaco resulta efectivo en un 43% de los pacientes.

✓ Inyección intracavernosa: Consiste en inyectar una dosis específica de un fármaco directamente en el pene mediante una aguja fina, para activar los procesos físicos que provocan la erección. Debe aplicarse diez o quince minutos antes de mantener relaciones sexuales; la dosis se ajusta para que la erección dure aproximadamente una hora.

✓ Aparatos de vacío: Consisten en un cilindro de plástico que se coloca sobre el pene. Del cilindro se saca aire para realizar el vacío, provocando la entrada de sangre en el miembro para que se produzca la erección. Una anilla constrictora en la base del pene atrapa la sangre y mantiene la erección durante el acto sexual.

✓ Implantes penianos: Actualmente se emplean tres tipos de implantes para el tratamiento de la impotencia o disfunción eréctil: implantes hidráulicos, prótesis e implantes plásticos hinchables; todos ellos requieren intervención quirúrgica. Aunque muchos pacientes se han beneficiado de los implantes quirúrgicos, éste es un procedimiento irreversible ya que, el tejido eréctil se lesiona de forma permanente al implantar estos dispositivos, por lo que ha caído en relativo desuso, a expensas de métodos menos arriesgados y menos costosos.

✓ Cirugía: La cirugía se utiliza en menos de un 1% de los casos de disfunción eréctil. La cirugía venosa es poco efectiva y casi no se usa. Consiste en bloquear la venas que permiten que la sangre abandone el miembro masculino. La cirugía arterial reconstruye arterias para aumentar el flujo y la presión de la sangre dentro del pene. Se practica en pacientes jóvenes que han sufrido un accidente

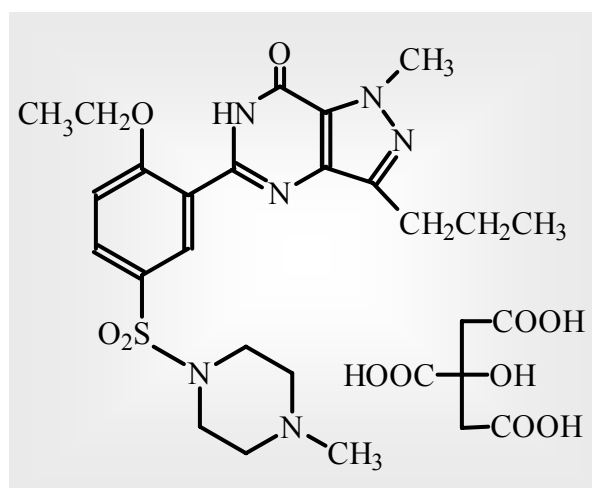
que ha afectado el suministro normal de sangre. También se utiliza para implantar prótesis.

### ***VIAGRA***

Viagra es el nombre comercial de una sustancia llamada citrato de sildenafil (CS), la cual, ayuda a conseguir una erección a hombres que sufren ciertos tipos de impotencia o disfunción eréctil. Es un fármaco que ha constituido una revolución tanto clínica como social tras los primeros estudios presentados hace pocos años.

Citrato de sildenafil se designa químicamente como 1-[[3-(6,7-dihidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidim-5-il)-4-etoxifenil]sulfonil]-4-metilpiperazina citrato y tiene la fórmula estructural siguiente:





*Figura 1.6. Estructura química de citrato de sildenafilo*

El CS es un polvo blanco-cristalino con una solubilidad de 3.5 mg/mL en el agua y un peso molecular de 666.7. Viagra se formula como tabletas recubiertas azules con forma redondeada-diamante de 25 mg, 50 mg y 100 mg de sildenafilo para la administración oral. Además del ingrediente activo, cada tableta contiene los ingredientes siguientes: celulosa microcristalina, fosfato dibásico de calcio anhidro, croscarmellosa de sodio, estereato de magnesio, hidroxipropil metilcelulosa, dióxido de titanio, lactosa, y triacetin.

La dosis media usual para la mayor parte de los paciente es de 50 mg, administrados aproximadamente 1 hora antes de la actividad sexual. En algunos casos puede ser tomada entre 4 y ½ hora antes del acto sexual. Basados en la efectividad y tolerancia la dosis puede ser aumentada hasta un máximo de 100

## Capítulo 1

---

mg o reducida hasta 25 mg según la respuesta individual de cada paciente. La máxima frecuencia recomendada de tomas es de una por día. En pacientes mayores de 65 años o en aquellos con insuficiencia renal severa o con cirrosis es conveniente comenzar con una dosis de 25 mg. Debe ser administrado con precaución en pacientes con malformaciones del pene y aquellos pacientes proclives a presentar trastornos como anemia de células falciformes, mieloma múltiple o leucemia.

Las pastillas de Viagra funcionan aumentando los efectos de una de las sustancias que el organismo normalmente segrega hacia el pene durante el encuentro sexual. Esto permite un aumento del riego sanguíneo hacia el pene.

Como la mayoría de fármacos, produce algunos efectos secundarios que varían según el paciente. Entre los más conocidos figuran el dolor de cabeza, erupciones cutáneas, dolor de estómago, mucosidad nasal y trastornos leves en la visión.

No es recomendable su administración en las personas que toman nitratos porque la combinación puede hacer bajar la tensión. En cuanto a la combinación junto a otros tratamientos contra la disfunción eréctil, no se conoce con seguridad la eficacia que ello representa, por lo que no es una práctica recomendable.

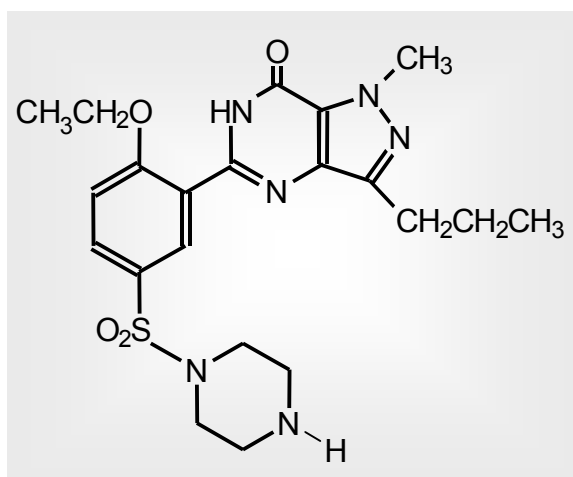
### ***Mecanismo de acción de citrato de sildenafil***

CS es un potente inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa específica tipo 5 (PDE5), el regulador (por degradación) más importante de los niveles de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) en las células musculares lisas del cuerpo cavernoso.

La repuesta del tejido eréctil del pene es mediada por el óxido nítrico (NO) liberado por acción de las neuronas y las células endoteliales del pene durante el estímulo sexual. El NO a través de la activación enzimática de la guanilato-ciclasa, estimula la síntesis que finaliza con la relajación del músculo liso de los cuerpos cavernosos y un mayor ingreso de sangre a los mismos, que inicia el proceso de tumescencia peneana. Esta alcanza su máximo cuando por compresión, se produce la oclusión del retorno venoso. La inhibición de la actividad de la PDE5 por efecto del sildenafil, impide la hidrólisis del GMPc y por consiguiente obtiene una mayor concentración intracelular de este mensajero y una mayor y duradera erección. En los niveles de dosis recomendados, se han observado efectos del sildenafil sólo en presencia de estimulación sexual.

### ***Farmacocinética de citrato de sildenafil***

La absorción de sildenafil es rápida después de su administración oral en ayunas, alcanzándose concentraciones máximas en sangre a los 60 minutos. Sildenafil se distribuye ampliamente en los tejidos. Circula, junto con su metabolito principal N-desmetil sildenafil, UK-103,320, en su mayor parte unido a las proteínas del plasma (>95%). Las concentraciones plasmáticas del metabolito alcanzan al 40% de las alcanzadas del sildenafil. Sólo una ínfima proporción de la dosis administrada (1/10000) aparece en el semen 90 minutos después de la toma. La vida media terminal es de unas 4 horas. Sildenafil es eliminado mediante el sistema microsomal hepático. El N-desmetil sildenafil tiene un perfil de actividad similar al de la droga madre, con una potencia equivalente al 50%. Ambos se excretan predominantemente por las heces y en menor medida por la orina (80% y 13% de la dosis oral, respectivamente).



*Figura 1.7. Estructura química de UK-103,320*

### *Antecedentes bibliográficos de citrato de sildenafil y su principal metabolito*

Citrato de sildenafil (CS) es un inhibidor de última generación selectivo de la fosfodiesterasa tipo 5 que se utiliza para el tratamiento de la disfunción eréctil. Este inhibidor depende del GMP-cíclico y, de forma más específica, inhibe la isoenzima predominante en los cuerpos cavernosos. Así el CS aumenta los niveles de GMP-cíclico por una disminución de su catabolismo, lo que en

presencia del estímulo sexual lleva a que se produzca y se mantenga la erección. Su metabolito principal es el N-desmetil sildenafil (UK-103,320), ambos tienen un perfil de actividad similar y se excretan predominante por las heces y en menos medida en orina. Estos compuestos se pueden determinar cuantitativamente en diferentes matrices, mediante un variado número de métodos, siendo los instrumentales, sin lugar a dudas, los más utilizados y los que mayor interés presentan.

Sin embargo, la dificultad de trabajar en medio biológico debido a las interferencias de la matriz hace que, en muchas ocasiones, haya que recurrir a tratamientos de la muestra previos a la separación propiamente dicha, con el objeto de eliminar interferentes o bien de concentrar los analitos.

Una dificultad añadida es la obtención de los metabolitos. Estos no suelen constar en los catálogos comerciales de los principales fabricantes y es necesario solicitarlos a empresas que trabajan directamente con ellos en investigación. Cuando esto no es posible, hay que recurrir a la síntesis en el laboratorio, lo cual no garantiza la pureza del producto.

Tal vez por estas razones, los trabajos circunscritos a esta área sean poco numerosos. En este sentido, la bibliografía consultada para el análisis de CS y su principal metabolito UK pone de manifiesto que los métodos cromatográficos son los más utilizados, destacando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), aunque también se ha utilizado la cromatografía de gases (CG). Además, se han empleado con el fin de determinar estos compuestos técnicas electroforéticas y electroquímicas.

**a) Análisis de citrato de sildenafil en fármacos**

La determinación de CS por métodos voltamperométricos de redisolución adsorptiva en formulaciones farmacéuticas ha sido descrita por Berzas y col. (29). Este compuesto se reduce sobre el electrodo de mercurio a un potencial de  $-1.03$  V cuando se encuentra a un pH de 2.0. El potencial de acumulación aplicado fue de  $-0.80$  V y se realizó para dos tiempos de acumulación, 0 y 10 s. El rango de linealidad estudiado para tiempo de acumulación 10 s estaba comprendido entre  $5.0 \times 10^{-9}$  y  $1.0 \times 10^{-7}$  M. El método propuesto fue aplicado para determinar CS en tres formulaciones farmacéuticas (Viagra 25, Viagra 50 y Viagra 100) encontrándose valores de recuperación muy cercanos a 100%.

En 2000, Liu y col. (30) propusieron la determinación de CS en pastillas de Viagra por HPLC en fase reversa. El análisis se realizó tomando 20 pastillas (Viagra 25 mg), las cuales fueron molidas, para posteriormente tomar una porción equivalente de 20 mg de CS y disolverlo en 100 mL de  $\text{HClO}_4$  0.1M. Porciones de 20  $\mu\text{L}$  de esta disolución fueron analizadas utilizando el método cromatográfico propuesto. Para ello utilizaron una columna de gel de sílice y una fase móvil compuesta por  $\text{H}_3\text{PO}_4$ (pH3.5):metanol:acetonitrilo (45:33:22) con 0.05M de trietilamina. La detección se lleva a cabo midiendo la absorbancia a 291 nm. Los valores de recuperación encontrados fueron de 100.6%.

La determinación de CS en pastillas de Viagra (50 mg) por FIA utilizando la detección UV fue realizada por Altiokka y col. (31) y ha permitido proponer un método de análisis de gran sensibilidad.

CS también ha sido determinado por un método espectrofotométrico basado en la formación de un par iónico con azul de bromotimol, verde de bromocresol o azul de bromofenol en un medio de hidrógenofalato de potasio/HCl (32). Posteriormente se realizó una extracción con  $\text{CHCl}_3$  del par iónico formado para realizar una detección espectrofotométrica a una longitud de onda de 420 nm. La ley de Beer se cumple en el rango comprendido entre 2.5 y 12.5 mg/L. Las recuperaciones encontradas estaban en torno al 100%.

Tseng y Lin (33) propusieron un método de determinación de CS en cápsulas, las cuales se utilizaban como suplemento dietético. En primer lugar realizaban una extracción de CS con metanol, el extracto sería analizado mediante HPLC. Para ello se utilizó una columna Cosmosil 5C18-AR (15 cm × 4.6 mm d.i.) y una fase móvil compuesta por acetonitrilo /metanol/1% ácido acético (17:25:58). El equipo de HPLC estaba conectado a un detector de masas. El rango de linealidad estudiado estaba comprendido entre 1.76 y 17.6 mg/mL. Los valores de recuperación encontrados estaban en torno al 99%.

Berzas y col. (34) propusieron un método por cromatografía de gases con detección de ionización en llama (FID) para determinar CS en formulaciones farmacéuticas (Viagra 25, 50 y 100 mg) utilizando como patrón interno UK,103-320 (metabolito principal de CS) para cuantificar. Además realizaron un estudio de robustez del método propuesto utilizando para ello el modelo factorial de Plackett-Burman.

Dinesh y col. (35) propusieron un método de determinación de CS en muestras farmacéuticas por HPLC en fase reversa con detección UV. Para ello utilizaron una columna LiChrospher C18-5 (25 × 0.46 cm) y como fase móvil



agua/acetonitrilo (48:52). El rango de linealidad estudiado estaba comprendido entre 0.05 y 7.5 mg/mL.

Los productos de degradación son aquellos que se forman a partir de los productos principales debido a reacciones químicas. Las causas de la aparición de productos de degradación pueden ser múltiples:

- ✘ Envejecimiento de los productos principales.
- ✘ Conservación en ambientes húmedos o no protegidos de la luz.
- ✘ Hidrólisis de los productos principales.
- ✘ Reacciones químicas entre varios de los productos principales.
- ✘ Alteración de las condiciones de conservación, especialmente temperatura y pH.
- ✘ Acción bacteriana.

La alteración de alguno de estos factores o de la combinación de varios de ellos hace que aparezcan estos subproductos en los fármacos. Así en 2001, Draghmen y col. (36) utilizan la cromatografía líquida de alta resolución para proponer un método de separación de CS, productos de degradación y/o impurezas generadas en el proceso de síntesis del principio activo. Para este estudio se utilizó una columna Bondapak C<sub>18</sub> (30 cm × 3.9 mm d.i.), una fase móvil compuesta por 0.2 M acetato amónico (pH 7.0):acetonitrilo (1:1, v/v) y la detección se realizó a 240 nm. En estas condiciones consiguieron una buena resolución entre el compuesto de interés y los demás productos, además de obtener aceptables valores de recuperación. Desgraciadamente no indicaron cuales son esos posibles productos de degradación y/o impurezas.

### **b) Análisis de citrato de sildenafil en fluidos biológicos**

Bhoir y col. (37) determinaron CS en plasma humano mediante HPLC en fase reversa con detección UV. Inicialmente el plasma fue tratado con NaOH 1 M y posteriormente se realizó una extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El extracto obtenido se llevó a sequedad y el residuo obtenido se redisolvió en un volumen conocido de fase móvil. Porciones de esta disolución fueron las analizadas por HPLC, para ello se utilizó una columna 5 micro m Inertsil-ODS-3 (25 cm × 4.6 mm d.i.) y como fase móvil metanol/ácido fosfórico (pH 5.2, ajustado con trietilamina) (7:3). El rango de linealidad estudiado estaba comprendido entre 25 y 1000 ng/mL de CS y el límite de detección fue de 10 ng/mL. Este trabajo serviría para realizar estudios sobre farmacocinéticas y bioequivalencias.

Lalla y col. (38) propusieron un método para la determinación de CS en plasma humano utilizando para ello un sistema automatizado de diálisis (ASTED, Automated Sequential Trace enrichment of dialysates) conectado a un equipo de HPLC. El sistema automatizado de diálisis permitiría realizar un enriquecimiento de las muestras de plasma humano con el fin de realizar una preconcentración del analito en estudio para posteriormente analizarlo mediante HPLC con detección UV. El rango de linealidad estudiado estaba comprendido entre 12 y 500 ng/mL.

Tarcqui y col. (39) propusieron la determinación de CS en fluidos biológicos y más concretamente en secreciones salivales mediante HPLC acoplado a un detector de masas. Inicialmente realizaron una extracción líquido-líquido utilizando cloroformo/2-propanol/n-heptano (25:10:65, v/v/v). La

fase orgánica se llevó a sequedad y el residuo se redisolvió en 25 mL de metanol, de esta disolución se tomaron 2 mL y se analizaron mediante HPLC. Para ello se utilizó una columna NovaPak C<sub>18</sub> y la separación se realizó en modo de gradiente utilizando para ello acetonitrilo/CH<sub>3</sub>COOH (pH 3.0). La detección se realizó utilizando un analizador de masas de cuadrupolo simple en el modo de ionización positivo. Los límites de detección y cuantificación fueron 0.2 y 0.5 ng/mL, respectivamente. El método propuesto es específico, extremadamente sensible y relativamente simple tanto en preparación de muestras como en equipamiento. Como ejemplo en el trabajo muestran los resultados encontrados en un análisis realizado en las muestras de secreción salival recogidas de un voluntario de 38 años que había tomado una pastilla de 25 mg. Las muestras fueron recogidas en diferentes intervalos de tiempo, así después de media hora de la ingesta la concentración de CS encontrada fue de 1.2 ng/mL y al cabo de 1.5 horas fue de 8.3 ng/mL. Sin embargo, en análisis realizados posteriormente se vio que la concentración de CS disminuía con el tiempo hasta un valor de 0.9 ng/mL al cabo de cinco horas y media.

### **c) *Análisis de citrato de sildenafilo y su principal metabolito, UK-103,320***

Un aspecto fundamental en la determinación de CS en medio biológico es que éste puede sufrir reacciones en el interior de los organismos vivos para dar lugar a otros compuestos similares denominados metabolitos.

La reacción metabólica más frecuente en el campo que nos ocupa es la desmetilación de este compuesto. Así, para el análisis en medio biológico hay que tener en cuenta que podemos encontrar el principio activo sin modificar coexistiendo con su correspondiente metabolito, UK-103,320.

Cooper y col. (40) desarrollaron un método de análisis para determinar CS y UK en plasma humano. Para ello utilizaron un sistema automático de diálisis que estaba acoplado a un equipo de HPLC. El sistema de diálisis permitía un enriquecimiento con respecto a CS y UK en las muestras, es decir, realizaba una preconcentración de los analitos de interés en la muestra. Una vez realizado este proceso, la muestra era inyectada en un equipo de HPLC con el fin de proceder al análisis. Para ello utilizaron una columna modelo 5 micro m Kromasil C<sub>4</sub> (10 cm × 4.6 mm d.i.) y como fase móvil acetonitrilo /tampón fosfato (pH 4.5)/H<sub>2</sub>O (7:1:17, v/v/v). La detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 230 nm. El rango de linealidad estudiado estaba comprendido entre 1.0 y 25.0 ng/mL de CS y UK. El método propuesto lo aplicaron para realizar estudios de farmacocinética en diferentes tipos de muestras.

Jeong y col. (41) proponen un método por HPLC para la determinación de CS y su principal metabolito en plasma utilizando previamente una columna estrecha (3.5cm × 2 mm d.i.) para el enriquecimiento y limpieza de la muestra. Posteriormente los compuestos de interés fueron separados en una segunda columna (fenil-hexil, 10 cm × 2 mm d.i.), para ello utilizaron como fase móvil acetonitrilo-tampón fosfato de pH 4.5 (9:16). El límite de detección fue de 10 ng/mL.

Saisho y col. (42) propusieron un método para determinar CS y UK en pelo de rata y en pelo de humanos utilizando una extracción sólido-líquido. Así, los

compuestos de interés fueron extraídos de una muestra de pelo de pacientes que habían tomado una dosis de 50 mg de Viagra. La separación de los compuestos se realizó mediante cromatografía de gases, para ello utilizaron una columna DB-MS (0.25 mm, 15 m × 0.25 mm d.i). La detección se llevó a cabo utilizando un detector de masas. Los límites de detección encontrados fueron de 0.05 y 0.20 ppm, de CS y UK, respectivamente.

Eerkes y col. (43) desarrollaron un método para determinar CS y UK en suero humano. La determinación se realizó mediante HPLC acoplado a un detector de masas con una columna de sílice. Los límites de detección y cuantificación encontrados estaban por debajo de 1 ng/mL para ambos compuestos.

Recientemente, Kim y col. (44) han propuesto un método por HPLC acoplado a un detector de masas para la determinación de CS y UK en plasma humano. Anteriormente al análisis realizaron una extracción de los compuestos de interés con diclorometano en medio básico. La separación de los compuestos se realizó por HPLC en fase reversa con una columna Luna fenilhexil y como fase móvil acetonitrilo/formato amonio (pH 6.0) (60:40). El método propuesto mostraba una precisión, selectividad y sensibilidad satisfactorias.

### ***1.2.C. Aspectos farmacológicos del aborto***

El aborto es un tema de real controversia social que se centra en dos puntos de vista al parecer irreconocibles. Por una parte, el derecho de la mujer de poder decidir sobre ella misma y, por otra parte, el concepto de aborto como un asesinato al haber presencia de vida. Además de todo esto, está el hecho de manejar atenuantes como el de los embarazos no deseados o las violaciones.

La medicina entiende por aborto toda interrupción del embarazo, natural o provocado, desde su inicio hasta la semana 20 de gestación. A partir de la semana 21 se le llama parto pretérmino.

Por tanto, un aborto es la terminación de un embarazo. Se le define como la pérdida del embarazo, clínicamente reconocida antes de las 20 semanas de gestación. Existen dos clases de aborto:

✓ **Aborto espontáneo o involuntario:** se produce o bien porque surge la muerte intrauterinamente o bien porque causas diversas motivan la expulsión del nuevo ser al exterior, donde fallece dada su falta de capacidad para vivir fuera del vientre de la madre.

Se calcula que el 25% de todos los embarazos humanos finalizan en aborto espontáneo y tres cuartas partes de los abortos suceden en los tres primeros meses de embarazo. Algunas mujeres tienen cierta predisposición a tener abortos y con cada aborto sucesivo disminuyen las posibilidades de que el embarazo llegue a término.

Las causas del aborto espontáneo no se conocen con exactitud. En la mitad de los casos hay alteración del desarrollo del embrión o del tejido placentario, que puede ser consecuencia de trastornos de las propias células germinales o de una alteración de la implantación del óvulo en desarrollo. También puede ser consecuencia de alteraciones en el entorno materno. Se sabe que algunas carencias vitamínicas graves pueden ser causa de abortos. Otros abortos espontáneos pueden ser consecuencia de situaciones maternas anormales, como enfermedades infecciosas agudas, enfermedades sistémicas como nefritis, diabetes o traumatismos graves. Las malformaciones y los tumores uterinos también pueden ser la causa; la ansiedad extrema y otras alteraciones psíquicas pueden contribuir a la expulsión prematura del feto.

En un aborto espontáneo, el contenido del útero puede ser expulsado del todo o en parte; sin embargo, en ocasiones, el embrión muerto puede permanecer en el interior del útero durante semanas o meses: es el llamado aborto diferido. La mayor parte de los médicos recomiendan la excisión quirúrgica de todo resto embrionario o placentario para eliminar las posibilidades de infección o irritación de la mucosa uterina.

✓ **Aborto inducido o voluntario:** es la interrupción deliberada del embarazo mediante la extracción del feto de la cavidad uterina. En función del periodo de gestación en el que se realiza, se emplea una u otra de las cuatro intervenciones quirúrgicas siguientes:

- Succión o aspiración: puede ser realizada durante el primer trimestre (hasta la duodécima semana).

- Uso de dilatadores sucesivos: con ello se consigue el acceso a la cavidad uterina a través del cérvix (cuello del útero), se introduce un tubo flexible conectado a una bomba de vacío denominado cánula para extraer el contenido uterino. A continuación se introduce una legra (instrumento metálico en forma de cuchara) para eliminar por raspado cualquier resto de la pared uterina.
- Realización de infusiones salinas: en esta técnica se utiliza una aguja hipodérmica o un tubo fino para extraer una pequeña cantidad de líquido amniótico del útero a través de la pared abdominal. Este líquido es sustituido lentamente por una solución salina concentrada al 20%. Entre 24 y 48 horas empiezan a producirse contracciones uterinas, que producen la expulsión del feto.
- Laparotomía: se trata de una intervención quirúrgica mayor que las anteriores, similar a la cesárea, pero realizada a través de una incisión de menor tamaño en la parte baja del abdomen.

Como alternativa a estos procedimientos, existe una píldora denominada Mifegine, cuyo principio activo se denomina Mifepristone (RU-486) que bloquea la hormona progesterona y es eficaz en los primeros 50 días de gestación. Mifepristone se desarrolló en Francia y en 1988 se legalizó su uso. A continuación pasaremos a comentar la características de este fármaco, objeto a estudio de esta Memoria.



## ***MIFEPRISTONE***

Mifepristone es el nombre genérico de un medicamento (también conocido como RU-486) capaz de interrumpir un embarazo confirmado en sus primeras etapas. Mifepristone bloquea la acción de la progesterona, hormona esencial para mantener un embarazo. Este medicamento es utilizado en combinación con otro, una prostaglandina llamada misoprostol, la cual causa contracciones del útero, ayudando así a la expulsión del huevo implantado. Se trata de un procedimiento similar al de un aborto espontáneo o natural.

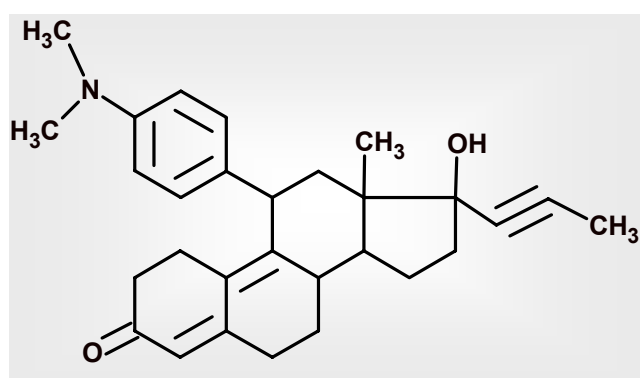
Las mujeres que se han sometido al aborto farmacéutico encuentran este método bastante aceptable. Describen esta opción no quirúrgica como algo más natural, no invasivo y que pueden controlar ellas mismas. Algunas lo consideran una opción más privada. Con el régimen de mifepristone-misoprostol no se busca sustituir al aborto quirúrgico, sino ofrecer una opción más a las mujeres para interrumpir un embarazo en sus primeras etapas. El aborto farmacéutico se debe ofrecer con toda la información posible acerca de este proceso, así como la opción del aborto quirúrgico cuando esté disponible.

En Estados Unidos y varios países de Europa (Francia, Suecia y Gran Bretaña), mifepristone ha sido autorizado para su uso hasta las siete semanas de gestación y en algunos otros países hasta los 63 días de gestación.

Además de su uso abortivo, mifepristone se utiliza en el tratamiento del embarazo (dilatación e inducción de parto); desordenes o enfermedades ginecológicas (endometriosis o fibromas uterinos), así como otros problemas médicos (cáncer de mama, meningioma benigno, síndrome de Cushing y

glaucoma). Este medicamento también se ha probado como anticonceptivo o post-coital, pero aquí su uso es diferente al abortivo.

La molécula Mifepristone es un antagonista de la progesterona, derivado 19-noresteroídico sintético, cuyo nombre químico es (11B, 17B)-11-[(4-dimetilamino)fenil]-17-hidroxi-17-(1-propinil)-estra-4,9-dien-3-ona. (Figura 1.8).



*Figura 1.8. Estructura química de Mifepristone*

Mifepristone se presenta en forma de comprimidos conteniendo cada uno 200 mg de ingrediente activo, el cual permanece estable después de 3 años a temperatura ambiente. Entre los excipientes están: sílice anhidro coloidal, almidón de maíz, povidona excipiente, celulosa microcristalina y estereato magnésico.

La pastilla abortiva tiene que ser suministrada y supervisada por un médico. La Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos estableció el siguiente protocolo:

1. Primera visita médica: examen ginecológico, confirmación y determinación del tiempo de embarazo. Se suministra la dosis de 3 pastillas de 200 mg cada una.
2. Segunda visita 48 horas después: se administrará el misoprostol.
3. Tercera visita 12 días después: examen ginecológico para certificar la terminación del embarazo.

Mifepristone se administra en forma oral. La disponibilidad de mifepristone después de 200 mg es de un 69%. El nivel plasmático se alcanza entre las 2-3 horas después de la administración. La unión a proteínas es aproximadamente 98%, principalmente a glicoproteína alfa-1-ácida. Mifepristone atraviesa rápidamente la placenta. La vida media de mifepristone es de aproximadamente 20 horas debido a su alto porcentaje de unión a proteínas plasmáticas y a la circulación entero-hepático. Tras la administración de 600 mg de mifepristone, la eliminación es satisfactoria, siendo el 10% eliminado por orina y el 90% por las heces.

### ***Antecedentes bibliográficos de Mifepristone***

Mifepristone es una droga de reciente lanzamiento por lo que se han encontrado pocas referencias que hayan abordado su estudio tanto en muestras biológicas como en formulaciones farmacéuticas.

Ye y col. (45) determinaron mifepristone en plasma humano por HPLC. Antes de realizar el análisis del compuesto fue necesario realizar una extracción con éter en la muestra de plasma. El extracto fue llevado a sequedad y regenerado en un volumen conocido de fase móvil. Para llevar a cabo el análisis mediante HPLC utilizaron una columna ODS-YWG (10  $\mu$ m, 20 cm  $\times$  5 mm d.i.) y como fase móvil metanol-agua (80:20). La detección fue realizada a 320 nm. El rango de linealidad estudiado estaba comprendido entre 0.06 y 1.20  $\mu$ g/mL. Las recuperaciones encontradas estaban próximas al 100 %.

Por otro lado, Wu y col. (46) también propusieron la determinación de mifepristone mediante HPLC utilizando para ello una columna (25 cm  $\times$  4.5 mm d.i.) y como fase móvil acetonitrilo 75%. Estos autores también llevaron a cabo la determinación de mifepristone en disolventes residuales, que habían quedado después de la síntesis de este fármaco, mediante cromatografía de gases. (47)

Otro de los trabajos realizados en HPLC, es la determinación de mifepristone y sus metabolitos en plasma humano (48). En este caso utilizaron una columna ODS/YWG y como fase móvil metanol-acetonitrilo-agua (21:14:15). La detección fue realizada a una longitud de onda de 302 nm.

Zeng y col. (49) realizaron un estudio del comportamiento voltamperométrico adsorptivo del mifepristone. Para ello, las muestras del compuesto fueron preparadas en tampón Britton-Robinson de pH 7.0. Para la realización de este trabajo utilizaron como electrodo de trabajo el de gotas de mercurio (0.017 cm<sup>2</sup> de área), electrodo de referencia SCE, un tiempo de acumulación de 30 s y 100 mV/s como velocidad de barrido. El potencial de reducción para mifepristone fue de -1.23 V. El rango de linealidad estudiado estaba comprendido entre 40 nM y 3 µM de Mifepristone. Además de este método, realizaron estudios de oscilopolarografía del mifepristone (50). En este caso, también prepararon las muestras en tampón Britton-Robinson de pH 7.0. Los polarogramas fueron registrados desde un potencial inicial de -1.04 V. En estas condiciones el máximo estaba a un potencial de -1.71 V. El rango de linealidad estudiado estaba comprendido entre 40 nM y 1 µM de mifepristone.

Gao y col. (51) realizaron la determinación de mifepristone en muestras de plasma de mujeres parturientas o de parto reciente y de sus recién nacidos, cuyo parto había sido inducido con la administración de este compuesto. En este estudio muestras de 1 mL de plasma fueron agitadas con 5 mL de hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7:4) y posteriormente centrifugadas. La solución sobrenadante se evaporó y el residuo obtenido se disolvió en 100 µL de metanol. Para realizar la determinación de este compuesto por HPLC se utilizó una columna OUYA-RP18 (15 cm × 4.6 mm d.i.) y como fase móvil metanol/H<sub>2</sub>O/acetonitrilo (42:30:28, pH 7.0). La detección se realizó a 302 nm. Los valores de recuperación encontrados estaban próximos al 100%. El método propuesto puede recomendarse para el control de mifepristone en plasma tanto de la madre como del recién nacido.

Gu y col. (52) propusieron un método para la determinación voltamperométrica de mifepristone en un electrodo de pasta de carbono que había sido modificado con la adición de ácido desoxirribonucleico (ADN). Pudieron comprobar que la respuesta anódica era sensiblemente mayor cuando utilizaron este electrodo modificado con respecto a un electrodo de carbono normal. Por tanto, propusieron este tipo de electrodo como un biosensor para la detección de mifepristone. El límite de detección fue de  $0.1 \mu\text{M}$  y el rango de linealidad estudiado estaba comprendido entre  $0.2$  y  $2.0 \mu\text{M}$  de mifepristone. Este método fue aplicado a la determinación de este compuesto en pastillas, encontrándose resultados satisfactorios. Otras posibles modificaciones de electrodos de oro y estaño con ADN han sido propuestas para la determinación de mifepristone. (53)

Zhao y col. (54) propusieron un método de determinación de mifepristone en plasma de perros y su biodisponibilidad mediante HPLC. Inicialmente  $5 \text{ mL}$  de sangre fue centrifugada, tomaron  $1 \text{ mL}$  del sobrenadante y realizaron una extracción con  $5 \text{ mL}$  de etil éter. La fase orgánica fue evaporada y el residuo que se obtuvo fue disuelto en  $0.5 \text{ mL}$  de metanol. Posteriormente, porciones de  $20 \mu\text{L}$  de esta solución fueron analizadas. Para el análisis utilizaron una columna SMI-Pack CLC-ODS ( $15 \text{ cm} \times 6 \text{ mm d.i.}$ ) y como fase móvil metanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (39:11). La detección fue realizada a  $302 \text{ nm}$ . El rango de linealidad estudiado estaba comprendido entre  $50$  y  $2000 \text{ ng/mL}$  de Mifepristone. Las recuperaciones encontradas estaban próximas al  $100\%$ .

Stith y col. (55) desarrollaron un método para determinar los niveles de mifepristone en muestras de suero de un coyote. En este caso mifepristone lo utilizaban como un agente anticonceptivo para el control no-letal de

depredadores. Inicialmente realizaron una extracción en fase sólida (C<sub>18</sub>) de las muestras de suero. Para el análisis de las mismas utilizaron una columna C<sub>18</sub> (150 × 4.6 mm d.i.) y como fase móvil acetonitrilo (55%) en agua. La detección fue realizada a 305 nm. El rango de linealidad estudiado estaba comprendido entre 10 y 1000 ng/mL.

### 1.3. Aspectos teóricos de las técnicas utilizadas

---



### ***1.3.A. Electroforesis Capilar***

La electroforesis capilar (EC) es una técnica relativamente nueva para la separación y análisis de compuestos químicos que está siendo utilizada cada vez más por analistas de los campos de la química analítica y bioquímica. Una revisión de los artículos publicados en los últimos años sobre la misma, muestra un crecimiento exponencial en el número de artículos existentes, lo que refleja la expansión y aceptación de la técnica.

La EC complementa otras técnicas de separación, como son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases (CG) y la electroforesis en gel (EG). Algunos de los métodos usados en HPLC y EG serán adaptados a EC debido a sus ventajas, entre las que se incluyen la alta eficiencia y las rápidas separaciones, las columnas baratas y la larga vida, la pequeña cantidad de muestra requerida y el bajo consumo de reactivos.

Además, la EC puede ser aplicada para la separación de una gran variedad de muestras como son compuestos polares iónicos, polares no iónicos, así como compuestos apolares y no iónicos. También se puede aplicar al análisis de biomoléculas de altos pesos moleculares.

La mayoría de los artículos iniciales trataron los aspectos teóricos de los principios de la EC. En la actualidad la EC es considerada como una técnica exacta, precisa y un método independiente de análisis y es utilizada de forma rutinaria en la industria, universidad y en laboratorios gubernamentales.

Sin embargo, al ser una técnica de reciente implantación, no existen demasiados libros publicados sobre ella si la comparamos con los escritos en HPLC.

### ***Definición de electroforesis y principios generales de la técnica***

La electroforesis ha sido definida como el movimiento diferencial de especies cargadas eléctricamente en un medio líquido conductivo, normalmente acuoso, bajo la influencia de un campo eléctrico, es decir, es un proceso en el que las especies cargadas se separan en función de su distinta velocidad de migración en un campo eléctrico (56-57). Las moléculas cargadas se mueven hacia el electrodo de signo contrario con una velocidad que depende del campo eléctrico, la viscosidad del medio, la carga eléctrica neta de la molécula y el tamaño de la misma.

La descripción de los principios de la electroforesis se remontan al siglo pasado, cuando Kohlrausch (58) obtuvo las ecuaciones básicas de la migración de un ión en disolución de electrolito en 1897.

Fue introducida como técnica de separación por Tiselius en 1937 (59), cuando situó una muestra de proteínas entre dos disoluciones tampón en un tubo y, aplicando posteriormente un campo eléctrico, encontró que los componentes de la muestra migraban en una dirección a una velocidad que dependía de la magnitud y del signo de sus cargas y de sus respectivas

movilidades. Gracias a este trabajo, Tiselius recibió el premio Nobel. Este autor llevó a cabo su experimento en una disolución libre, lo cual limitaba mucho la eficiencia de la separación, debido fundamentalmente a la difusión térmica y a la convección. Con el fin de suprimir la convección producida por efecto Joule, la electroforesis se empezó a realizar en medios anticonvectivos, como papeles y geles de poliacrilamida y agarosa. Desde entonces la EG ha sido una técnica ampliamente utilizada para la separación de macromoléculas biológicas, tales como proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, la EG generalmente presenta problemas derivados de bajas eficiencias, altos tiempos de análisis, dificultades en la automatización y detección. Además de ser muy laboriosa, el consumo de reactivos y de tiempo es elevado e incluso pueden darse interacciones entre la muestra y la matriz del gel que pueden afectar a la separación.

Debido a estos problemas, se hicieron algunos intentos para llevar a cabo la electroforesis en disolución libre sin la necesidad de un medio estabilizante que eliminara la convección. Una alternativa fue la utilización de tubos finos o capilares. Así Hjerten, en 1967, llevó a cabo la primera separación electroforética utilizando un tubo abierto de cristal de cuarzo de un diámetro interno de 1-3 mm y recubierto internamente con metilcelulosa para prevenir la electroósmosis (60). La convección fue reducida haciendo rotar el tubo alrededor de su eje longitudinal. La detección fue realizada con un detector UV que registraba a lo largo del tubo. Esta técnica de electroforesis en zonas libres fue aplicada a una gran variedad de muestras entre las que se incluyen proteínas, ácidos nucleicos o incluso virus.

Posteriormente, a mediados de 1970, Everaerts y colaboradores (61) desarrollaron la isotacoforesis capilar en tubos abiertos de diámetro

submilimétrico basándose en lo que se ha venido a llamar efecto *anticonvectivo de la pared* que se ocasiona como consecuencia de la alta capacidad de disipación de calor que se obtiene en los tubos de pequeño diámetro interno debido a la alta proporción entre la superficie de disipación y el diámetro interno del capilar. Además, estos autores usaron tubos de teflón en lugar de tubos de vidrio, lo cual tenía como ventaja la eliminación del fenómeno de electroósmosis, que podía perturbar la separación por isotacoforesis capilar. A partir de aquel momento se han venido fabricando equipos instrumentales para esta técnica, sin embargo el interés por la misma ha sido escaso en comparación con otras.

En 1974, Virtanen (62) llevó a cabo experiencias por electroforesis en zona utilizando tubos de vidrio de 200-500  $\mu\text{m}$  de diámetro interno utilizando detección potenciométrica. Algunos años después, Milkers, Everaerts y Verhgeen (63) realizaron separaciones por electroforesis capilar en zona (ECZ) utilizando tubos de teflón de un diámetro interno de 200  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y un detector conductimétrico. Con este montaje consiguieron separar y detectar 16 pequeños iones en 10 minutos.

Los estudios anteriores demuestran que los principios generales de la electroforesis capilar en zona son conocidos hace mucho tiempo. Pero hasta la década de los 80 los dos principales problemas quedaban sin resolver; por un lado, la baja sensibilidad de los sistemas de detección y, por otro, el fenómeno de electroósmosis.

En el año 1981, Jorgenson y Luckacs describieron separaciones utilizando por primera vez un tubo capilar de diámetro menor que 100  $\mu\text{m}$  como celda electroforética (64). Esto les permitió realizar separaciones usando los mismos

principios que la electroforesis convencional, pero con mayor rapidez y eficiencia (65). En lugar de intentar suprimir el fenómeno de la electroósmosis usando capilares eléctricamente inertes, aprovecharon este fenómeno que se genera en capilares de pequeño diámetro interno para mover los analitos a lo largo del capilar con mucha menor dispersión de la que se observa en cromatografía líquida. Además describieron las relaciones existentes entre los parámetros operacionales y la calidad de la separación demostrando el potencial de la técnica. Desde ese momento tan solo transcurrieron ocho años hasta la aparición del primer instrumento comercial de electroforesis capilar y, de entonces acá, se ha desarrollado exponencialmente el uso de esta técnica. Este hecho queda reflejado en la gran cantidad de monografías sobre EC (66-70) y en el número de publicaciones en revistas científicas que utilizan esta técnica como principio de separación (71-74) que supera los 6000 (Analytical Abstracts, 1980-2004). En los siguientes años se llevaron a cabo algunas innovaciones en cuanto a los sistemas de detección y al desarrollo de algunas subtécnicas de la electroforesis capilar en zona que la han conducido a ser una poderosa técnica de separación especialmente para compuestos biológicos y farmacológicos.

## *Teoría de la Electroforesis*

### **- Aspectos teóricos de la electroforesis capilar**

La separación por EC se basa en la diferencia de velocidad de los solutos en el seno de un campo eléctrico. Para comenzar vamos a considerar la migración de un compuesto cargado en el seno de una disolución de electrolito a dilución infinita, donde no tengan lugar interacciones iónicas.

Si aplicamos un campo eléctrico homogéneo, el compuesto cargado  $i$  es acelerado por una fuerza ( $F_e$ ) proporcional al campo eléctrico aplicado ( $E$ )

$$F_e = q_i E$$

Debido a que el ión se encuentra en un medio acuoso, que tiene una viscosidad ( $\eta$ ), la fuerza de rozamiento ( $F_r$ ) que se opone a su movimiento dependerá de una constante ( $k$ ), de la viscosidad del medio ( $\eta$ ) y de la velocidad de migración del ión en el medio ( $v_i$ ).

$$F_r = k \eta v_i$$

De acuerdo con la ley de Stokes la constante  $k$  puede ser sustituida por  $6\pi r$  para una partícula esférica. Para partículas no esféricas y pequeños iones, el valor numérico es inferior a 6.

$$F_r = 6 \pi r_i \eta v_i$$

donde  $r_i$  es el radio del ión solvatado o, en este caso, hidratado.

Si la aceleración causada por la fuerza eléctrica ( $F_e$ ) es compensada por la fuerza de rozamiento se alcanzará un estado de equilibrio en el que las fuerzas serán iguales y de sentido contrario y el ión se moverá con una velocidad constante  $v_i$ .

$$F_r = F_e$$

$$v_i = \frac{q}{6\pi r_i \eta} E$$

De acuerdo a la ecuación anterior, la velocidad de migración del ión es directamente proporcional al campo eléctrico aplicado. A este factor de proporcionalidad se le denomina movilidad electroforética absoluta del ión ( $\mu_e$ ) que se puede expresar como:

$$\mu_e = \frac{v_i}{E} = \frac{\frac{qE}{6\pi r_i \eta}}{E} = \frac{q}{6\pi r_i \eta}$$

Es decir, que para un determinado ión, la movilidad electroforética absoluta sólo depende de la viscosidad del medio. Hemos de destacar que

tanto la velocidad como la movilidad electroforéticas pueden ser positivas o negativas dependiendo del signo de la carga del ión. De esta ecuación se deduce que pequeñas partículas altamente cargadas, tienen altas movilidades electroforéticas y viceversa.

En la práctica se trabaja en presencia de otras especies en la disolución de electrolito. Las interacciones electrostáticas a las que se ve sometido un ión en la disolución de electrolito afectan a la movilidad electroforética de dicho ión. Estos iones en disolución se rodean de contraiones de carga opuesta, que crean una atmósfera iónica. Para considerar estos efectos sobre la movilidad, se cambia la carga teórica del ión por una carga efectiva (menor) del ión y el radio hidrodinámico del ión por el radio efectivo del mismo, incluyendo su atmósfera de contraiones. Así, obtenemos una movilidad efectiva que depende no sólo de la viscosidad del medio sino también de las interacciones iónicas que ocurren en disolución.

Como consecuencia, la movilidad efectiva será siempre inferior a la movilidad absoluta calculada anteriormente.

Para determinar la movilidad electroforética es necesario conocer el tiempo que tarda la molécula desde que es introducida en el capilar hasta su llegada al detector. A este tiempo se le llama tiempo de migración y depende directamente de la longitud del capilar e inversamente de la movilidad electroforética y del campo eléctrico aplicado. Si sólo se considerase la movilidad electroforética, no se explicaría completamente el comportamiento migratorio dentro del capilar, ya que dicho comportamiento depende también del flujo electroosmótico (75-77).



**- El fenómeno de electroforesis y el flujo electroosmótico.**

El flujo electroosmótico (FEO) o electroósmosis es un fenómeno básico en todas las separaciones y se produce al aplicar un voltaje a un sistema líquido que está en contacto con una superficie cargada.

En condiciones acuosas, la mayoría de las superficies poseen un exceso de cargas negativas que pueden proceder de la ionización de la superficie debido a equilibrios ácido-base y de la adsorción de especies iónicas en la superficie.

Generalmente, los capilares se fabrican de sílice fundida, si bien, materiales no iónicos, como el teflón, también exhiben flujo electroosmótico, que resulta probablemente de la adsorción de aniones sobre la superficie.

Cuando la sílice está en contacto con una disolución acuosa, su superficie se hidroliza para dar lugar a grupos silanol. Estos grupos pueden estar cargados positivamente como  $\text{SiOH}_2^+$ , neutros  $\text{SiOH}$  o tener carga negativa como  $\text{SiO}^-$  dependiendo del pH de la disolución acuosa. Los contraiones, cationes en la mayoría de los casos, tienden a ser adsorbidos en la pared por atracciones de tipo electrostático para compensar el defecto de cargas. Se forma así, según el modelo de Stern, una doble capa rígida de iones adsorbidos y a la que se superpone una doble capa difusa de iones.

Este sistema de doble capa origina un potencial eléctrico en la interfase entre la pared y la disolución de electrolito. El potencial de la doble capa rígida decrece linealmente con la distancia, mientras que el potencial de la doble

capa difusa, conocido como *potencial zeta*, decrece exponencialmente con la distancia.

Cuando se aplica una diferencia de potencial a lo largo del capilar, los cationes que forman parte de la doble capa difusa son atraídos hacia el cátodo y como éstos están solvatados, arrastran en su movimiento al resto de la disolución que hay en el capilar hacia el cátodo, constituyendo el FEO. Si bien el punto exacto de la ionización de la sílice fundida es difícil de determinar, se ha observado que el flujo electroosmótico comienza a tener un valor significativo a partir de pH=4. Cuando se trata de materiales no iónicos como el teflón, también aparece un FEO que probablemente resulta de la absorción de aniones sobre la superficie.

### - Los beneficios del flujo electroosmótico

El principal efecto beneficioso del FEO es el hecho de que se consigue un perfil de velocidades plano, lo cual se traduce en picos estrechos.

La magnitud del flujo electroosmótico puede ser expresada en términos de movilidad o velocidad.

$$v_{FEO} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi \eta} E$$

$$v_{FEO} = \mu_{FEO} E$$

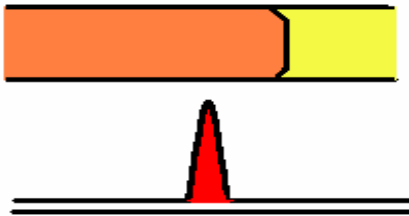
$\epsilon$ : constante dieléctrica del electrolito

$\zeta$ : potencial zeta

$\eta$ : viscosidad de la disolución

E: campo eléctrico aplicado

a) Perfil plano



b) Perfil laminar



*Figura 1.9. Perfil de velocidades del FEO según el régimen del flujo.*

Mientras que el FEO normalmente es beneficioso para la separación, éste necesita ser controlado, puesto que valores elevados pueden producir la elución de los compuestos antes de que se produzca la separación o bien valores muy bajos pueden conducir a tiempos de análisis elevados o incluso que no eluyan determinados compuestos. Así, los parámetros que nos van a permitir el control del flujo electroosmótico son:

1. Campo eléctrico. Al aumentar éste, aumenta la velocidad del FEO como se describe en las ecuaciones anteriores.

2. El pH del tampón de separación. Ajustando el pH se puede actuar sobre la carga de la pared del capilar. Cuanto más alto sea el pH, habrá mayor desprotonación de los grupos silano y mayor densidad de carga por lo que el *potencial zeta* será mayor y como consecuencia aumenta la  $\mu_{\text{FEO}}$  y la  $v_{\text{FEO}}$ . A pH neutro, el FEO ya es capaz de arrastrar todas las especies al cátodo.

3. Fuerza iónica o concentración del tampón. Ésta afecta al espesor de la doble capa ya que al aumentar la concentración de iones disminuye el espesor de la doble capa difusa. Como consecuencia el *potencial zeta* también disminuye y en definitiva el FEO es menor (78).

4. Adición de disolventes orgánicos. Influyen sobre la viscosidad de la disolución y sobre el *potencial zeta*. Metanol, etanol e isopropanol, en concentraciones de 10 a 20 % reducen el FEO, sin embargo, el acetonitrilo ha demostrado producir el efecto contrario (79).

5. Temperatura. Provoca cambios en la viscosidad del electrolito (de un 2 a 3% por grado centígrado) haciendo que aumente la velocidad del FEO al aumentar la temperatura.

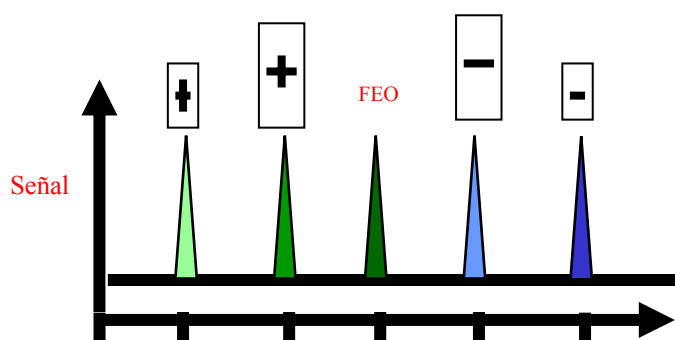
6. Adición de polímeros neutros hidrofílicos. Se adsorben sobre la pared del capilar disminuyendo el FEO y también aumentan la viscosidad por lo que su acción se ve intensificada.

7. Recubrimiento interno del capilar. Se realiza con compuestos que se enlazan de forma covalente a su superficie y el resultado es la supresión del FEO.

Una vez estudiados los principios teóricos de la electroforesis así como los del FEO y los factores de que depende, vamos a suponer un sistema constituido por dos electrodos y un capilar de sílice fundida relleno de electrolito de pH básico (9.2) y en el cual se ha introducido, en el extremo en contacto con el ánodo, una muestra constituida por cationes, aniones y especies neutras.

Si se aplica una diferencia de potencial entre ánodo y cátodo, los iones migrarán a lo largo del capilar con una determinada velocidad electroforética que dependerá de la relación  $q/r$  de cada ión, obteniéndose finalmente un electroferograma como el que se muestra en la figura 1.10.

Los aniones de menor tamaño tienen mayor velocidad electroforética que los de mayor tamaño, por eso oponen mayor resistencia al FEO y tardan más tiempo en eluir. Los compuestos neutros avanzan todos juntos a igual velocidad electroforética que es la velocidad del FEO. Los cationes se ven impulsados por el FEO y como los más pequeños son los que tienen mayor velocidad electroforética serán los primeros en salir y los mayores los últimos en salir. Así, el tiempo necesario para ser eluido un ion viene determinado por su movilidad y la del FEO.



**Figura 1.10.** Electroferograma tipo para una disolución que contiene aniones, cationes y especies neutras

La movilidad aparente de un ión se define como

$$\mu_A = \mu_i + \mu_{FEO}$$

y puede ser obtenida a partir de su tiempo de migración y otros parámetros experimentales.

$$\mu_A = \frac{V_A}{E} = \frac{l}{t_m E} = \frac{lL}{t_m V}$$

l: longitud del capilar desde el extremo de la inyección hasta el detector.

L: longitud total del capilar

$t_m$ : tiempo de migración

V: voltaje aplicado

Puesto que la movilidad del FEO es fácilmente calculable usando un marcador neutro (DMSO, acetona, fenol, metanol) a partir del electroferograma se puede extraer rápidamente la movilidad efectiva de un determinado ion:

$$\mu_i = \mu_A - \mu_{FEO}$$

También se puede poner en función de los tiempos de migración como:

$$\mu_{li} = \left( \frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{mm}} \right) \frac{L}{V}$$

donde  $t_{mm}$  es el tiempo de migración del marcador.

Hay que destacar que los aniones tendrán movilidades negativas ya que se oponen al FEO y los cationes positivas pues van en el mismo sentido.

### **- El tampón de separación**

La selección del tampón de separación es extremadamente importante para la separación. Existen numerosas publicaciones donde se hace referencia a la influencia de la concentración de tampón y el FEO (78, 80). Así, un buen tampón de separación deberá reunir las siguientes condiciones:

- ✓ No influir negativamente en la separación.
- ✓ Tener una alta capacidad de tamponamiento al pH seleccionado para la separación.
- ✓ El pH debe mostrar pequeñas variaciones con la temperatura.
- ✓ En caso de que se utilice un detector UV-Vis, el tampón debe mostrar muy baja absorbancia (o ninguna) a la longitud de onda de medida.
- ✓ La movilidad del ión del tampón debe ser similar a las movilidades de los analitos para evitar la electrodispersión.
- ✓ La movilidad de los contraiones del tampón debe ser lo menor posible para minimizar el calor generado por efecto Joule.

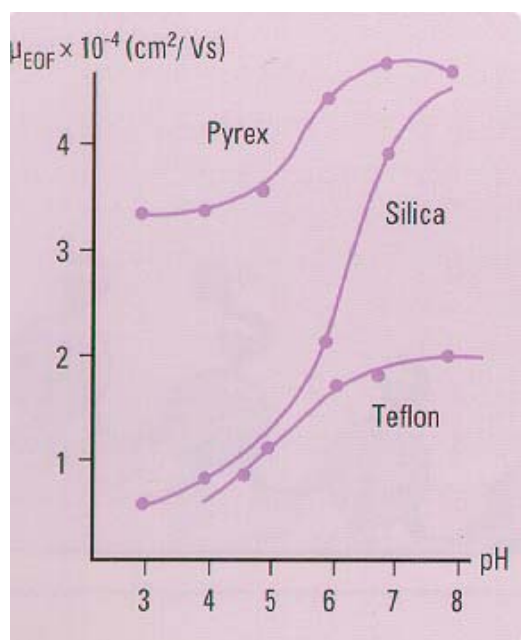
El pH del tampón de separación es un parámetro crítico a la hora de la separación. Puede estar comprendido entre 2 y 12 debido a la alta estabilidad de los capilares de sílice fundida.

La elección del pH dependerá del tipo de soluto a separar, ya que éste puede afectar a la carga de los solutos y, por tanto, a su movilidad



electroforética así como a la movilidad del FEO, alterando así la separación de los compuestos.

Por estos motivos se requiere una optimización de este parámetro y se suele realizar a través de separaciones de la muestra a distintos valores de pH para representar, posteriormente, la movilidad de los compuestos frente a los diferentes pH. Por otro lado, el pH afecta de forma distinta al valor de FEO (81) dependiendo del material con el que esté construido el capilar como se muestra en la figura 1.11.



**Figura 1.11.** Efecto del pH sobre el valor de FEO en función del tipo de capilar.

Después del pH, la fuerza iónica del tampón es una herramienta poderosa para mejorar la eficiencia, resolución y selectividad de la separación ya que influye sobre la movilidad de los analitos y sobre la movilidad del FEO por afectar al espesor de la doble capa difusa y por tanto al *potencial zeta* ( $\zeta$ ). Además influye en la intensidad de corriente que atraviesa el capilar y, por lo tanto, en el calor generado por efecto Joule. Por ello hay que seleccionar tampones cuyos iones presenten baja conductividad, como Tris, borato, histidina, CAPS, cuyos iones son voluminosos y como consecuencia pueden ser usados en altas concentraciones sin generar corrientes demasiado altas aunque presentan la desventaja de que algunos de estos tampones presentan fuerte absorción en el UV.

Para aumentar la selectividad del sistema, se puede añadir al tampón una serie de aditivos tales como disolventes orgánicos, que añadidos al electrolito alteran la polaridad y la viscosidad de la fase móvil. Como consecuencia, se modifica la movilidad electroosmótica de los iones y la movilidad del FEO. La adición al tampón de surfactantes, selectores quirales o agentes formadores de complejos puede alterar también la selectividad y el tiempo de análisis. Los principales aditivos empleados en EC y sus funciones más destacadas quedan recogidos en la tabla 1.1.

*Tabla 1.1. Principales aditivos para EC*

<b>ADITIVO</b>	<b>FUNCIÓN</b>
Disolventes orgánicos	Mejoran la solubilización de las moléculas, reducen la interacción de éstas con la pared del capilar y modifican el FEO.
Sales inorgánicas	Producen cambios conformacionales en las proteínas y reducen las interacciones con la pared del capilar.
Urea	Solubiliza proteínas.
Aminas	Se unen a grupos silanoles libres de la pared del capilar para reducir el FEO.
Tensioactivos catiónicos	Producen carga opuesta en la pared del capilar e invierten la dirección del FEO.
Ciclodextrinas	Forman complejos de inclusión con moléculas aromáticas y alquílicas mejorando la selectividad de la separación. Se utilizan normalmente para separaciones enantioméricas.
Éteres corona	Forman complejos de inclusión con cationes orgánicos e inorgánicos también con el fin de mejorar la selectividad.
Calixarenos	Forman complejos de inclusión con moléculas orgánicas e inorgánicas con el fin de mejorar la selectividad y la sensibilidad (82).

### - Parámetros determinantes de la separación

Una separación analítica se lleva a cabo para obtener, en un tiempo razonable, información cualitativa y cuantitativa acerca de la muestra. Así, los parámetros más relevantes que dan idea del correcto funcionamiento de una separación electroforética son el tiempo de migración, la eficiencia, la selectividad y la resolución.

**El tiempo de migración** ( $t_m$ ) de un analito es el tiempo que éste tarda en recorrer la longitud efectiva del capilar ( $l$ ) y se obtiene directamente del electroferograma. Éste puede ser descrito en función de los parámetros experimentales como:

$$t_m = \frac{lL}{(\mu_l + \mu_{FEO})V}$$

**La eficiencia** de un sistema electroforético se mide por el número de platos teóricos ( $N$ ) alcanzados por el capilar y se puede calcular a partir de la siguiente expresión:

$$N = 5.54 \left( \frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2$$

donde  $w_{1/2}$  es el ancho del pico a la mitad de su altura.

**La selectividad** es la capacidad del sistema para separar solutos que están próximos entre sí y se mide a través de la distancia entre dos máximos consecutivos. La selectividad viene dada por la siguiente expresión:

$$\alpha = \frac{t_{m2} - t_{mFEO}}{t_{m1} - t_{mFEO}}$$

La forma más eficiente para influir sobre ella es cambiar el pH de la disolución.

**La resolución** (R) es el parámetro más importante a la hora de la separación. Nos indica lo bien separados que están dos compuestos. Se puede calcular a partir del electroferograma usando la ecuación:

$$R = \frac{2(t_{m2} - t_{m1})}{w_1 + w_2}$$

Pero también se puede expresar como:

$$R = 0.177 \Delta\mu \left( \frac{V}{D(\bar{\mu} + \mu_{EOF})} \right)^{1/2} \left( \frac{l}{L} \right)^{1/2}$$

De esta ecuación podemos deducir que la resolución aumenta con el voltaje pero no aumenta tanto como lo hace la eficiencia que es directamente proporcional al voltaje. Así, hemos de usar voltajes lo más altos posibles para

llevar a cabo la separación ya que produce separaciones más rápidas, con altas eficiencias.

En cuanto a la movilidad del FEO, hemos de destacar que altas movilidades que antes producían altas eficiencias, ahora producen bajas resoluciones. La mayor resolución se obtendrá cuando la movilidad del FEO sea igual y en sentido contrario a la movilidad electroforética media de los iones pero si tenemos en cuenta el  $t_m$  (medio):

$$t_m(\text{medio}) = \frac{tL}{\mu + \mu_{FEO}}$$

Si

$$\mu = -\mu_{FEO}$$

entonces el  $t_m$  tendería a infinito, lo cual no es práctico. Por lo tanto, se debe mantener un  $\mu_{FEO}$  que de tiempos de análisis lo más pequeños posible siempre que exista una resolución entre los picos.

La resolución depende también de las movilidades electroforéticas de los analitos y será tanto mayor cuanto mayor sea la diferencia entre ellas. Esta diferencia se puede aumentar al optimizar el pH del electrolito de separación o bien mediante la adición de modificadores orgánicos al electrolito de separación que puede causar diferencias en las movilidades y, por lo tanto, aumentar la resolución y la selectividad del sistema.

**- Factores que afectan al desarrollo de la separación**

El alto poder de resolución de la EC se debe fundamentalmente a que los efectos dispersivos pueden ser controlados con la nueva instrumentación, por lo que es importante comprender estos efectos dispersivos para estimar su influencia sobre la separación y conseguir disminuirlos al máximo.

Efectos de dispersión o dispersivos.

El ensanchamiento de banda en EC es la suma de una serie de efectos que contribuyen al ensanchamiento de los picos. Suponiendo un pico gaussiano, el ensanchamiento puede ser expresado en términos de la variante espacial  $\delta^2$ . Así, la varianza total será la suma total de una serie de varianzas debidas a determinadas fuentes de dispersión.

$$\delta_t^2 = \delta_D^2 + \delta_A^2 + \delta_J^2 + \delta_E^2 + \delta_I^2 + \delta_W^2 + \delta_O^2$$

D: difusión

A: adsorción

J: efecto Joule

E: dispersión electroforética

I: inyección

W: cambio de la zona de detección

O: otros.

Difusión. En EC la muestra se introduce en un capilar. La zona donde está contenida la muestra se va ensanchando por ambos lados debido a una diferencia de concentración entre la zona de muestra y el electrolito de

separación. Se obtiene así un perfil de concentración semejante a una curva gaussiana.

Adsorción. La principal causa de adsorción sobre las paredes de sílice fundida son las interacciones iónicas entre compuestos catiónicos y las propias paredes, que presentan cargas negativas. Dependiendo de la intensidad de esta interacción, se pueden obtener picos asimétricos, o bien, puede ser que exista una total adsorción del analito en las paredes, en cuyo caso no se obtendrían picos.

Efecto Joule. Cuando una corriente pasa a lo largo del capilar, parte de la energía eléctrica es convertida a calor. Como consecuencia de este calor, aumenta la temperatura dentro del capilar creándose un gradiente de temperatura desde el centro hacia la pared del capilar y que es eliminada a través de las paredes de éste. Matemáticamente, puede ser descrito por la siguiente ecuación:

$$\Delta T_r = \frac{Qr_1^2}{2} \left[ \frac{1}{K_1} \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right) + \frac{1}{K_2} \ln\left(\frac{r_3}{r_2}\right) + \frac{1}{r_3} \left(\frac{1}{h}\right) \right]$$



Q: calor generado por efecto Joule. r<sub>1</sub>: radio interno del capilar.  
h: velocidad de transferencia térmica desde el capilar. r<sub>2</sub>: radio externo del capilar.  
k<sub>1</sub> y k<sub>2</sub>: conductividades térmicas de la sílice y r<sub>3</sub>: radio externo de la poliamida.  
de la poliamida, respectivamente (k<sub>1</sub> > k<sub>2</sub>)

Como consecuencia de la corriente eléctrica, el calor se genera homogéneamente a lo largo del interior del capilar. Mientras que el perfil de temperatura dentro del capilar es parabólico, el perfil de temperatura a lo largo de las paredes del capilar y de un medio envolvente es logarítmico.

Para obviar este fenómeno, se puede eliminar el calor de la superficie del capilar a través de un sistema de refrigeración que puede ser por una corriente forzada de aire o mediante el uso de un líquido refrigerante. Este control de temperatura es necesario no sólo para eliminar el calor sino para mantener el capilar a una temperatura constante durante la separación, incluso en ausencia de efecto Joule, para asegurarnos la reproducibilidad de las medidas.

Longitud de la muestra inyectada. Es importante que la longitud de la muestra inyectada sea lo más pequeña posible. Si ésta es mayor que la dispersión causada por la muestra, la eficiencia (83) y la resolución se verán sacrificadas. Una regla práctica consiste en inyectar una longitud de muestra inferior al 1-2 % de la longitud total del capilar.

Electrodispersión. Ocasiona la dispersión de los picos electroforéticos debido a la diferente composición del tampón y la muestra inyectada, lo cual

da origen a dos zonas de diferente conductividad y, por lo tanto, de campo eléctrico. La figura 1.12 ayuda a comprender mejor este fenómeno suponiendo tres situaciones distintas. Se parte de un capilar relleno de un determinado tampón en el que se inyecta una muestra que tiene mayor, menor e igual conductividad que el tampón:

**a)** Si se supone que la zona de muestra presenta mayor conductividad que el tampón, ésta presentará una resistencia menor al paso de la corriente y según la ley de Ohm, un menor campo eléctrico con respecto al originado en la zona del tampón. Como la velocidad electroforética de un ión es directamente proporcional al campo eléctrico, un ión que se encuentre en la zona de la muestra tendrá menor velocidad que aquel que llegue a la zona del tampón.

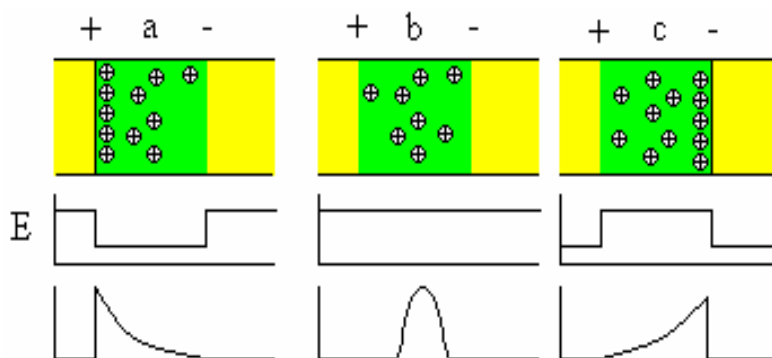
Para una muestra que contiene cationes, si éstos llegan al tampón por la parte posterior a su movimiento de migración, adquieren mayor velocidad volviendo a la zona de muestra donde quedarán frenados. Esto ocasiona en esa zona una compresión de las muestras. Si los cationes llegan al tampón por la zona anterior adquirirán mayor velocidad produciéndose en esta zona una difusión de la muestra, así, se obtiene un pico deformado en el sentido de avance de la muestra.

**b)** Para una muestra que presente menor conductividad que el tampón se presenta el caso C. En la zona de muestra se genera un campo eléctrico mayor que en la zona del tampón, de esta forma los iones adquieren una velocidad alta en la zona de muestra y cuando llegan a la zona del tampón se ven frenados. El resultado es una compresión de la muestra en la zona más próxima al cátodo y una difusión de la misma en la zona más próxima al ánodo.

Esto se debe a que aquellos cationes que entran en esta zona se ven frenados y les cuesta más trabajo volver a la zona de la muestra.

En esta situación se obtienen picos deformados en el sentido contrario al de avance de la muestra.

c) El tercer caso (B) lo constituiría aquella muestra que tiene la misma conductividad que el electrolito de separación. Para esta posibilidad no existirá ninguna deformación del pico debido a la electrodispersión.



**Figura 1.12.** Electrodispersión derivada de la diferencia de conductividad entre la disolución de la muestra (verde) y el electrolito (amarillo)

Como resumen, se puede concluir que todos los efectos dispersivos pueden mantenerse bajo control, siempre y cuando se sigan algunas normas generales como las expuestas a continuación:

## Capítulo 1

---

**1.-** Como todos ellos dependen de la temperatura, el sistema no sólo debe estar refrigerado sino termostatzado, es decir, la temperatura debe ser constante en todo el proceso de separación.

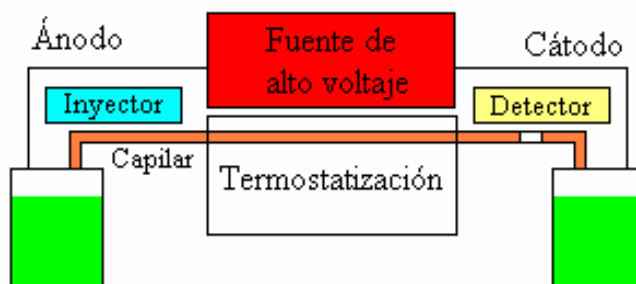
**2.-** Los capilares con longitudes comprendidas entre 55 y 75 cm presentan una relación superficie/volumen interno aceptable y que permite obtener buenos resultados en cuanto al calor generado por efecto Joule, a la adsorción de moléculas y a la sensibilidad de los detectores UV-Vis.

**3.-** La concentración de la muestra no debería exceder el 1% de la concentración del electrolito y la longitud de la muestra inyectada se debe procurar que sea lo más corta posible. Si aparecen problemas derivados de la sensibilidad de la detección es preferible llevar a cabo procesos de compresión de la muestra en lugar de inyectar grandes cantidades de muestra que supongan grandes longitudes inyectadas.

**4.-** La fuerza iónica del electrolito debería ser lo más baja posible para prevenir un exceso de calor por efecto Joule. Además, se deberían utilizar tampones con bajas conductividades antes que los de altas conductividades.

***Aspectos instrumentales y operacionales de la Electroforesis Capilar.***

En la figura 1.13 se muestra el diseño básico de un equipo de electroforesis capilar.



***Figura 1.13. Diseño básico de un equipo de electroforesis capilar.***

Para comenzar una separación, el capilar se rellena con el tampón o electrolito de separación, después se inyecta la muestra en el lado opuesto al detector y seguidamente el capilar, a la vez que los electrodos, se sumerge en dos viales que contienen el electrolito de separación. Finalmente se aplica una diferencia de potencial entre ambos electrodos y comienza la separación.

### **- Inyección de la muestra**

La introducción de la muestra dentro del sistema electroforético, generalmente, se denomina inyección. La inyección de la muestra en el capilar se puede hacer mediante una gran variedad de métodos, pero los dos más importantes son la inyección hidrodinámica y la inyección electrocinética.

La *inyección hidrodinámica* se puede llevar a cabo mediante la aplicación de una presión al vial, en el que se introduce en el extremo inicial del capilar, o bien, haciendo vacío sobre el extremo final del capilar, o bien, por gravedad elevando el vial que contiene la muestra unos centímetros por encima del vial de salida (efecto sifón). (Figura 1.14)

Para este tipo de inyección, se retira el extremo de entrada del capilar desde el vial con electrolito y se sumerge en el vial que contiene la muestra. Se aplica presión mediante una de las formas ya descritas durante un corto periodo de tiempo. Esto permite introducir un pequeño volumen de muestra al comienzo del capilar. La cantidad de analitos que sean introducidos dependerá principalmente del tiempo y de la presión que sean aplicados, la viscosidad de la disolución y las dimensiones del capilar.

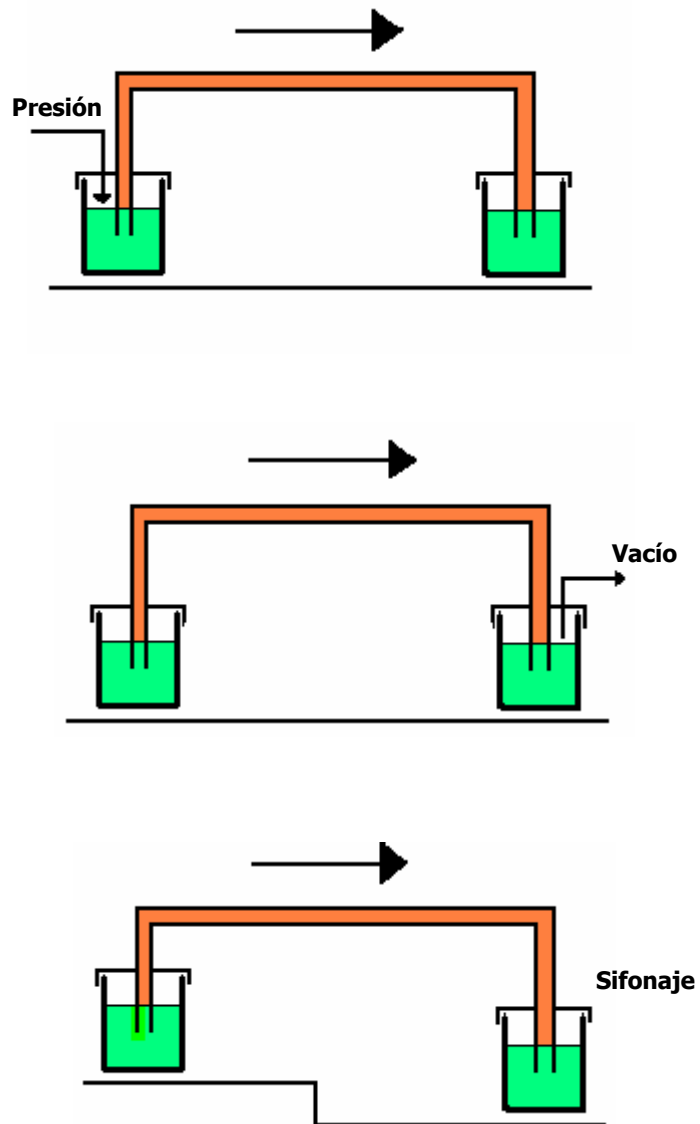


Figura 1.14. Modos de inyección hidrodinámica.

Mediante la inyección hidrodinámica, la composición de la muestra que se introduce en el interior del capilar es igual que la del vial de la muestra y el volumen inyectado se puede obtener mediante la ecuación de Poiseuille:

$$V = \frac{\Delta P r_1^4 \pi t}{8 \eta L}$$

$\Delta P$ : diferencia de presión (Pa)

$r$ : radio interno del capilar (m)

$t$ : tiempo (s)

$\eta$ : viscosidad (Pa · s)

$L$ : longitud total del capilar (m)

Se puede deducir que depende de la diferencia de presión establecida a lo largo del capilar, del diámetro interno de éste, del tiempo de inyección, de la viscosidad y de la longitud total del capilar como ya se ha comentado.

Las presiones típicas de inyección suelen oscilar entre 0.05 y 0.5 bares y los tiempos de inyección pueden estar comprendidos entre 1 s y 10 s. Bajo estas condiciones se pueden inyectar volúmenes del orden de los nanolitros.

En caso de utilizar la elevación del vial como modo de inyección, el volumen de muestra a inyectar estará dado por la constante de gravedad, la densidad del electrolito y la altura de elevación de la muestra. Por tanto, cuando la inyección se hace por gravedad o diferencia de altura, la  $\Delta P$  se obtiene a través de la siguiente expresión:



$$\Delta P = \rho g \Delta h$$

$\rho$ : densidad del tampón (Kg m<sup>-3</sup>)

$g$ : gravedad (9.8 N Kg<sup>-1</sup>)

$\Delta h$ : diferencia de altura entre los viales (m)

En este caso se suelen utilizar diferencias de altura entre 5 y 10 cm y tiempos de inyección comprendidos entre 10 y 30 segundos.

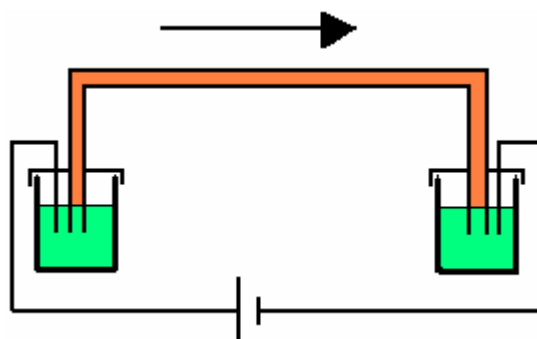
La longitud de la muestra inyectada se puede obtener fácilmente a partir del volumen inyectado según la ecuación:

$$L = \frac{Vol}{\pi r^2}$$

Como ya se comentó con anterioridad, se deben utilizar pequeños volúmenes de inyección para obtener bajas dispersiones. Sin embargo, estos volúmenes pequeños de inyección suelen ser difíciles de reproducir y se hace necesario llegar a una solución de compromiso.

El hecho de que el volumen de inyección dependa de la viscosidad de la disolución hace que se necesite un buen control de la temperatura porque la cantidad inyectada puede variar de un 2 a un 3% por °C. Pero hay que destacar que la viscosidad de la muestra no influye considerablemente en la cantidad inyectada porque el volumen inyectado es mínimo comparado con el volumen del capilar.

La *inyección electrocinética* supone un modo alternativo a la introducción de la muestra en electroforesis capilar, utiliza un voltaje para la introducción de los analitos en el capilar. (Figura 1.15)



*Figura 1.15. Inyección electrocinética.*

La configuración es ligeramente diferente a la del caso anterior, ya que aquí es necesario tener el extremo de salida del capilar sumergido en el electrolito para poder establecer el campo eléctrico. Se procede sumergiendo el extremo de entrada del capilar en la muestra y se aplica un determinado potencial (de 3 a 5 veces inferior al potencial de separación) durante cierto periodo de tiempo (unos segundos). Los analitos migrarán de acuerdo a su movilidad electroforética, por el FEO, también de acuerdo con el voltaje y el tiempo aplicados, la concentración de analitos presente y el radio del capilar.

Por estas características, este tipo de inyección es mucho más discriminatoria y más selectiva que la inyección hidrodinámica y alcanza unos niveles de sensibilidad mejores.

El volumen inyectado en este caso viene dado por la siguiente expresión:

$$V = (V_i + V_{FEO})\pi r_1^2 t$$

La cantidad introducida de una determinada especie puede ser controlada variando el voltaje, el tiempo, la concentración o el diámetro interno del capilar. Además, depende de la movilidad de un determinado ion y de la movilidad del FEO. Esto quiere decir que este tipo de inyección es selectiva para aquellos iones que poseen mayor velocidad electroforética frente a los de menor velocidad electroforética. Además, los iones de movilidad contraria al FEO sólo entrarán en el capilar si el valor absoluto de ésta es inferior al del FEO.

Una variación en la conductividad de la muestra, debido a la composición de su matriz, puede suponer una alteración en la cantidad inyectada. Como consecuencia de este fenómeno, la inyección electrocinética no es tan reproducible como la inyección hidrodinámica.

Por último, se puede decir que, aún con sus limitaciones, este tipo de inyección es simple y sencilla, no requiere una instrumentación adicional y presenta ventajas cuando se emplean geles o medios viscosos de separación, cuando la inyección hidrodinámica no funciona y cuando se quiere discriminar la inyección de algunos compuestos frente a otros iones (84-86).

### **- Concentración de la muestra en el capilar**

El nivel de concentración detectable que suele conseguirse en electroforesis capilar está en torno a los  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para las determinaciones en fármacos estos límites pueden ser suficientes, pero cuando se trabaja con fluidos biológicos interesa detectar cantidades inferiores.

En la práctica actual se ha intentado suplir este defecto mediante el empleo de técnicas de preconcentración previas a las separaciones electroforéticas, o bien, mediante preconcentraciones "en columna" previas a una separación por ECZ (87). Aparte de estas técnicas, existen unas propias de la electroforesis capilar:

- a.- Técnicas de inyección de amplificación de campo
- b.- Isotacoforesis de transición en ECZ

#### a.- Técnicas de inyección de amplificación de campo

Todas ellas se basan en el hecho de que la velocidad de un ion depende linealmente del campo eléctrico del medio en el que se encuentre. En función de tal hecho se dispone la muestra en un medio de conductividad eléctrica distinta a la de la disolución electrolítica de separación. Estas técnicas se pueden reunir en tres grupos que se describen a continuación:

### *a.1.) Stacking*

Partiendo de la base de que el analito se encuentra disuelto en una matriz que presenta una conductividad menor que el electrolito soporte del capilar, éste experimentará un aumento en la intensidad del campo eléctrico de manera local. Como consecuencia, migrará a una velocidad más alta hasta que sobrepase la interfase entre la matriz de muestra y el electrolito soporte. En este momento su velocidad disminuirá porque se encuentra en un campo eléctrico de intensidad más baja. Por tanto, se puede concluir que el efecto final es que el analito se focaliza en una zona estrecha en la interfase señalada. Atendiendo a este fenómeno siempre interesa inyectar la muestra en un medio con una conductividad lo más baja posible (figura 1.16). Además, si el tipo de inyección es electrocinética y se presenta la situación descrita, la cantidad de analito que se inyectará será mayor que si la muestra posee igual o mayor fuerza iónica que el medio de separación (88).

### **Formas de Stacking:**

- Hidrodinámica.

Sirve para la concentración de aniones y cationes simultáneamente o para la concentración de aniones o cationes.

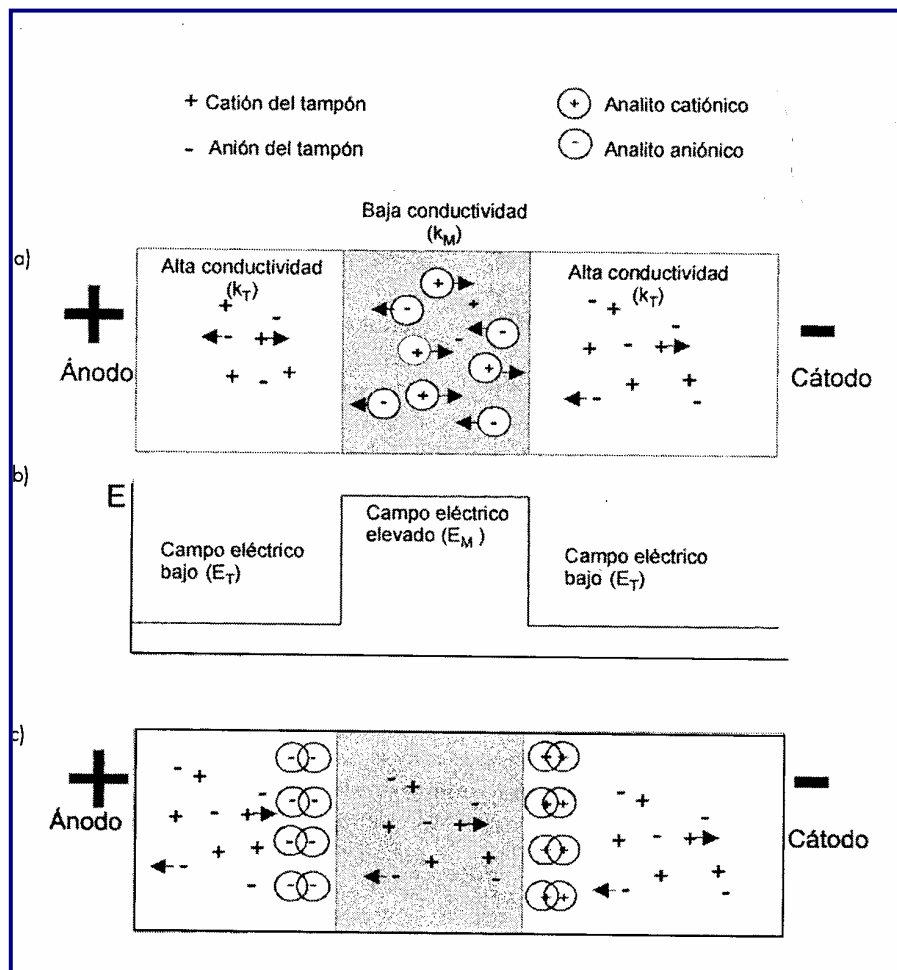
### ☛ Electrocinética.

Si no existe FEO, la muestra se disuelve en tampón de baja concentración y se selecciona la polaridad adecuada para conseguir la concentración, bien de aniones o de cationes. Si existe FEO se pueden hacer dos cosas:

1. Tomar una muestra diluida y aplicar la diferencia de potencial. Los cationes se concentran bajo polaridad normal con los aniones, se cambia la polaridad de los electrodos y la carga del capilar (89).
2. Se inyecta un tampón de agua antes de la inyección de la muestra y se procede de forma diferente según se trabaje con aniones o cationes.

#### *a.2.) Inyección de grandes volúmenes de muestra*

Aprovechando el fenómeno de la diferencia de campo eléctrico (90) entre la muestra y el medio de separación junto con el FEO se pueden inyectar grandes volúmenes de muestra en el interior del capilar para realizar separaciones en la modalidad de ECZ. En la figura 1.17 se representa este tipo de inyección para analitos aniónicos. La figura 1.17.a representa el momento en el que se inyecta en el capilar a presión un gran volumen de muestra que tiene una conductividad menor que la que posee el tampón de separación. En la figura 1.17.b se recoge el momento en el que se aplica una diferencia de potencial situando el electrodo positivo en las proximidades del detector. El FEO va extrayendo el bloque de muestra inyectado produciéndose, además, el fenómeno de focalización en la interfase muestra-tampón de separación. En la figura 1.17.c se lleva a cabo la inversión de la polaridad para llevar a cabo una separación zonal. Bajo estas condiciones se está inyectando una muestra enriquecida en analitos.



**Figura 1.16.** Concentración de la muestra mediante stacking. a) Situación inicial (se ha introducido la muestra hidrodinámicamente y se aplica un campo eléctrico); b) Variación del campo eléctrico a lo largo del capilar; c) Situación final, cuando se ha conseguido la concentración de la muestra.

Cuando se tengan analitos catiónicos la forma de operar es muy similar, únicamente se requiere una sustancia que invierta el sentido del FEO.

Para que esta técnica pueda utilizarse lo mejor es que el equipo de electroforesis ofrezca la posibilidad de cambiar la polaridad automáticamente. Si no es así, existirá la posibilidad de realizar el cambio manual con la debida precaución.

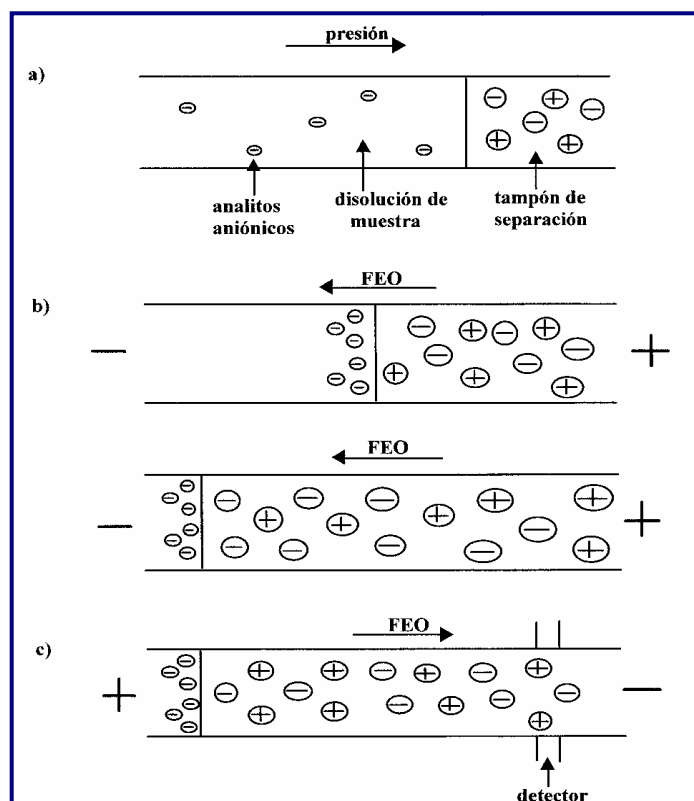


Figura 1.17. Inyección de grandes volúmenes de una muestra de analitos aniónicos



*a.3.) Técnica de inyección de amplificación de campo para analitos neutros*

Las dos técnicas que se han descrito anteriormente están diseñadas para focalizar analitos que presentan carga. Si nuestra muestra está formada por analitos neutros existe la posibilidad de amplificación de campo en la modalidad de cromatografía electrocinética micelar (ECEM) cuando se utilizan micelas de tipo aniónico. Esta forma de proceder ha sido descrita recientemente por Palmer y col. (91). En este caso la muestra de inyección debe tener una conductividad mucho mayor que el tampón de separación, es decir, lo contrario a los casos descritos para analitos iónicos. La muestra se introduce a presión en la zona del electrodo positivo, cuando se aplica la diferencia de potencial lo que se focaliza en la interfase muestra-tampón de separación son la micelas aniónicas. Éstas van en el sentido del FEO, pero más lentas que él debido a su componente electroforético. A su vez, los analitos neutros sólo son impulsados por el FEO hasta que se encuentran con la zona focalizada de micelas que hace que, por su reparto en ellas, se concentren en esta zona. Cuando se trabaja en estas condiciones la separación de los analitos tiene lugar a partir de una situación focalizada de los compuestos de interés.

*b.- Isotacoforesis de transición en ECZ*

Las técnicas de amplificación de campo parecen tener como regla general que la muestra sea lo más diluida posible en sales, pero esta regla tiene su excepción. La excepción aparece cuando la matriz de muestra tiene un exceso de un ión que presenta una movilidad electroforética mayor que

cualquiera de los analitos presentes y el electrolito soporte posee un ion cuya movilidad es la más baja de los analitos presentes. En este punto, el ion de la matriz de muestra de mayor movilidad actúa como ion de cabeza y el de más baja del electrolito soporte como ión de cola. Como consecuencia se produce un efecto similar al que sucede en la isotacoforesis capilar (ITFC), es decir, un enriquecimiento de cada analito en zonas.

El efecto mencionado es transitorio porque el electrolito soporte es homogéneo de forma que la zona de más alta movilidad comenzará a migrar siguiendo el mecanismo normal de la ECZ.

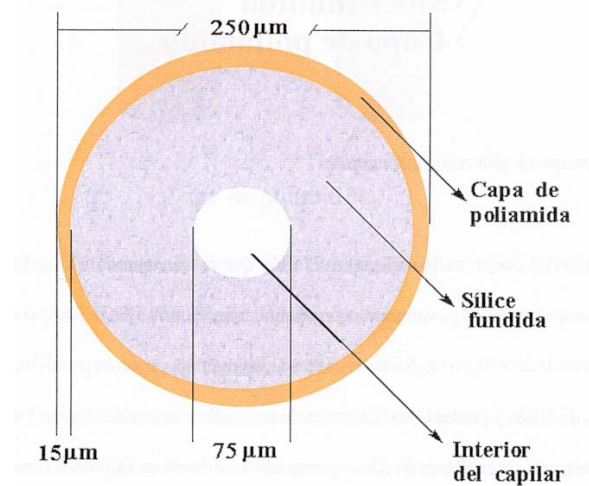
### **- Fuente de alto voltaje**

Se utilizan fuentes de corriente continua, capaces de aplicar un voltaje entre 1 y 30 KV con una regulación de voltaje de  $\pm 0.1\%$  para mantener una alta reproducibilidad del tiempo de migración. Debe tener la capacidad de cambiar la polaridad y es preferible que este cambio se haga directamente desde el software.

Al comienzo de la separación el voltaje de trabajo debe imponerse a través de una rampa para no ocasionar calentamientos rápidos e instantáneos en el capilar que pueden producir la expansión del tampón y, como consecuencia, la pérdida de parte de la muestra inyectada.

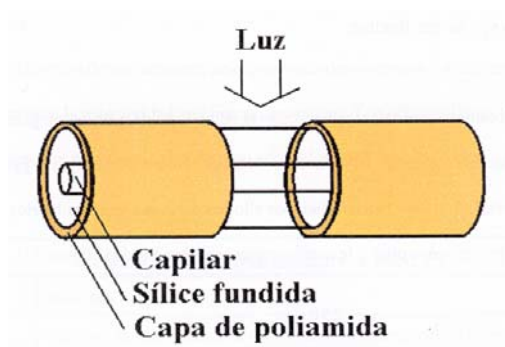
### - Capilar

Los capilares que se utilizan en una separación electroforética han de ser química y eléctricamente inertes, transparentes a la radiación UV-Visible, robustos a la vez que flexibles y baratos. La mayor parte de estos requerimientos los reúne la sílice fundida, por lo que la gran mayoría de los capilares que se utilizan en EC están hechos de sílice. Uno de los mayores problemas que presenta la sílice fundida es su baja flexibilidad, por ello los capilares van recubiertos de una capa de poliamida que protege al capilar y le confiere una gran flexibilidad (figura 1.18).



*Figura 1.18. Corte transversal de un capilar*

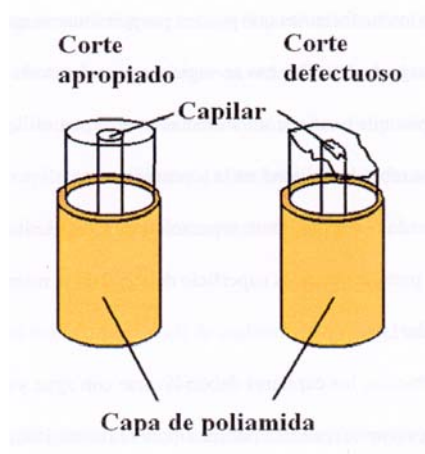
La ventana de detección se consigue hacer fácilmente quitando unos milímetros de la poliamida utilizando una llama o una resistencia eléctrica y eliminando restos con etanol o acetona de forma que queda el capilar de la figura 1.19. El manejo del capilar debe ser cuidadoso pues, a nivel de la ventana de detección, el capilar se vuelve extremadamente frágil.



**Figura 1.19.** Ventana de detección del capilar

Otro material que se suele utilizar es el teflón, que es transparente a la radiación UV y no requiere de ventanas especiales y aunque no presenta carga exhibe FEO. Sin embargo, es difícil obtener capilares de teflón con un diámetro interno homogéneo. Además, presenta problemas de adsorción similares a los de sílice y coeficientes de transferencia térmica bajos, inconvenientes que han hecho que su uso sea más limitado.

Los capilares de sílice que se utilizan en EC suelen tener un diámetro interno entre 25 y 100  $\mu\text{m}$  y un diámetro externo entre 350 a 400  $\mu\text{m}$ . La longitud efectiva suele oscilar entre los 10 cm, para capilares rellenos de gel y los 100 cm de los capilares que se utilizan para la resolución de muestras muy complejas. No suelen utilizarse capilares más largos porque hacen que aumente considerablemente el tiempo de análisis sin una mejora apreciable de la eficiencia. En la mayoría de los casos se utilizan capilares de 50 cm y la longitud total suele estar comprendida entre 5 y 15 cm más que la longitud efectiva (dependiendo del tipo de instrumento utilizado). Para aumentar la reproducibilidad de la inyección y evitar que disminuya la eficacia, el corte del capilar ha de ser limpio (figura 1.20).



**Figura 1.20.** Cortes del capilar que resultan apropiados o no para una separación electroforética.

Antes de llevar a cabo la primera separación con un capilar se ha de proceder a su acondicionamiento. Este paso tiene por objeto eliminar compuestos adsorbidos sobre la superficie interna del capilar y generar una superficie fresca por desprotonación de los grupos silanol y conseguir un flujo constante y consistente.

Un proceso típico de acondicionamiento consiste en pasar a través del capilar NaOH 1 N, después NaOH 0.1 N y, más tarde, el tampón de separación. Otro proceso puede consistir en tratar con NaOH 0.1 N durante 20 minutos, rellenar el capilar con el electrolito de separación y hacer una separación a voltaje elevado durante 20-30 minutos. En otros casos pueden utilizar ácidos fuertes, detergentes o disolventes orgánicos tales como metanol, acetonitrilo, etc.

Por otra parte, es bien sabido que los componentes del electrolito suelen ser adsorbidos sobre la superficie, por ejemplo, el fosfato es adsorbido sobre la superficie y esto supone un tiempo de equilibrio alto, o los surfactantes que pueden proporcionar cargas permanentes sobre la superficie alterando la carga de ésta. Por eso se sugiere que, sobre todo cuando un capilar ha sido utilizado con un tampón que contiene un surfactante, sólo sea utilizado para este tipo de tampón si se quiere una alta reproducibilidad en la separación.

Una vez acondicionado el capilar, entre separaciones es suficiente con un lavado corto realizado con NaOH 0.1 N para recuperar la superficie del capilar (la misma densidad de carga sobre la superficie del capilar).

Después de su utilización, el capilar debe lavarse con agua y secarse con aire para su posterior almacenaje. Si esto no se realizase podría suponer la

cristalización del tampón dentro del capilar con la consecuente obstrucción del mismo.

*\* Modificadores de la pared del capilar*

La modificación de la pared del capilar es un método que limita la adsorción del soluto, ofrece la posibilidad de controlar el FEO e incluso eliminarlo. Tales modificaciones suelen hacerse mediante dos aproximaciones o métodos:

**1.-** Modificación permanente mediante el uso de fases enlazadas covalentemente o adheridas físicamente a la pared del capilar. Para ello se usan determinados aditivos en el tampón, lo que se ha venido a llamar desactivación dinámica. Esta desactivación dinámica plantea una serie de problemas que se resumen a continuación:

- ✘ Se ven afectados tanto los solutos como la pared del capilar.
- ✘ Se necesita un tiempo para conseguir desactivaciones reproducibles.
- ✘ Los análisis post-columna, tales como la espectrometría de masas y los ensayos enzimáticos son sensibles a los aditivos sobre todo si se usan en alta concentración.

En el primer caso, se suele llevar a cabo la desactivación vía enlace siloxano, estable entre pH=4 y 7. Cuando la desactivación se hace vía enlace Si-C, se obtienen fases estables entre pH=2 y 10. Sin embargo, este tipo de desactivación suele ser difícil de preparar. En la actualidad existen en el

mercado capilares recubiertos de distintos tipos de fases débilmente hidrofóbicas hasta fases fuertemente hidrofóbicas (tales como la C18).

**2.-** El segundo caso es el más simple y fácil de realizar y requiere el uso de diversos surfactantes o polímeros hidrofílicos.

Polímeros hidrofílicos. Del tipo de la alquil celulosa, el alcohol polivinílico o la poliacilamida.

Surfactantes: aniónicos como el SDS (por interacción hidrofóbica), catiónicos (BCYA) o no iónicos (Bris) anfólitos o zwitteriónicos (Chaps, TRIS).

### **- Sistemas de termostatación del capilar**

La presencia de estos equipos se hace imprescindible para mantener un control efectivo de la temperatura, puesto que ésta afecta a la viscosidad y, como consecuencia, a la movilidad de los iones y del FEO, así como a la cantidad de muestra inyectada. La reproducibilidad de las medidas tiene una cierta dependencia del sistema de termostatación del capilar.

Existen sistemas de flujo de aire (a una velocidad de unos 10 m/s) o de líquido. Aunque el sistema por líquido suele ser algo mejor también supone una



instrumentación más complicada y de mayor coste por lo que en muchas ocasiones se prefiere la termostatación por flujo de aire, que se muestra igual de eficiente siempre y cuando no se superen valores de 5 (W/m) durante la separación. La figura 1.21 muestra como afecta el sistema utilizado a la intensidad de corriente generada.

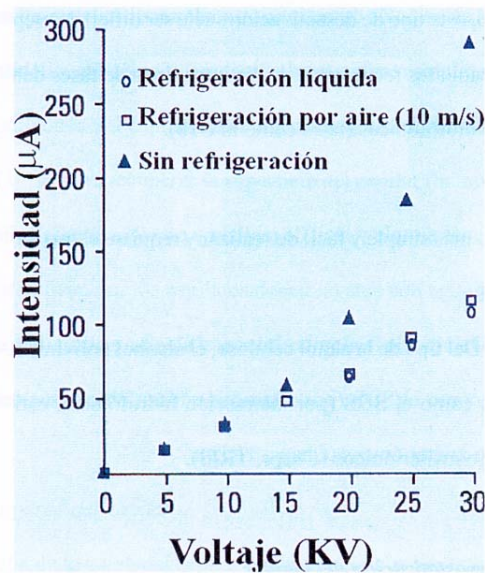


Figura 1.21. Influencia del sistema de refrigeración en intensidad de corriente.

### - Sistemas de detección

La electroforesis es bastante parecida a la cromatografía líquida en el hecho de que los solutos se eluyen del sistema por un tubo en forma líquida. Así, no es sorprendente que la mayor parte de los detectores utilizados en HPLC lo sean también en EC.

Los principales detectores se basan en la absorción UV-Vis, la fluorescencia, la fluorescencia inducida por láser, la espectrometría de masas, la conductividad, detectores amperométricos, radiométricos y basados en el índice de refracción.

El detector UV es uno de los más utilizados en EC. Como sabemos, las absorbancias dependen de la posibilidad de la existencia de grupos cromóforos en la molécula a la longitud de onda de trabajo, del pH del tampón de separación, de la concentración y de la longitud de paso óptico:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

$\varepsilon$ : Absortividad molar

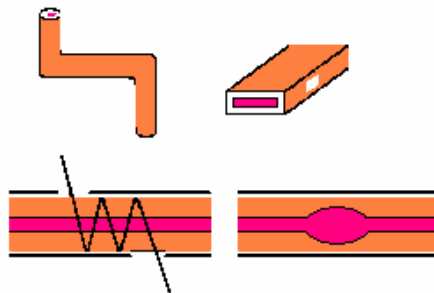
b: longitud de paso óptico

c: concentración

El hecho de que la longitud del paso óptico de la celda en EC sea aproximadamente el diámetro interno del capilar (el cual es del orden de 50 a 200  $\mu\text{m}$ ) limita mucho la sensibilidad de la técnica. Para aumentar la longitud de paso óptico se pueden utilizar ventanas de detección en forma de Z, de burbuja

(92,93) o bien utilizando una celda de multirreflexión, donde el incremento de paso óptico es proporcional al número de reflexiones con las que se pueden conseguir longitudes de paso óptico de hasta 1 cm (94). También se pueden utilizar capilares rectangulares, donde la absorbancia puede ser multiplicada por 20. Estos capilares son construidos en cristal de borosilicato, el cual no es transparente a longitudes de onda bajas. Se suelen utilizar a longitudes de onda por encima de 310 nm (visible). Las principales celdas de detección para aumentar la sensibilidad se muestran en la figura 1.22.

Los sistemas más utilizados son los que se recogen en la tabla 1.2.



**Figura 1.22.** Celdas de detección que aumentan el paso óptico.

*Tabla 1.2. Métodos de detección.*

<b>Método</b>	<b>LD* (M)</b>	<b>Ventajas e inconvenientes</b>
Absorción UV-Vis	$10^{-5} - 10^{-8}$	-Universal -La batería de diodos en línea ofrece información espectral
Fluorescencia	$10^{-7} - 10^{-9}$	-Sensibilidad -Requiere, en general, derivatización
Fluorescencia inducida por LASER	$10^{-14} - 10^{-16}$	-Muy sensible -Caro -Requiere, en general, derivatización
Amperometría	$10^{-10} - 10^{-11}$	-Sensible -Selectivo, pero suele usarse con analitos electroactivos -Requiere modificaciones electrónicas y en el capilar
Conductividad	$10^{-7} - 10^{-8}$	-Universal -Requiere modificaciones electrónicas y en el capilar
Espectrometría de masas	$10^{-8} - 10^{-9}$	-Alta sensibilidad e información estructural -Acoplamiento EC-MS complicado
Métodos indirectos	10 – 100 veces menos que un método directo	-Universal -Menor sensibilidad que los directos
Otros	Radiactividad, índice de refracción, dicroísmo circular, Raman...	

\* LD: Límite de detección

### ***Modalidades de Electroforesis Capilar***

Las principales modalidades descritas dentro de la electroforesis son las que se enuncian a continuación.

- Electroforesis capilar en zona (ECZ).
- Cromatografía electrocinética micelar (ECEM).
- Electroforesis capilar en gel (ECG).
- Isoelectroenfoco (IEF).
- Isotacoforesis capilar (ITFC).
- Electro cromatografía capilar (CEC).

En el trabajo experimental que se refleja en esta memoria, se han utilizado las dos primeras modalidades de la lista anterior, las cuales pasamos a comentar.

#### **- *Electroforesis capilar en zona***

La ECZ es uno de los modos más ampliamente usados debido a la simplicidad de operación y a su gran versatilidad. Su nombre puede conducir a

errores debido a que también la ECEM y la ECG son modos zonales, por lo que a veces se le denomina también EC en disolución libre.

Para llevar a cabo una separación por EC el modo normal de proceder es el siguiente:

**1.-** Se introduce el lado anódico del capilar en un vial que contiene el tampón de separación y el lado catódico en un vial vacío y se aplica una presión en el lado anódico o se succiona en el lado catódico para conseguir que el capilar se rellene uniformemente con el tampón.

**2.-** Se sumerge el lado anódico del capilar en un vial que contiene la muestra y el lado catódico en un vial que contiene el tampón y de forma electrocinética o hidrodinámica se procede a la inyección de la muestra utilizando uno de los procedimientos anteriormente explicados.

**3.-** Se sumergen ambos extremos del capilar en los viales que contienen tampón y comienza la separación aplicando una diferencia de potencial (1-30 kV) entre ánodo y cátodo. Esta diferencia de potencial debe aplicarse en forma de rampa para evitar la aparición de temperaturas localmente elevadas que provocarían la dilatación del tampón y de la muestra y cuya consecuencia sería una pérdida de la muestra.

Una vez aplicada la diferencia de potencial, los cationes migrarán hacia el cátodo separándose en distintas zonas dependiendo de su velocidad electroforética y, si existe FEO, los aniones en la mayor parte de los casos serán empujados por éste hacia el detector (hacia el cátodo) separándose también en distintas zonas dependiendo de sus velocidades electroforéticas. Así, con esta técnica se pueden separar simultáneamente mezclas de aniones y cationes,

mientras que los compuestos neutros se mueven a la misma velocidad eluyendo todos con el FEO.

Puesto que los cationes migran en la misma dirección que el FEO, se verán impulsados por el mismo saliendo más rápidamente del capilar. A igual carga, los primeros en salir serán los más pequeños y, a igual tamaño, los que posean mayor carga. Los aniones, por su tendencia a migrar en sentido contrario al FEO, salen a tiempos más elevados que éste, siendo los primeros aquellos que, a igual carga, presentan mayor tamaño y que, a igual tamaño, presentan menor carga.

Hay que resaltar que en algunas ocasiones el FEO puede invertirse mediante la adición de aditivos haciendo que vaya desde el cátodo al ánodo.

Las principales aplicaciones de la ECZ son para la separación de péptidos y proteínas, pero también de moléculas más pequeñas (84-86,95).

#### **- Cromatografía electrocinética micelar**

Este método combina el mecanismo de separación de la cromatografía con el movimiento electroforético y electroosmótico de los analitos y de la disolución. El desarrollo de la ECEM fue un gran avance en la EC puesto que proporciona un método para la separación de compuestos neutros así como de compuestos cargados (iónicos). Fue introducida por Terabe y colaboradores (96-98) en 1984 y desde entonces es uno de los métodos más utilizados en la EC.

Se basa en la adición de tensioactivos sobre el electrolito de separación. Un agente micelar o surfactante (tensoactivo) es aquel que añadido en concentraciones superiores a un valor característico denominado concentración micelar crítica (c.m.c.) forma unos agregados anfifílicos denominados micelas. La formación de la micela por agregación de los monómeros se debe a que éstos poseen una estructura de tipo R-X, donde R es una cadena hidrocarbonada, frecuentemente lineal, de 8 a 18 átomos de carbono que forma la cola hidrofóbica y X es un grupo polar o iónico denominado cabeza. La unión cabeza-cola hace que la micela posea tantos grupos polares como apolares y forma agregados que se encuentran en un equilibrio dinámico con los monómeros que conforman la micela.

Dependiendo de la naturaleza del grupo de cabeza polar, los agentes micelares se pueden clasificar en: catiónicos, aniónicos, no iónicos y anfóteros. Los principales surfactantes pertenecientes a cada grupo se recogen en la tabla 1.3. Además, según el tipo de surfactante, las micelas se formarán con un número diferente de moléculas de agente micelar, esto se conoce como número de agregación (NA).



Tabla 1.3.–Principales surfactantes

SURFACTANTES	c.m.c. (mM)	NA
<b>Aniónicos</b>		
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	8.27	62
Colato sódico	14	2-4
Desoxicolato	5	4-10
<b>Catiónicos</b>		
Cloruro de cetiltrimetilamonio	1	
Cloruro de dodecil amonio	15	55
<b>Anfóteros</b>		
CHAPS <sup>(1)</sup>	8	10
<b>No iónicos</b>		
Tritón X-100	0.24	140
n-decil- $\beta$ -D-glucopiranososa	2.2	

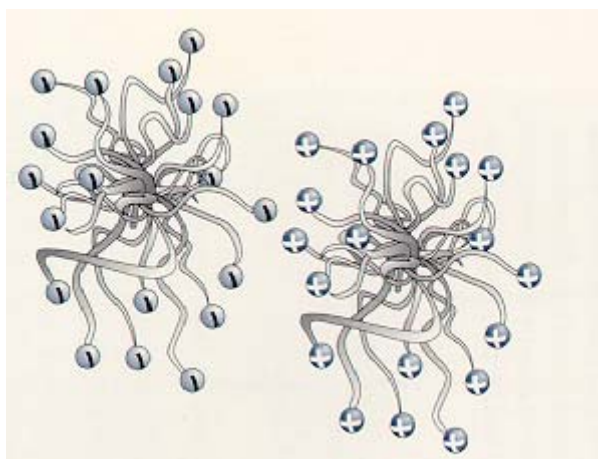
(1) CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato

Otro tipo menos común de agentes micelares son aquellos en los que, a una única cabeza polar, se unen dos colas hidrocarbonadas. Esto puede conferirles propiedades especiales.

La característica principal de los agentes micelares es su capacidad de autoasociación, tanto en disolución acuosa como en medios apolares, formando grandes agregados de estructura definida. El tipo de agregado que se forma depende tanto de la estructura del agente micelar como del medio

dispersante. Una micela es aproximadamente esférica a bajas concentraciones de agente micelar y elipsoidal a altas concentraciones o en presencia de electrolitos (99).

En disolución acuosa, los grupos polares de la micela están orientados hacia la fase acuosa y en contacto con ella, mientras que las colas están dirigidas hacia el interior de la micela formando un núcleo no polar o hidrófobo (figura 1.23). La micela es el resultado de dos fuerzas principales: las repulsiones entre las cadenas hidrocarbonadas y el medio acuoso y las atracciones de Van der Waals entre dichas cadenas. En la formación de la micela, además, existen otras dos interacciones secundarias: las repulsiones entre los grupos cabeza (cuando éstos son iónicos) y el efecto positivo de los contraiones del agente micelar que disminuye dichas repulsiones. Por tanto, los factores que determinan el valor de la c.m.c. de un agente micelar son: el NA, el tamaño y la estructura del grupo cabeza, la naturaleza del contraión, la presencia de electrolitos y de otras sustancias anfífilas, etc además de la temperatura, ya que todos estos factores influyen sobre alguna o varias de las interacciones que se acaban de comentar.



**Figura 1.23.** Estructuras de micelas aniónicas y catiónicas

Sin lugar a dudas, la propiedad más importante de la micelas es su poder solubilizante sobre hidrocarburos, reactivos neutros, etc, es decir, sobre especies poco solubles o insolubles en fase acuosa. El proceso de solubilización micelar es un proceso dinámico donde el soluto está en equilibrio entre la micela y la fase acuosa (100). Una solubilización adecuada implica que el soluto se localice, estadísticamente, la mayor parte del tiempo en el interior o en la superficie micelar (101). Surge de esta forma el concepto de *tiempos medios de residencia* del soluto en la micela. Dependiendo de las posibles interacciones electrostáticas o hidrófobas de un soluto con las micelas, pueden existir distintos lugares preferentes de solubilización (102). Así, un soluto poco polar se situará preferentemente en las proximidades del núcleo micelar en tanto que un soluto anfifílico estará colocado en las cercanías de la superficie, y un soluto iónico,

cuya carga sea contraria a la de los grupos cabeza del agente micelar, se fijará preferentemente sobre la superficie micelar.

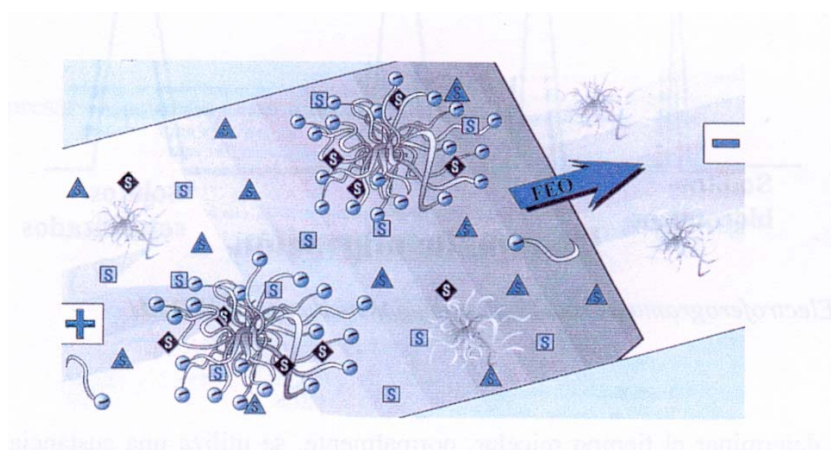
Una segunda propiedad importante de los medios micelares es su capacidad para concentrar o separar reactivos. La solubilización selectiva de reactivos en la micela los acerca respecto a su situación en la disolución acuosa y se ven favorecidas reacciones que en fase acuosa eran lentas.

La tercera propiedad de las micelas es su capacidad para alterar el microentorno del soluto que se ha solubilizado. Se producen cambios sustanciales de la fase acuosa al interior de la micela en propiedades tales como la acidez, la viscosidad, la constante dieléctrica o la polaridad. La consecuencia inmediata son los cambios en los equilibrios, en las propiedades espectrales y en la reactividad del soluto solubilizado (103).

En lo que se refiere al uso de estos agentes micelares en la ECEM deben cumplir una serie de requisitos esenciales:

- ⇒ Ser suficientemente solubles en el tampón como para formar micelas.
- ⇒ La solución micelar debe ser homogénea y transparente al ultravioleta.
- ⇒ La solución micelar debe tener baja viscosidad.

La separación depende del reparto del soluto entre las micelas y el tampón de separación (figura 1.24). En la ECEM, se añade al tampón de separación un surfactante por encima de su concentración micelar crítica dando lugar a la formación de micelas en el tampón de separación. Se originan así dos fases, una acuosa y otra micelar (pues las micelas suelen presentar carga).

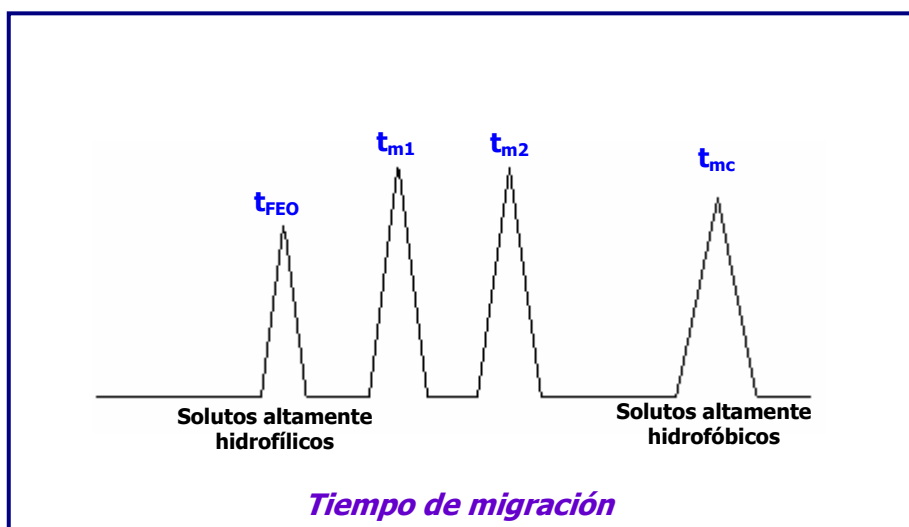


**Figura 1.24.** Esquema de separación en ECEM con micelas aniónicas

Si inyectamos una muestra formada únicamente por compuestos eléctricamente neutros en un sistema constituido por un surfactante que forme micelas aniónicas y donde la movilidad electroforética de las micelas es superior a la del FEO, éstas serán atraídas hacia el ánodo al aplicar el campo eléctrico, pero el FEO las impulsará hacia el cátodo. Los compuestos hidrofílicos permanecerán en el tampón y no entrarán en la cavidad hidrofóbica de la micela, por lo tanto migrarán a la misma velocidad que el FEO. Las moléculas muy hidrofóbicas entrarán en las micelas y no tendrán ninguna tendencia a salir de ellas por lo que su tiempo de migración coincidirá con el de las micelas ( $t_{mc}$ ).

Las moléculas que son parcialmente solubles en las micelas se distribuirán entre éstas y el tampón estableciéndose un equilibrio entre ambas fases según una constante de reparto. Éstas saldrán en un tiempo comprendido entre el tiempo del FEO y el tiempo micelar y que vendrá determinado por su

hidrofobicidad, es decir, el tiempo que estos permanecen en la micela. Este fenómeno se representa en la figura 1.25. A la diferencia entre el tiempo al que salen las micelas y al que sale el flujo se conoce como *ventana de retención*.



*Figura 1.25. Electroferograma de analitos separados mediante la ECEM*

Para determinar el tiempo micelar, normalmente, se utiliza una sustancia altamente hidrófoba como el Sudán III, Sudán IV y también el amarillo OB. Para determinar el tiempo del FEO se suele utilizar una sustancia hidrófila que no se introduce en la micela como es el metanol.

La resolución en ECEM entre dos picos adyacentes puede ser expresada en función de la eficiencia, selectividad y retención como:

$$R_s = \frac{N^{1/2}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \frac{K_2}{1 + K_2} \left[ \frac{1 - \frac{t_{FEO}}{t_{mc}}}{1 + \frac{t_{FEO}}{t_{mc}} K_1} \right]$$

Donde N es la eficiencia expresada como el número de platos teóricos,  $\alpha$  es la selectividad ( $K'_2/K'_1$ ) y los subíndices 1 y 2 son los referentes al primer y al segundo soluto.

Según Foley, el factor de capacidad óptimo para obtener la máxima resolución por unidad de tiempo, viene dado por un valor comprendido entre 1.2 y 2.

Además de la concentración del tampón, un gran número de efectos tienen influencia sobre la separación en ECEM, como son la naturaleza del surfactante, la temperatura del tampón y la utilización de aditivos como los modificadores orgánicos. La naturaleza del detergente puede afectar a la resolución ya que ésta influye sobre  $K'$ ,  $\alpha$  y la relación  $t_{FEO}/t_{mc}$ . Además la resolución puede verse influida por la adición de modificadores orgánicos al tampón.

Hasta ahora se ha comentado únicamente la posibilidad de separar compuestos neutros, pero con esta modalidad de EC se pueden separar compuestos cargados. Esta característica se ha aprovechado sobre todo para separar compuestos con idénticas movilidades electroforéticas y que no pueden ser separados por ECZ.

Normalmente una muestra puede contener analitos cargados y neutros, así, cuando se procede a su separación por ECEM, los neutros se separarán en función de su distribución entre el tampón y la micela y los que presentan carga, en función de sus movilidades o en función de sus interacciones con las micelas dependiendo de su carga y de la carga de las micelas.

Por tanto, si se utiliza un surfactante aniónico los aniones no interaccionan fuertemente con las micelas y se separan en función de sus movilidades como es el caso de la ECZ. Algunos autores han sugerido que incluso pueden solubilizarse ciertos aniones en las micelas. Para los cationes hay que decir que serán atraídos por las micelas cargadas negativamente e interaccionarán fuertemente con ellas. Así, éstos se separarán en función de sus respectivas movilidades, de sus interacciones iónicas con las micelas y en función de la posible solubilización del soluto dentro de la micela. Como consecuencia de esta solubilización los tiempos de migración sufren ligeros aumentos.

La temperatura tiene un efecto importante en la separación en ECEM debido a varios aspectos que se enumeran a continuación:

→ Porque las micelas sólo se forman cuando se sobrepasa una temperatura micelar crítica denominada punto de Kraft, independientemente de la concentración del surfactante.

→ La temperatura influye en el coeficiente de partición del soluto. Un aumento de temperatura provoca una disminución del coeficiente de partición.

→ Influye sobre el factor de capacidad  $K'$  y en la eficiencia observándose una disminución en estos factores con el aumento de la temperatura (104).

→ Disminuye el tiempo de análisis y, normalmente, disminuye la resolución.



### ***Optimización de la precisión de las medidas en Electroforesis Capilar***

El control de ciertos parámetros es fundamental en EC para asegurar una buena repetitividad y reproducibilidad de las medidas tanto a nivel de tiempos de migración como de áreas de pico corregidas (APC) que se utilizan para la cuantificación de los analitos.

El *tiempo de migración* de un compuesto ya ha sido definido como el tiempo que transcurre entre la inyección de dicho compuesto y su detección.

El *área de pico* es proporcional a la concentración, pero depende igualmente de la velocidad a la que se desplace el compuesto dentro del capilar. El tiempo que tarda el soluto en atravesar el detector varía con su movilidad, los solutos con baja movilidad darán áreas más grandes, por lo que se hace casi indispensable corregir esa área en función del tiempo de migración hablándose entonces de APC (105):

$$APC = \frac{Area}{t_m}$$

Los principales factores que deben someterse a control son:

⇒ *Acondicionamiento del capilar*: Antes de realizar cualquier separación es necesario, como ya se ha comentado, activar el capilar mediante una serie de lavados y una separación. Una vez activado se puede comenzar a utilizar para

realizar las separaciones deseadas. Para evitar diferencias entre separación y separación será necesario restablecer la superficie del capilar con NaOH.

⇒ *Concentración adecuada de la muestra:* La inyección de una muestra en concentración adecuada es esencial para obtener una buena repetitividad a nivel de áreas de pico, ya que disminuirán los errores de integración.

⇒ *Mantenimiento del pH durante las separaciones:* La aplicación de un potencial se traduce en una electrolisis de las disoluciones situadas en ánodo y cátodo. El resultado es una acidificación y una alcalinización progresivas de dichas disoluciones tampón que afectará a los tiempos de migración y a la selectividad. El número de separaciones que podrán soportar los electrolitos vendrá determinado por la capacidad tamponadora y las condiciones de operación (voltaje aplicado y duración de la separación).

⇒ *Regulación de la temperatura del capilar:* Una variación en la temperatura se ha relacionado con una variación en la viscosidad del electrolito, como consecuencia de ello se ven afectados los volúmenes de muestra inyectados y las movilidades de los compuestos. La regulación de la temperatura debe ser tan eficaz como para permitir que en todos los puntos del capilar se obtenga una temperatura idéntica y constante.

⇒ *Tiempo de inyección:* El volumen inyectado cuando se recurre a la inyección hidrodinámica es función de la presión aplicada y del tiempo de inyección. Un tiempo de inyección superior a 2 s asegura una buena repetitividad de los volúmenes inyectados.

⇒ *Nivel de electrolito en los viales de separación:* Es prácticamente imprescindible que los viales que contienen electrolito y que se van a utilizar para

separar tengan el mismo volumen, es decir, que estén a un mismo nivel, para evitar un fenómeno de sifonaje. Si se van a realizar muchas separaciones habrá que reemplazar los viales para evitar esas diferencias de nivel.

⇒ *Gradiente de potencial*: El modo en que se aplique el potencial debe ser gradual y progresivo para evitar un calentamiento del medio que conducirá a la expansión del líquido y a la pérdida de una parte del volumen de la muestra inyectada que fluiría hacia el exterior del capilar.

### ***Aplicaciones de la Electroforesis Capilar***

La EC es una técnica de separación que cada día cobra más importancia a nivel de análisis de rutina. Esto es debido a su amplio rango de aplicación que incluye los ámbitos farmacéutico, clínico, forense, ambiental, de análisis de los alimentos, etc. Se pueden encontrar desde separaciones de iones metálicos en muestras acuosas, de aminas en vinos, compuestos acídicos en alimentos, aniones en residuos de explosivos, fármacos en fluidos biológicos, proteínas y péptidos en muestras bioquímicas, etc. A continuación, en la tabla 1.4 se resumen algunas de las principales aplicaciones de las distintas modalidades de EC y el tipo de muestras donde se ha aplicado dicha separación.

*Tabla 1.4. Principales aplicaciones de la EC*

<b>Modalidad</b>	<b>Analitos</b>	<b>Muestras</b>
ECZ	Iones metálicos, moléculas orgánicas pequeñas, aminas, ácidos, carbohidratos, proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, etc.	Aguas, fluidos biológicos, jugos, vinos, champú, productos de degradación, etc. (106-111)
ECEM	Fármacos, antibióticos, péptidos, drogas ilícitas, compuestos derivados del benceno, flavonoides, ácidos nucleicos, aminoácidos derivatizados, hormonas, vitaminas, etc.	Productos farmacéuticos, fluidos biológicos, aguas, productos naturales, etc. (112-123)

### ***1.3.B. Técnicas Electroquímicas***

Las técnicas electroanalíticas se basan en reacciones electroquímicas. Una reacción electroquímica es una reacción redox en la que el intercambio de electrones tiene lugar en un electrodo.

Las técnicas electroquímicas de análisis, o técnicas electroanalíticas, son, en general, menos utilizadas que las espectroscópicas o cromatográficas. Posiblemente, una de las causas radique en el poco conocimiento que se tiene de esta rama de la Ciencia pues, aunque la teoría de la Electroquímica no es más compleja ni abstracta que la de la Espectroquímica, sin embargo, es mucho menos conocida. Otra causa por la que las técnicas electroanalíticas no se utilizan muy extensamente en la práctica analítica ordinaria es que, por su propia naturaleza, ofrecen menos posibilidades de automatización que otras técnicas analíticas.

Frente a los inconvenientes mencionados, las técnicas electroanalíticas ofrecen importantes ventajas, entre los que cabe citar:

- Mayor especificidad para un determinado estado de oxidación. Por ejemplo, por técnicas electroquímicas puede determinarse la cantidad de  $\text{Fe}^{2+}$  y la de  $\text{Fe}^{3+}$  presentes en una mezcla de ambas especies, mientras que muchas técnicas espectroquímicas proporcionan únicamente la cantidad total de hierro.

- Muchas técnicas electroanalíticas proporcionan información sobre la actividad de una determinada especie, en lugar de hacerlo sobre la concentración, lo cual puede ser interesante en ciertas ocasiones.

- La instrumentación es, en general, relativamente barata.

### ***Clasificación de las técnicas electroanalíticas***

Las aplicaciones electroquímicas al análisis tienen su fundamento en la evolución de la intensidad, potencial, tiempo y resistencia a medida que transcurren las reacciones, representada dicha evolución generalmente por las curvas intensidad-potencial. En las distintas técnicas se utilizan las curvas completas, partes de las curvas, o simplemente puntos, siendo la intensidad la variable cuantitativa y el potencial la cualitativa.

El desarrollo tecnológico experimentado en los últimos tiempos ha permitido que el número de propiedades electroquímicas utilizadas en análisis haya crecido considerablemente, lo cual se traduce en un número muy elevado de técnicas electroquímicas. Debido a ello, es difícil establecer una clasificación convincente. Una clasificación es la que se realiza en la tabla 1.5, en la que se hace distinción entre las técnicas en que no se produce transferencia electrónica neta, y en las que, efectivamente, tiene lugar una reacción electródica.

Las técnicas sin transferencia electrónica neta pueden considerarse estrictamente físicas. El movimiento de cargas se produce fundamentalmente por migración, o mediante fenómenos de polarización dieléctrica. Se basan en

medidas de conductividades de disoluciones de electrolitos usando corriente alterna.

**Tabla 1.5. Clasificación de las técnicas electroquímicas**

<b>I. Técnicas sin transferencia electrónica neta (transporte de carga por migración y polarización dieléctrica)</b>	
	Conductimetría
	Valoraciones conductimétricas
	Oscilometría
<b>II. Técnicas con transferencia electrónica neta</b>	
<b>Variable</b>	<b>Métodos</b>
Potencial	Potenciometría directa
	Valoraciones potenciométricas
	Valoraciones cronopotenciométricas
Intensidad	Amperometría
	Valoraciones amperométricas
	Cronoamperometría
Intensidad y Potencial	Voltamperometría
	Polarografía
	Voltamperometría de redisolución
Cantidad de electricidad	Columbimetría
	Valoraciones culombimétricas
	Electrogravimetría

Pero en esta sección nos centraremos en polarografía y las técnicas voltamperométricas que se comentaran a continuación.

### ***POLAROGRAFÍA***

La determinación de la concentración de analito por medida de la intensidad de la corriente de electrólisis utilizando electrodos sólidos, como por ejemplo, platino, presenta toda una serie de dificultades asociadas con la no reproducibilidad de las respuestas del electrodo por depósitos producidos sobre su superficie y otros factores. La solución a muchos de estos problemas se consigue utilizando como indicador un electrodo de gotas de mercurio (DME), introducido por Heyrovsky en 1922 y que dio origen a la técnica conocida como polarografía (124).

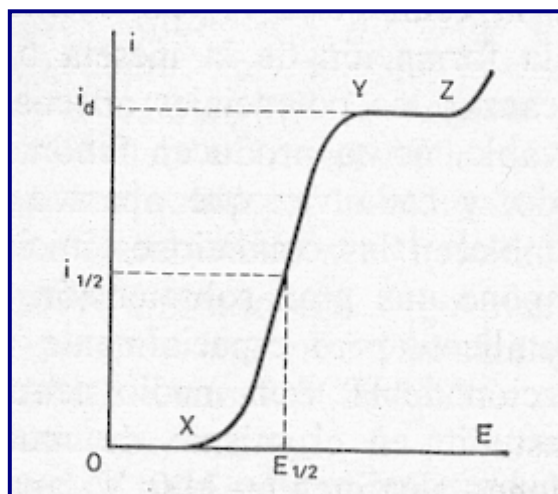
Durante los 15-20 años que siguieron a su descubrimiento se llevaron a cabo todo un conjunto de estudios relacionados con la teoría, metodología y desarrollo de la instrumentación, lo que determinó que la polarografía llegara a ser una de las técnicas más usadas en Química Analítica. Después de esta expansión inicial, por el advenimiento de las técnicas espectroscópicas de llama, la polarografía clásica quedó relegada a un segundo plano en cuanto al análisis rutinario, pasando a convertirse en una herramienta para estudios básicos, procesos de corrosión, mecanismos y cinética electroquímica.



En época relativamente reciente, el perfeccionamiento de la instrumentación y la introducción de modernas variantes de los métodos polarográficos clásicos han proporcionado un nuevo impulso a esta técnica, de forma que en la actualidad se utiliza extensamente para la determinación de las más variadas especies orgánicas e inorgánicas, a niveles de partes por billón y en áreas tales como análisis toxicológico y ambiental, Bioquímica, Farmacia, Geología y para análisis rutinario de control de calidad.

### **El Polarograma**

La curva intensidad-potencial obtenida con un electrodo de trabajo de gotas de mercurio se denomina polarograma. Esta curva presenta una forma característica (ver figura 1.26), con una meseta o límite superior de corriente. A la corriente límite se le denomina *corriente de difusión*,  $i_d$ , que es proporcional a la concentración de sustancia en disolución, y al potencial correspondiente a la mitad de esta corriente, potencial de semionda,  $E_{1/2}$ , que es característico de cada sustancia.



**Figura 1.26.** Polarograma

La relación entre el potencial,  $E$ , en cada punto de la onda polarográfica y el correspondiente valor de la corriente,  $i$ , viene dada por la ecuación fundamental de la polarografía:

$$E = E_{1/2} - \frac{0.059}{n} \log \frac{i}{i_d - i}$$

La relación entre la concentración de la especie electroactiva y la corriente de difusión viene dada por la ecuación de Ilkovic:

$$i = 708nD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}C$$

donde  $n$  representa el número de electrones que intervienen en la reacción electroquímica;  $D$  es el coeficiente de difusión ( $\text{cm}^2/\text{s}$ );  $m$ , el flujo de mercurio ( $\text{mg}/\text{s}$ );  $t$ , el tiempo de goteo (segundos), y  $C$ , la concentración ( $\text{mM}$ ); la corriente viene dada en microamperios.

#### Factores que influyen sobre la intensidad de difusión

En la ecuación de Ilkovic se pone de manifiesto la intervención de dos clases de factores sobre la intensidad de difusión: los relativos a la disolución, como  $n$ ,  $D$  y  $C$ , y los relacionados con el electrodo, como  $m$  y  $t$ .

##### ✓ Concentración

Si las características del electrodo permanecen invariables, así como la naturaleza de la disolución,  $i_d$  es proporcional a  $C$ , siendo esta relación la base de la aplicación cuantitativa de la polarografía.

$$i_d = k \cdot C$$

Esta relación es lineal para concentraciones comprendidas aproximadamente entre  $10^{-5}$  y  $10^{-3}$  M. Para concentraciones menores de  $10^{-5}$  M,

la corriente capacitiva puede ser del mismo orden de magnitud, o incluso superior, a la corriente de electrólisis. Mientras que para concentraciones mayores de  $10^{-3}$  M, la densidad de la disolución puede modificarse en las proximidades del electrodo, lo que provocaría movimientos de convección.

Además de las mencionadas, puede haber otras causas para la no linealidad entre  $i_d$  y  $C$ , entre las que pueden citarse:

a) Causas aparentes:

- Presencia de impurezas.
- Adsorción de la especie electroactiva por el propio recipiente, sobre todo cuando se trabaja con concentraciones bajas.
- Descomposición de la especie electroactiva por reacción con algún constituyente de la capa de difusión.
- Evaporación del disolvente durante el proceso de eliminación del oxígeno disuelto.

b) Causas reales, debidas a procesos no controlados por difusión, tales como:

\* Procesos catalíticos, cinéticos y de adsorción.

✓ Características del electrodo

Debido a que  $i_d$  es proporcional a  $m^{2/3}t^{1/6}$ , un conocimiento de las variables que influyen sobre  $m$  y  $t$  es importante en polarografía.

El flujo de mercurio,  $m$ , y el tiempo de goteo,  $t$ , dependen de las dimensiones del capilar y de la presión del mercurio debida a la diferencia de niveles entre el depósito y el extremo del capilar.

### **Características del electrodo de gotas de mercurio**

El electrodo de gotas de mercurio consiste en un capilar de vidrio (de 0.06-0.08 mm de diámetro interno y entre 10 y 15 cm de longitud) conectado mediante un tubo de teflón a un depósito que contiene mercurio. Las gotas de mercurio formadas en el extremo del capilar caen a velocidad constante, actuando cada gota de electrodo indicador.

La utilización de este electrodo presenta ventajas e inconvenientes, que se relacionan seguidamente:

Las principales **ventajas** del electrodo de gotas de mercurio son:

- ✓ Las curvas intensidad-potencial obtenidas en DME son muy reproducibles, ya que el área del electrodo se renueva continuamente (con lo que no hay riesgo de contaminación) y se puede controlar perfectamente regulando la altura del depósito de mercurio. Como es un movimiento periódico, cualquier perturbación es momentánea: puede producirse en una gota, pero no en la siguiente.
- ✓ EL DME presenta una elevada sobretensión para la reducción de los iones  $H^+$ , lo cual amplía considerablemente el campo para efectuar reducciones en medio ácido. Así, mientras que sobre platino, los iones  $H^+$  se reducen

aproximadamente a un potencial de 0 v, sobre mercurio puede llegarse hasta potenciales inferiores a -1.1 v. Esto posibilita la reducción de una gran cantidad de especies en medio ácido, cosa que no sería posible con un electrodo de platino.

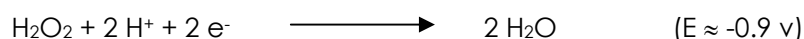
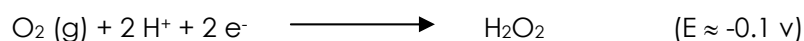
✓ La cantidad de sustancia electrolizada es muy pequeña, ya que el área de la gota y las corrientes de electrólisis también lo son.

En cuanto a los **inconvenientes**, cabe citar:

✗ La oxidación del mercurio tiene lugar a potenciales ligeramente superiores a 0 v, lo cual limita el uso del electrodo como ánodo.

✗ La presencia de una corriente residual capacitiva puede ser mayor que la propia corriente de electrólisis para concentraciones de analito de, aproximadamente,  $10^{-5}$  M. Éste es el factor limitante de la sensibilidad de los métodos polarográficos clásicos.

✗ Una dificultad inherente al análisis es la interferencia del oxígeno disuelto, debido a que produce dos ondas de reducción correspondientes a los procesos:



Por este motivo es necesario eliminar el oxígeno disuelto cuando se van a efectuar reducciones en ese margen de potenciales. La forma usual de eliminar el oxígeno disuelto es burbujear nitrógeno durante unos minutos a través de la disolución que contiene el analito.

## **TÉCNICAS POLAROGRÁFICAS**

En esta sección llevaremos a cabo un resumen de las características principales de la técnica utilizada en esta Memoria:

### **Polarografía diferencial de pulso (DPP)**

Las limitaciones que plantea la polarografía clásica en la determinación de trazas, en concentraciones del orden de  $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  M, debido a la gran componente de la corriente de carga, que enmascara e imposibilita la medida de la corriente faradaica, necesaria para la determinación exacta de la concentración de la especie electroactiva, fueron superadas con la aparición de esta moderna técnica polarográfica que surge por primera vez en el año 1960, siendo introducida por Barker (125,126) y posteriormente perfeccionada por otros autores (127-129).

Las bases primordiales de esta técnica son:

- El potencial de base aplicado a cada gota no es constante y se modifica en la siguiente, en un incremento constante o pulso de potencial aplicado.
- La altura de pulso permanece constante respecto al potencial base.
- Para cada gota se realizan dos medidas de intensidad, una antes de la aplicación del pulso y la otra un momento antes de la caída de la gota, siendo

por tanto la intensidad resultante la diferencia entre la segunda medida y la primera, de ahí el nombre de la técnica.

☛ El tiempo de aplicación del pulso es del orden de 50 milisegundos y se aplica al final de la vida de cada gota, que tiene un tiempo de vida del orden de 0.5 a 4 segundos.

La respuesta polarográfica de esta técnica es un pico, la razón de esta fisonomía, distinta a la de la onda clásica, es explicable desde un punto de vista cualitativo.

Al principio de la experiencia, cuando el potencial base es más positivo que el potencial de semionda de la especie involucrada en el proceso catódico, no existe paso de corriente faradaica como respuesta a la aplicación del potencial anterior al impulso y cuando en los últimos momentos de la vida de la gota se aplica el impulso, éste suele ser demasiado pequeño para estimular el proceso faradaico, por ello la única respuesta es una pequeña corriente que, además de ser pequeña, se ve minimizada por ser la diferencia de dos valores muy próximos.

Cuando el potencial base, o potencial aplicado en el tiempo de espera, es tal que se produce ya una reducción aunque sea a una velocidad inferior a la máxima, la aplicación del impulso magnifica la corriente faradaica. En estas zonas de potencial es donde mejor responde la técnica, ya que es donde pequeñas diferencias de potencial pueden provocar mayores diferencias entre las corrientes faradaicas que fluyen antes y después de la aplicación del impulso.

Una vez sobrepasado el potencial de semionda y como ya el potencial base cae dentro de la zona controlada por difusión, la especie electroactiva se



reduce durante el periodo previo a la aplicación del impulso con la mayor velocidad posible, con lo que la aplicación de dicho impulso no puede aumentar la velocidad y de ahí que la diferencia medida entre las intensidades sea siempre pequeña, aunque significativamente mayor que en la primera de las zonas consideradas.

Aunque existen algunos factores reales que apartan esta técnica de la idealidad del tratamiento indicado, ésta es cualitativamente la causa de que los polarogramas en DPP sea siempre curvas en forma de pico no totalmente simétricas (ver figura 1.27).

Para la utilización de esta técnica es necesario que exista sincronización entre el tiempo de goteo del electrodo de gotas de mercurio y la frecuencia de los impulsos aplicados. Ésta se adquiere mediante un dispositivo de "sincronismo forzado", consistente en un pequeño "martillo" que golpea el capilar, provocando la caída de la gota. La frecuencia del golpeo (y, en consecuencia, el tiempo de goteo) puede controlarse electrónicamente y sincronizarse con la aplicación de los impulsos de corriente y la medida de las intensidades.

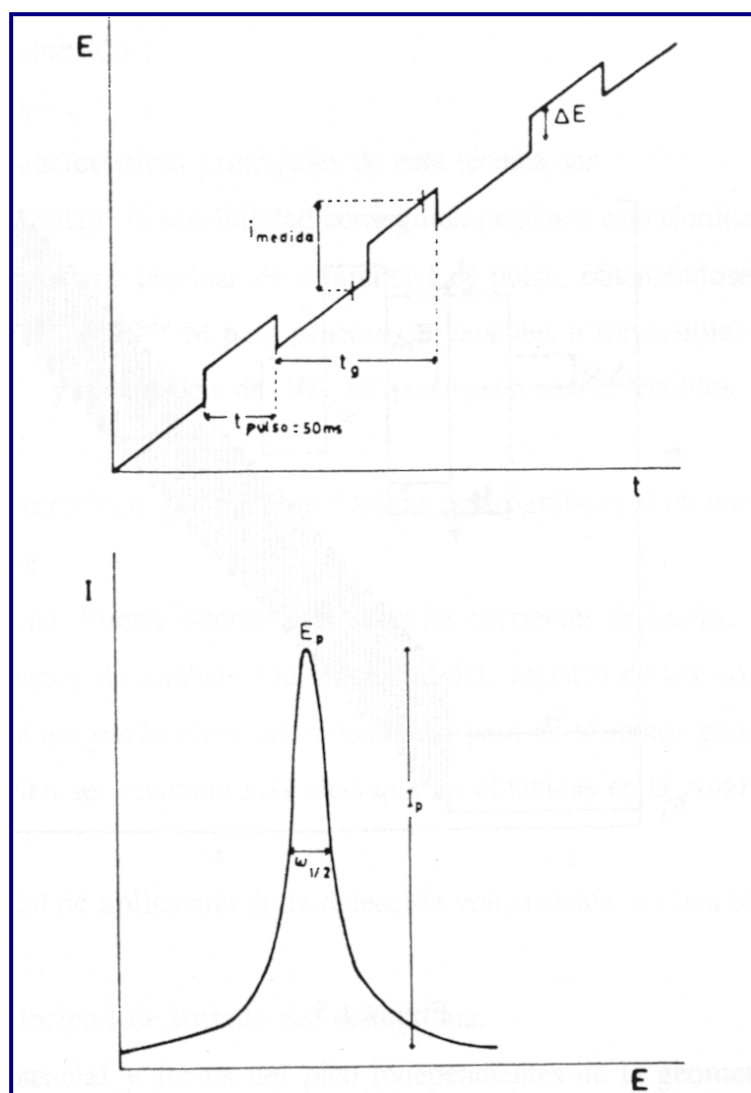


Figura 1.27. Principios de la polarografía diferencial de pulso.

## ***TÉCNICAS VOLTAMPEROMÉTRICAS***

Las técnicas voltamperométricas incluyen un conjunto de técnicas electroanalíticas en las que la información sobre el analito se obtiene a partir de medidas de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado al electrodo indicador o de trabajo. Las medidas voltamperométricas implican un consumo mínimo de especie electroactiva (tiene lugar una microelectrólisis) a diferencia de otros tipos de técnicas electroquímicas.

Históricamente, la voltamperometría se desarrolló a partir de la *polarografía*, que es un tipo particular de voltamperometría. La polarografía, que todavía es una rama importante de la voltamperometría, difiere de los otros tipos de voltamperometrías en que el electrodo de trabajo es un electrodo de gotas de mercurio (dropping mercury electrode, DME).

La voltamperometría es utilizada ampliamente por los químicos inorgánicos, los químico-físicos y los bioquímicos con objetivos no analíticos que incluyen estudios fundamentales de procesos de oxidación y reducción en diversos medios, procesos de adsorción sobre superficies y mecanismos de transferencia de electrones en superficies de electrodos químicamente modificados. Hace algunos años, la voltamperometría (en particular la polarografía clásica) fue utilizada con frecuencia por los químicos para la determinación de iones inorgánicos y ciertas especies orgánicas en disoluciones acuosas. A finales de los años cincuenta y principio de los años sesenta, sin embargo, estas aplicaciones analíticas fueron ampliamente sustituidas por diversos métodos espectroscópicos y la voltamperometría dejó de ser importante

en análisis excepto para ciertas aplicaciones especiales, tales como la determinación de oxígeno molecular en disoluciones.

A mediados de los años sesenta, se desarrollaron varias modificaciones importantes de las técnicas voltamperométricas clásicas para exaltar significativamente la sensibilidad y la selectividad del método. Al mismo tiempo, el advenimiento del bajo coste de los amplificadores operacionales hizo posible el desarrollo comercial de instrumentos relativamente baratos que incorporaban muchas de estas modificaciones y los hacían asequibles a todos los químicos. El resultado ha sido el reciente resurgimiento del interés en la aplicación de los métodos voltamperométricos para determinación de una multitud de especies, en particular de aquellas de interés farmacológico (130). La voltamperometría moderna continúa siendo también una herramienta útil para algunos químicos interesados en estudios de reacciones de oxidación y reducción al igual que de procesos de adsorción.

### **Sistema voltamperométrico**

El esquema sería el siguiente:

- ➔ Una fuente de señal.
- ➔ Un generador de barrido lineal de potencial.
- ➔ Un circuito de control potencioestático.

➔ Una celda, la cual consta de tres electrodos sumergidos en una disolución que contiene al analito.

⇒ Uno de los tres electrodos es el microelectrodo o electrodo de trabajo, cuyo potencial varía linealmente con el tiempo. Sus dimensiones son de tamaño reducido con el objeto de exaltar su tendencia a ser polarizado.

⇒ Un segundo electrodo, es un electrodo de referencia cuyo potencial permanece constante durante la medida.

⇒ El tercer electrodo es un electrodo auxiliar o contraelectrodo, que normalmente es una espiral de hilo de platino. Sirve simplemente para conducir la electricidad desde la fuente a través de la disolución al microelectrodo.

### **Microelectrodos**

Los microelectrodos utilizados en voltamperometría tienen una variedad de configuraciones y formas.

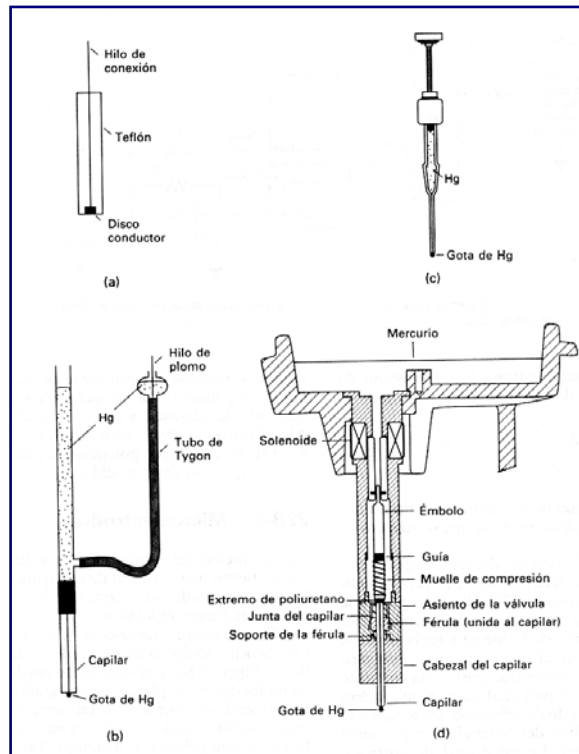
Los microelectrodos de mercurio han sido ampliamente utilizados en voltamperometría por diversas razones. Una de ellas es el intervalo de potenciales negativos relativamente elevado. Además, es fácil formar una superficie metálica produciendo simplemente una nueva gota. Hay que añadir que numerosos iones metálicos se reducen reversiblemente a amalgamas en la superficie de un electrodo de mercurio, lo que simplifica la química del proceso. Los microelectrodos de mercurio tienen diferentes formas. La más simple es un

electrodo de película de mercurio formado por electrodeposición del metal sobre un electrodo de disco como el que se muestra en la figura 1.28.a. La figura 1.28.b muestra un electrodo de gota colgante de mercurio (hanging mercury drop electrode, HMDE). El electrodo, que es asequible de fuentes comerciales, consiste en un tubo capilar muy delgado conectado a un depósito que contiene mercurio. El metal es forzado a salir del capilar mediante un pistón movido por la rosca de un micrómetro. El micrómetro permite la formación de gotas cuyas áreas superficiales son reproducibles en más de un cinco por ciento.

La figura 1.28.c muestra un electrodo de gotas de mercurio típico (DME), que se utiliza en prácticamente todas las mediciones polarográficas. Consiste en un tubo capilar fino de aproximadamente 10 cm (d.i.  $\approx$  0.05 mm) a través del cual se fuerza a salir al mercurio mediante una columna de mercurio de quizás unos 50 cm. El diámetro del capilar es tal que se forma una nueva gota cada 2 a 6 s. El diámetro de la gota es de 0.5 a 1 mm y es muy reproducible. En algunas aplicaciones, el tiempo de gota se controla con un mecanismo que hace caer la gota a un tiempo determinado después de su formación.

La figura 1.28.d muestra un electrodo de mercurio disponible comercialmente que puede operar como electrodo de gotas de mercurio y como electrodo de gota colgante. El mercurio está contenido en un depósito revestido de plástico unos 10 cm por encima de la parte superior del capilar. Un muelle aprieta el émbolo que tiene una terminación de poliuretano contra el tubo del capilar y evita la salida del mercurio. Este émbolo se mueve activado por el solenoide con una señal del sistema de control. Los capilares tienen un diámetro mucho mayor (0.15 mm) que los típicos. Como resultado la formación de las gotas es extremadamente rápida. Después de 50, 100 ó 200 ms, la válvula

se cierra, dejando una gota del tamaño adecuado colgando hasta que cae debido a la acción de un mecanismo situado en el interior del bloque que soporta el electrodo. Este sistema tiene la ventaja de permitir que se formen rápidamente gotas ya de su tamaño final y además las medidas de corriente se pueden retrasar hasta que la superficie de la gota sea estable y constante.



**Figura 1.28.** Algunos tipos comunes de microelectrodos. a) electrodo de disco; b) electrodo de gota colgante de mercurio; c) electrodo de gotas de mercurio; d) electrodo de gotas de mercurio estacionario.

### ***Técnicas Voltamperométricas utilizadas***

En esta sección llevaremos a cabo un resumen de las características principales de técnicas utilizadas en esta Memoria:

#### ***Voltamperometría Cíclica***

Se incluye dentro del grupo de técnicas electroquímicas utilizadas para estudiar la composición de las disoluciones a través de relaciones entre la intensidad y el potencial. Las principales diferencias de esta técnica respecto a las demás son:

- ✓ La utilización de un barrido de potencial lineal; la ciclovoltamperometría muestra siempre un cambio triangular en el potencial, moviéndose entre dos valores de potencial:  $E_i$  (potencial inicial) y  $E_f$  (potencial final) (ver figura 1.29).
- ✓ La posibilidad de utilizar velocidades de barrido altas con respecto a las utilizadas en otras técnicas lo que mejora con ciertas limitaciones la sensibilidad del método, así como reduce considerablemente el tiempo necesario para la realización del voltamperograma.
- ✓ El barrido de I/E se realiza sobre un electrodo de gota estacionario o colgante (HMDE).



Esta técnica no es usada en primer término para el estudio de un proceso electroquímico pero constituye, una vez conocidas las características analíticas del proceso, el método más rápido para la elucidación del mecanismo electroquímico y de su naturaleza. Así, con esta técnica se pueden evaluar los siguientes aspectos:

⇒ Morfología de los voltamperogramas: en procesos controlados por difusión, la intensidad de corriente crece hasta alcanzar un máximo, a partir del cual disminuye ligeramente hasta un valor que se mantiene constante en un intervalo de potenciales, debido a la difusión de la especie, ya oxidada o reducida hacia la interfase. Por otra parte, los procesos controlados por adsorción presentan ondas en las que la disminución de la intensidad de corriente se alcanza rápidamente después del máximo, dando curvas en forma de campana. Esto indica, que la especie electroactiva, que ya ha sido reducida u oxidada, no difunde a la interfase y está envenenando el electrodo, disminuyendo considerablemente su conductividad.

⇒ Variación del cociente  $I_p/C$ : El valor de esta relación se mantiene constante para los procesos difusivos, ya sean reversibles o irreversibles. En el caso de un proceso de adsorción, esta relación aumenta al disminuir la concentración o se hace constante para concentraciones bajas, apareciendo una variación no lineal de  $I_p$  con la concentración.

⇒ Influencia de la concentración de sustancia electroactiva en la intensidad de pico: para la difusión de una sustancia electroactiva hacia un electrodo

estacionario, en una disolución sin agitación, cuando se provocan barridos de potencial lineales o cíclicos, la intensidad del pico obtenido en el registro de la curva I/E depende de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido y es directamente proporcional a la concentración (C).

⇒ Variación de la intensidad del pico con la velocidad de barrido y diferencia entre los potenciales de pico catódico y anódico: en los estudios por Voltamperometría Cíclica y cuando el proceso está controlado por la adsorción, se cumple que la intensidad de pico es función de la velocidad de barrido y, asimismo, que los potenciales de pico catódico y anódico son iguales. De la diferencia existente entre los potenciales de pico, podemos obtener información de los procesos electródicos (ver figura 1.29). Así, para una reacción de electrodo reversible, los potenciales de pico anódico y catódico están separados por un incremento de potencial que viene dado por la expresión:

$$(E_p)_a - (E_p)_c = 0.058/n$$

Para procesos cuasi-reversibles, los potenciales de pico a bajas velocidades de barrido pueden estar separados por valores mayores de los esperados según la ecuación anterior, mientras que para un sistema totalmente irreversible puede no aparecer un pico o bien los picos anódicos y catódicos pueden estar muy separados.

⇒ Variación de la intensidad de pico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido: en los procesos controlados por difusión, tanto en sistemas reversibles como irreversibles, la relación existente entre la intensidad de pico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido debe ser una recta.

La voltamperometría cíclica se utiliza normalmente para proporcionar información cualitativa sobre procesos electroquímicos en diversas condiciones.

La voltamperometría cíclica, siempre y cuando no se utilice para análisis de rutina cuantitativo, es una herramienta importante para el estudio de los mecanismos y de las velocidades de procesos de oxidación/reducción, en particular para sistemas orgánicos y de metales con compuestos orgánicos. A menudo, los voltamperogramas cíclicos revelan la presencia de intermedios en las reacciones de oxidación, como es el caso del estudio voltamperométrico que se realizó a un insecticida agrícola, Paratión, en tampón acetato 0.5 M pH 5 en etanol al 50% (131).

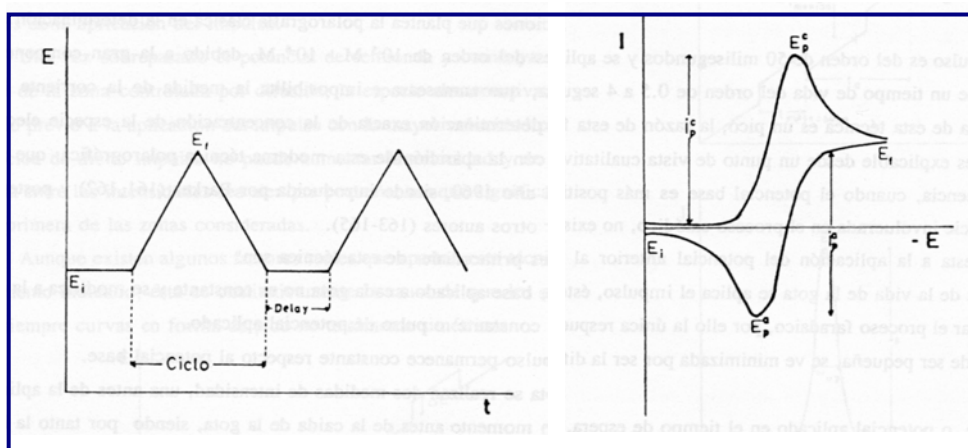


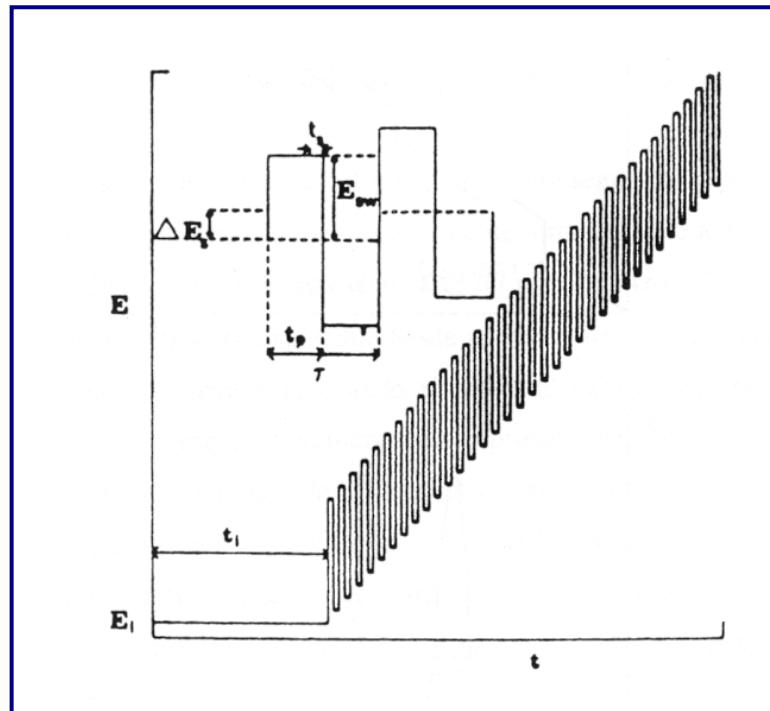
Figura 1.29. Principios de la Voltamperometría Cíclica.

### ***Voltamperometría de onda cuadrada***

Los trabajos iniciales de Ramaley y Krause de voltamperometría de onda cuadrada aparecieron en 1969 (132,133), éstos han sido seguidos por al menos otros 30 trabajos en los que esta técnica ha sido discutida. En este espacio de tiempo la técnica de onda cuadrada ha recibido una gran cantidad de nombres y el término de onda cuadrada se ha aplicado a una serie de técnicas voltamperométricas que tienen en común la utilización de una onda cuadrada para la variación del potencial con el tiempo.

Nosotros rescindiremos esta discusión de voltamperometría de onda cuadrada a la forma de la onda propuesta por Ramaley y Krause que se muestra a continuación en la figura 1.30.

La forma de la onda consiste en una onda cuadrada simétrica de una amplitud ( $E_{sw}$ ) igual a la mitad del potencial entre pico y pico y que se superpone en forma de escalera sobre una rampa de potencial en el tiempo. Un ciclo completo de la onda cuadrada ocurre cada periodo de tiempo  $\tau$  de la escalera, el cual tiene un incremento de magnitud  $\Delta E_s$ . A la anchura del pulso o  $\tau/2$  se le llama  $t_p$ , a la frecuencia,  $1/\tau$ , se le llama  $f$ , el intervalo de tiempo en el cual se mide la corriente se denomina  $t_s$  y al tiempo de espera (a un potencial fijo  $E_i$ ) hasta que se lleva a cabo el registro del voltamperograma, se le denomina  $t_i$ .



**Figura 1.30.** Principios de Voltamperometría de onda cuadrada.

La corriente se mide durante la última porción de cada medio ciclo en el intervalo de tiempo  $t_s$ . Así, dentro de un ciclo obtenemos para un pulso de oxidación una intensidad  $i_f$  y para el pulso de reducción otra intensidad  $i_r$ , siendo la corriente neta en cada ciclo la dada por la expresión:

$$\Delta i = i_f - i_r$$

Las características principales de esta técnica son:

- ⇒ Alta sensibilidad: la sensibilidad conseguida mediante esta técnica es tan buena o mejor que la alcanzada por técnicas de diferencial de pulso, obteniéndose límites de detección del orden de  $10^{-9}$  ó  $10^{-10}$  M para procesos reversibles o irreversibles con adsorción de los reaccionantes y del orden de  $10^{-7}$  M para procesos reversibles sin adsorción de los reaccionantes.
- ⇒ Mayor selectividad que en otras técnicas polarográficas al obtener señales de forma de picos estrechos.
- ⇒ Produce una buena discriminación de las corrientes de fondo.
- ⇒ Bajos tiempos de análisis: la velocidad del registro de los voltamperogramas depende de los valores de los parámetros instrumentales, pero en términos generales las velocidades aplicadas suelen ser bastante más altas que las obtenidas en la polarografía diferencial de pulso.
- ⇒ Posibilidad de aplicación de la detección voltamperométrica a otras técnicas, como HPLC, en virtud de:
  - a. Velocidad de trazado del voltamperograma.
  - b. Potencial y forma del pico independientes de la geometría de difusión y del régimen de transporte de materia.

Al igual que otras técnicas analíticas la voltamperometría de onda cuadrada puede ser instrumentada mediante electrónica moderna a través del control de los experimentos con ordenadores, lo que nos da la posibilidad de modificar los parámetros de medida. Los valores de estos parámetros suelen

estar comprendidos entre 10 y 120 mV para  $E_{sw}$ , entre 10 y 100 ms para  $\tau$ , entre 2 y 10 mV para  $\Delta E_s$  y entre 10 y 100 Hz para la frecuencia.

### ***Voltamperometría por redisolución***

La voltamperometría de redisolución o stripping es una técnica electroanalítica basada, por tanto, en el aprovechamiento con fines analíticos de la interacción entre la energía eléctrica y la materia y que constituye, actualmente, una de las técnicas analíticas de mayor sensibilidad. En general, la sensibilidad de los métodos polarográficos es buena, pero se encuentra limitada por la corriente de carga originada por la doble capa eléctrica existente en la interfase electrodo-disolución.

La voltamperometría de redisolución es una técnica electroanalítica que mejora considerablemente la sensibilidad del método por su capacidad para aumentar la corriente faradaica, mediante acumulación o preconcentración de la especie de interés sobre la superficie del electrodo de trabajo, mientras que la corriente de carga se mantiene en los mismos valores que en las otras técnicas voltamperométricas y polarográficas.

El método consta de tres etapas (Figura 1.31):

1. Etapa de preconcentración o acumulación.
2. Etapa de reposo.

### 3. Etapa de redisolución.

En la primera etapa, la especie de interés se deposita sobre la superficie del electrodo (mediante reacción química, electroquímica o adsorción), en condiciones de agitación intensa de la disolución, por lo que también se denomina etapa de electrodeposición. Los electrodos más utilizados son electrodos estacionarios como el HMDE, pero también se han utilizado electrodos rotatorios. En esta etapa de acumulación, es esencial que los parámetros hidrodinámicos (velocidad de agitación, tiempo de electrolisis, reproducibilidad del electrodo) estén perfectamente controlados.

La segunda etapa o etapa de reposo tienen por objeto asegurar una distribución uniforme de la sustancia en todo el electrodo, lo que se consigue utilizando un tiempo de equilibrado o reposo intermedio entre la deposición y la redisolución.

La etapa de redisolución da información útil desde el punto de vista analítico a partir del depósito formado. En esta etapa, el depósito se redisuelve electroquímicamente.



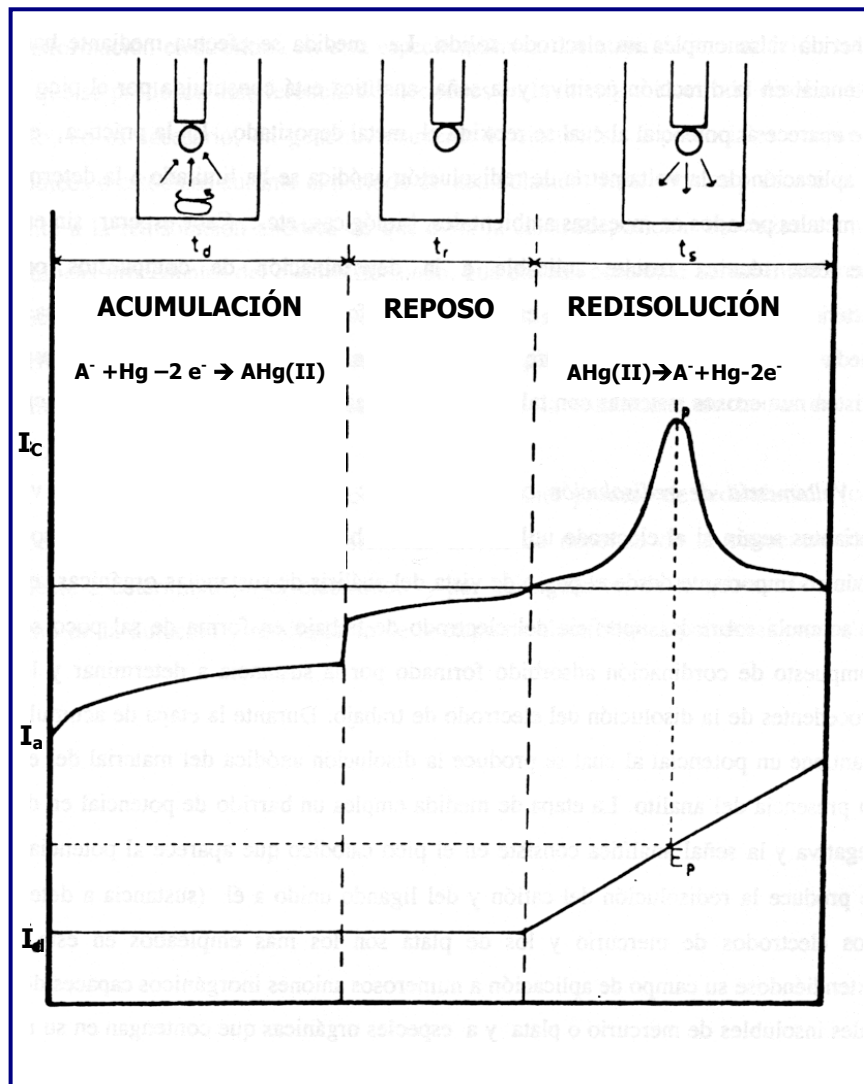


Figura 1.31. Principios de la Voltamperometría de Redisolución

Las diferentes técnicas de redisolución pueden clasificarse en función de los procesos que intervienen en las etapas de redisolución y acumulación. Así, podemos distinguir las siguientes técnicas:

- Voltamperometría de redisolución anódica

Mediante esta técnica es posible determinar iones metálicos con una exactitud razonable, en pocos minutos y en el margen de concentraciones comprendido entre  $10^{-6}$  y  $10^{-9}$  M. Para ello, en primer lugar se lleva a cabo la electrodeposición (etapa de acumulación), desde una disolución agitada, imponiendo al electrodo un potencial que permite la reducción de los iones de interés. En este proceso se forman las correspondientes amalgamas (electrodo de mercurio). Durante esta etapa, normalmente se deposita sólo una fracción del analito, por lo cual es imprescindible controlar cuidadosamente no sólo el potencial del electrodo, sino el tamaño de la gota, el tiempo de electrólisis y la velocidad de agitación.

Una vez realizada la electrodeposición se desconecta el agitador y, manteniendo el electrodo al mismo potencial, se espera (durante unos 10 segundos) a que la disolución quede en reposo. Finalmente, los analitos depositados sobre la gota de mercurio pueden cuantificarse por cualquiera de los procedimientos voltamperométricos. El más sencillo consiste en llevar a cabo un barrido anódico lineal, para lo cual el potencial del electrodo se hace variar linealmente hacia potenciales menos negativos, registrando la intensidad de la corriente. En este proceso, al alcanzarse el potencial correspondiente se

produce la oxidación electroquímica de los diferentes analitos originando picos de redisolución, cuya intensidad es proporcional a la concentración del analito.

En la práctica, el campo de aplicación de la voltamperometría de redisolución anódica se ha limitado a la determinación de metales pesados en muestras ambientales, biológicas, etc. Cabe esperar, sin embargo, que esta técnica resulte aplicable a la determinación de compuestos orgánicos pertenecientes a sistemas redox en los cuales la forma reducida, siendo electroactiva, se puede adsorber fuertemente sobre el electrodo de trabajo empleado. En este sentido ya existen numerosos sistemas con tales características, tales como el azul de metileno.

- Voltamperometría de redisolución catódica

Esta técnica presenta a su vez dos variantes según si el electrodo utilizado es atacable o inerte. En el primer caso, que es el único importante desde el punto de vista del análisis de sustancias orgánicas, el analito se acumula sobre la superficie del electrodo de trabajo en forma de sal poco soluble o compuesto de coordinación adsorbido formado por la sustancia a determinar y los iones procedentes de la disolución del electrodo de trabajo. Durante la etapa de acumulación se mantiene un potencial al cual se produce la disolución anódica del material del electrodo en presencia del analito. La etapa de medida emplea un barrido de potencial en dirección negativa y la señal analítica consiste en el pico catódico que aparece al potencial al cual se produce la redisolución del catión y del ligando unido a él (sustancia a determinar). Los electrodos de mercurio y los de plata son los más empleados en esta técnica, extendiéndose su

campo de aplicación a numerosos aniones inorgánicos capaces de formar sales insolubles de mercurio o plata y a especies orgánicas que contengan en su molécula determinados grupos funcionales (mercapto, tioamidas, piridinas, etc) que interaccionan con los iones procedentes del electrodo.

La segunda variante de este método emplea electrodos inertes de carbono o metales nobles para la determinación de iones como Mn (II) o Pb (II) que puedan acumularse por deposición anódica como óxidos de valencia superior.

En esta técnica es muy frecuente que el calibrado se desvíe de la linealidad a concentraciones relativamente altas, debido a la saturación de la superficie de electrodo.

La voltamperometría de redisolución catódica puede aplicarse, en principio, para la determinación de especies orgánicas e inorgánicas capaces de formar compuestos poco solubles con los iones procedentes de la oxidación del electrodo. Con el electrodo de mercurio pueden determinarse halogenuros, sulfuros, cianuros, seleniuros, así como varios tioles, péptidos o penicilinas.

- Voltamperometría de redisolución adsortiva

Es la más reciente de las técnicas de redisolución. La característica más notable de esta técnica consiste en que el analito es acumulado y medido como tal, sin previa transformación electrolítica en otra especie química. La etapa de acumulación transcurre sin que se produzca transferencia de electrones en la interfase electrodo-disolución y por tanto, no es necesario, en general, mantener la electrolisis a potenciales excesivamente anódicos o

catódicos durante el periodo de acumulación. Esta técnica presenta la ventaja frente a la redisolución anódica de que evita la electrodispersión de trazas e impurezas metálicas procedentes del electrolito fondo, que pueden ocasionar serias interferencias en la etapa de medida. Frente a la voltamperometría de redisolución catódica, su principal ventaja estriba en una sensibilidad netamente superior, explicable si se considera que el efecto de acumulación por adsorción no está limitado por la solubilidad de la sal de mercurio depositada.

Esta técnica puede aplicarse a la determinación de una gran variedad de sustancias orgánicas de interés biológico, farmacéutico y medioambiental. Asimismo, también pueden determinarse iones metálicos mediante la formación de complejos con ligandos que presenten propiedades adsortivas.

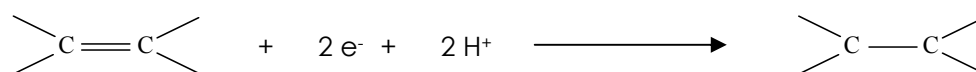
Por último, se puede decir que en cualquier proceso de redisolución (catódico, anódico o de adsorción) la sensibilidad alcanzada depende de la concentración de la especie a determinar en el electrodo y, por consiguiente, de la geometría de éste, así como de la duración y rendimiento de la etapa de electrolisis a potencial controlado.

## **GRUPOS FUNCIONALES REACTIVOS**

A continuación se indican aquellos grupos funcionales más característicos que pueden reducirse en el electrodo de gotas de mercurio:

### **Enlaces carbono-carbono**

La reducción del doble enlace C = C transcurre ganando dos electrones, para originar el compuesto saturado correspondiente:



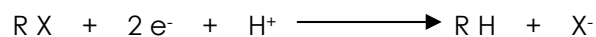
La reducción de dobles enlaces aislados tiene lugar a potenciales muy negativos, inaccesibles en medio acuoso, si bien, pueden obtenerse ondas utilizables analíticamente operando en un disolvente orgánico, con sales de amonio cuaternario como electrolito soporte.

El potencial de reducción se hace menos negativo al aumentar el grado de conjugación, o por la presencia de grupos que faciliten la reducción.

El triple enlace carbono-carbono no se reduce en el DME.

### **Enlaces carbono-halógeno**

Los compuestos aromáticos halogenados se reducen según el proceso siguiente:



donde R representa un resto aromático. Los potenciales de reducción dependen marcadamente de la naturaleza y del número de sustituyentes del anillo aromático.

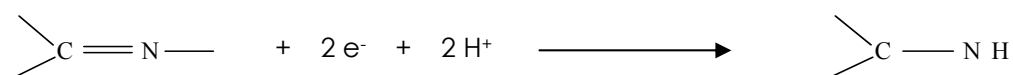
### **Enlaces carbono-oxígeno**

Los aldehídos alifáticos se reducen, desde su forma hidratada, hasta los alcoholes correspondientes.

Los compuestos carbonílicos aromáticos se reducen irreversiblemente en el electrodo de gotas de mercurio, en procesos con intervención de uno o dos electrones. Análogamente a lo que sucede con los dobles enlaces, los compuestos carbonílicos conjugados, tales como quinonas y benzoquinonas, la reducción tiene lugar a potenciales menos negativos y, en consecuencia, más útiles analíticamente.

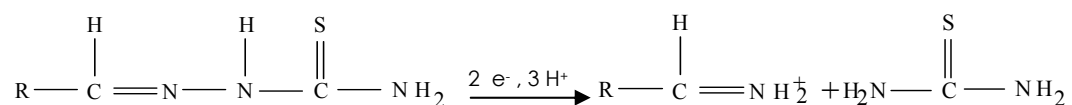
### Enlaces carbono-nitrógeno

El grupo azometina,  $-\text{CH}=\text{N}-$ , se reduce en el electrodo de gotas de mercurio, resultando un enlace sencillo carbono-hidrógeno:



Cuando el grupo azometina está conjugado con un anillo aromático, la reducción tiene lugar a potenciales poco negativos, obteniéndose ondas o picos bien definidos utilizables analíticamente. Esto sucede con las 1,4 benzodiazepinas, que constituyen un importante grupo de sustancias psicotrópicas, ampliamente utilizadas actualmente en medicina, las cuales han sido determinadas mediante métodos voltamperométricos (134,135).

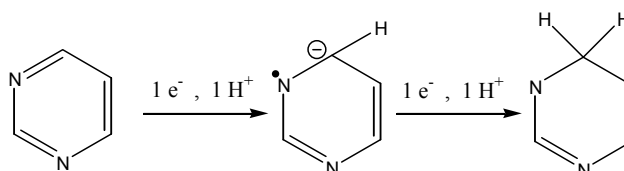
Cuando el grupo azometina está unido a otro átomo de nitrógeno, para formar la agrupación  $\text{N}-\text{N}=\text{C}$ , el proceso electrodo implica simultáneamente la saturación del grupo azometina y la ruptura del enlace  $\text{N}-\text{N}$ .





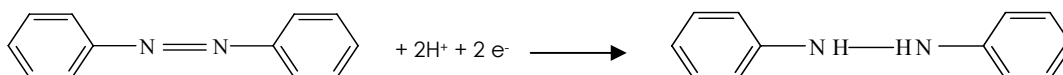
Los compuestos heterocíclicos conteniendo un átomo de nitrógeno en un anillo aromático, como piridina y quinolina, normalmente originan ondas catalíticas de hidrógeno a valores de pH inferiores al valor del  $pK_a$ .

Los compuestos heterocíclicos que contienen más de un átomo de nitrógeno en el anillo se reducen en el electrodo de gotas de mercurio. Así, la reducción de las piridinas puede representarse de la forma siguiente:



### Enlaces nitrógeno-nitrógeno

Los compuestos conteniendo el grupo azo,  $-N=N-$ , se reducen en el electrodo de gotas de mercurio en un proceso que implica 2 electrones. En algunos casos, la reducción va seguida de ruptura del enlace  $N-N$  para dar una mezcla de aminas.



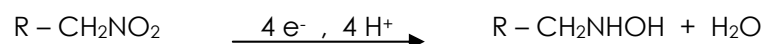
## Capítulo 1

---

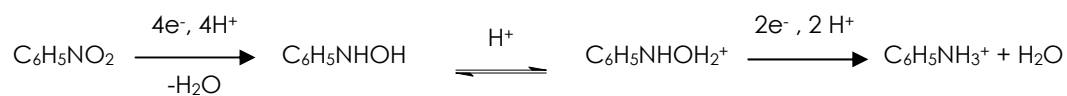
Muchos compuestos conteniendo el grupo azo son utilizados como colorantes y como aditivos alimentarios, de ahí el interés que actualmente tiene el análisis de compuestos de este tipo.

### Enlaces nitrógeno-oxígeno

Los nitrocompuestos alifáticos se reducen, en medio ácido, en un proceso que implica 4 electrones:



La reducción de los nitrocompuestos aromáticos transcurre según el mecanismo siguiente:



Dependiendo de la naturaleza de los sustituyentes del anillo aromático, los procesos pueden ocurrir simultáneamente o en dos etapas separadas.

La reducción polarográfica de N-óxidos de heterociclos tiene lugar a potenciales muy negativos y a valores de pH menores que el  $pK_a$ . En compuestos que tienen la función N-óxido con otros centros electroactivos, normalmente se observan las ondas correspondientes a las reducciones de los diferentes grupos.

## 1.4. Sistema de tratamiento de muestras biológicas

---

El proceso analítico, que corresponde al proceso que se sigue desde que se tiene la muestra en estado bruto hasta la obtención de un resultado, está conformado por cuatro grandes etapas:

- 1.- Operaciones previas
- 2.- Calibración de equipos y metodologías
- 3.- Medición y transducción de la señal analítica
- 4.- Toma y tratamiento de los datos

Estas cuatro partes tienen igual importancia para llegar a obtener un resultado de calidad. La primera, que es la que corresponde al nexo entre la muestra sin tratar, medir o tomar con la medida instrumental a realizar, es la menos desarrollada hasta el momento. Esto es debido a sus características generales: una alta complejidad y participación humana, lentitud, fuente frecuente de errores sistemáticos, dificultad de control, fuente de riesgos y variabilidad.

El diseño y desarrollo del proceso analítico debe tener en cuenta el tipo de análisis, es decir, si es de tipo cualitativo o cuantitativo, también las características de la muestra y de los analitos que van a determinarse y el instrumento en el cual se realizarán las medidas. Además, debe adecuarse perfectamente a la definición del problema analítico que se pretende resolver (136).

Dentro de las operaciones previas se puede destacar el muestreo, la medida en peso o volumen de la muestra, el secado, la molienda, el tamizado, el filtrado, la homogeneización, la conservación, la dilución o disgregación, la

destrucción de materia orgánica, las técnicas de separación, las reacciones analíticas y el transporte e introducción al sistema de medida. No todas estas sub-etapas son necesarias, dependen del estado de la muestra y del analito y del instrumento que se utilizará para su posterior medida. El orden en que son realizadas también pueden cambiar, ya que varias pueden integrarse en una sola y, finalmente, todas ellas evidencian un alto grado de variabilidad, complejidad y dificultad. Todo esto hace que las operaciones previas sean uno de los aspectos en el que más se debe innovar en Química Analítica para llegar a obtener resultados de calidad (137).

Como ejemplos de los tratamientos de muestra más frecuentes están la filtración, la dilución, la lixiviación, la liofilización, la disgregación, la diálisis, la destrucción de la materia orgánica, la extracción líquido-líquido o sólido-líquido, la extracción con solventes, el intercambio iónico, etc. Todos estos tratamientos se realizan para adecuar la muestra para su introducción al sistema de medida. Sus objetivos básicos son obtener calidad en los resultados, es decir, exactitud y representatividad de los mismos además de una adecuada selectividad, sensibilidad, precisión, rapidez, menores costes, reducción de riesgos para el operador y el medio ambiente. Como objetivos concretos de estos tratamientos están la eliminación de interferencias para aumentar la selectividad, preconcentrar o diluir para aumentar la sensibilidad, conservar la muestra, cambiar de disolventes para compatibilizar la muestra con los sistemas de medida, desarrollar reacciones de derivatización u otras, preservar los sistemas de medida, etc.

### *- Aplicaciones de sistemas de tratamientos de muestras en EC:*

Como ya hemos comentado en otra parte de la introducción, la EC es una técnica que cuenta con un gran potencial de separación y que se ha desarrollado enormemente en estas últimas dos décadas. Sin embargo, las dificultades a la hora de preparar las muestras para ser introducidas en el sistema electroforético hacen que el desarrollo de estos sistemas de pretratamiento tengan una gran relevancia. Estas dificultades incluyen la necesidad de inyectar un volumen extremadamente pequeño de muestra, lo cual afecta a la precisión y la representatividad. Además, las bajas sensibilidades de los sistemas de detección continua y las fuertes influencias de las matrices de las muestras como son su contenido en sales, macromoléculas, el pH, la presencia de partículas, etc pueden producir alteraciones reversibles o irreversibles en las separaciones electroforéticas.

En general, los sistemas de tratamiento de muestras para análisis por EC incluyen diluciones, en caso de matrices que presentan alta concentración en sales, centrifugaciones y filtraciones, cuando hay presencia de partículas que podrían obstruir el capilar, extracción en fase sólida y extracciones líquido-líquido en caso de contar con matrices biológicas como suero, plasma y orina (138), microconcentradores y diálisis, en caso de determinaciones de proteínas que suelen encontrarse en matrices con elevado contenido en sales (139), y derivatizaciones, para mejorar la selectividad, sensibilidad y para reconocimientos quirales (140,141).

El sistema de tratamiento de muestras utilizado en la presente Memoria ha sido la extracción en fase sólida (EFS), la cual se ha establecido como una de las técnicas de preparación de muestra más ampliamente utilizadas. Los objetivos

para los cuales se aplica son aislar y purificar componentes químicos presentes en muestras con matrices complejas a través de la eliminación de la matriz y de los interferentes. También para preconcentrar analitos a nivel de trazas y como procedimiento rápido de separación. Entre sus principales campos de aplicación se pueden encontrar el farmacológico, la extracción de componentes activos y péptidos, el análisis farmacéutico y la preparación de muestras farmacéuticas para su posterior análisis con técnicas como la cromatografía líquida. A nivel medioambiental su aplicación está en la preconcentración y extracción de residuos de contaminantes, pesticidas y herbicidas en aguas residuales y superficiales, en sedimentos, en vegetales, en tejidos animales y sueros. Finalmente, a nivel clínico se encuentra la preconcentración y extracción de principios activos de uso terapéutico y abuso, vitaminas, antibióticos, etc, a partir de muestras biológicas como orina y suero.

El proceso de extracción es un proceso físico en el que una fase sólida, que presenta una alta capacidad de interacción con determinados analitos, se pone en contacto con la muestra líquida. Los analitos se concentran en la superficie del sólido, mientras el resto de la matriz de la muestra no sufre retención alguna.

Se ha utilizado tanto en el enriquecimiento de analitos traza como en la limpieza de la matriz (142-144). Comparada con la extracción líquido-líquido convencional, se podría decir que la EFS es fácil de usar, requiere menos recursos (tiempo y cantidad de disolventes), es capaz de producir extractos más limpios, es fácilmente automatizada y puede llegar a obtener factores de concentración (concentración final del analito/concentración inicial) del orden de 1000.



Los inicios de la EFS provienen de la cromatografía líquida y de la cromatografía de columna a baja presión. Dependiendo del tipo de sorbente sólido, los mecanismos de interacción pueden incluir interacciones polares (puentes de hidrógeno, fuerzas dipolo-dipolo), interacciones no polares o hidrofóbicas (fuerzas de Van der Waals), interacciones de tipo tamiz molecular e interacciones de intercambio iónico. Por otro lado, la gran variedad de estructuras químicas de los sorbentes facilitan la selectividad de este tipo de extracciones.

La utilización analítica de la EFS se ha incrementado en los últimos años gracias a la automatización de los pasos que constituyen el procedimiento de extracción y al acoplamiento en línea con técnicas cromatográficas (145-147). Otro aspecto que ha contribuido a su uso generalizado ha sido la aparición en el mercado de nuevos sorbentes, como es el caso de varios tipos de sorbentes C<sub>18</sub>, copolímeros del estireno-divinilbenceno, copolímeros de benceno-N-vinilpirrolidona, carbono grafitizado, e incluso sorbentes de doble capa. Las fases sólidas son normalmente de sílice, enlazada a distintos grupos funcionales, los cuales pueden ser polares, apolares y de intercambio iónico. El enlace se produce por una reacción entre la sílice activada y organosilanos que contienen los grupos funcionales que serán los responsables de la selectividad de la fase. Otras reacciones secundarias eliminan los grupos silanoles de la superficie para que así las propiedades de la fase las proporcionen exclusivamente los grupos funcionales y no los grupos silanoles libres. Sin embargo, generalmente quedan libres ciertos grupos silanoles, lo que da lugar a interacciones entre la fase y los analitos que se denominan *interacciones secundarias* y que corresponden a

interacciones del tipo puentes de hidrógeno entre estos grupos y grupos amino e hidroxilo de los analitos.

La sílice enlazada es estable en un rango de pH entre 2.0 y 7.5, ya que a pH más alcalino tiende a disolverse y a pH más ácido la unión entre los grupos sílice y los grupos funcionales puede romperse haciendo que los mecanismos de adsorción sean poco reproducibles. Sin embargo, es posible que acepte pH más extremos si sólo es expuesta a éstos durante cortos periodos de tiempo. Su estructura rígida permite que alcance el equilibrio rápidamente con el disolvente de acondicionamiento y que luego se adapte fácilmente a los cambios de disolventes en las distintas etapas de la extracción. Finalmente, el tamaño de las partículas es de 15-100  $\mu\text{m}$  y el tamaño de poro es de 60  $\text{Å}$ , lo que le permite soportar presiones de hasta 15 psi.

La extracción se produce por la retención de los analitos sobre la fase sólida. Ésta depende de la estructura y naturaleza del analito, del disolvente en el cual se encuentra disuelto y de la fase adsorbente. Se debe a la interacción de ciertos grupos funcionales de los analitos con la fase enlazada, lo cual hace que las moléculas del analito queden inmovilizadas en la superficie de ésta. La elución consiste en eliminar los analitos de la fase sólida por medio de un disolvente con el que interaccionen más fuertemente que con la fase sólida. Se denomina *capacidad* a la masa total de analito que puede ser retenida por una cierta cantidad de adsorbente y, generalmente, es de 0.5-1.5 meq  $\text{g}^{-1}$  para adsorbentes de intercambio iónico y de 10-50 mg  $\text{g}^{-1}$  para el resto de adsorbentes. La *selectividad* corresponde a la habilidad del adsorbente para retener tan sólo el analito deseado dejando pasar el resto de los componentes de la matriz de la muestra, y depende esencialmente de la estructura química

del analito y de los otros componentes de la matriz, así como también de las propiedades del adsorbente.

Los adsorbentes de fases enlazadas más utilizados para la limpieza y preconcentración de muestras son el octadecil ( $C_{18}$ ), octil ( $C_8$ ), fenil, cianopropil, silica gel, diol, aminopropil, dimetilaminopropil, grupos aromáticos sulfónicos y aminas cuaternarias. Otros adsorbentes utilizados sólo para la limpieza de las muestras son la alúmina, el silicato de magnesio, tierras de diatomeas y carbono activado. Finalmente, para la concentración de trazas, los más utilizados son el carbono, polímeros porosos macrorreticulares, poliuretanos, resinas de intercambio iónico y también los materiales de fase enlazada ya descritos. Dentro de estos últimos los más utilizados son los sorbentes  $C_{18}$ , cuando se hace referencia a ellos se habla de interacciones de tipo hidrofóbico de forma que la retención depende del número de cadenas  $C_{18}$  unidas a la superficie de la partícula de sílice (148). Si se trata de analitos polares la retención será mejor si el sorbente se obtiene a partir de un silano monofuncional y no se cubre completamente el soporte de sílice para que estén presentes un número significativo de grupos polares al lado de estas cadenas de octadecilo (con frecuencia conocidas como  $C_{18}/OH$ ). De esta manera se consiguen interacciones de tipo polar junto a las de tipo no polar.

Los copolímeros a base de estireno-divinilbenceno, a pesar de que aún no se utilizan demasiado, son los sorbentes idóneos para extraer analitos muy polares y cuando se hacen pasar grandes volúmenes de muestra. Esto se debe a que cuando se utilizan los sorbentes  $C_{18}$ , la mayoría de los compuestos polares no pueden ser determinados por las interferencias presentes en las matrices, en general, de gran complejidad.

Los copolímeros a base de benceno-N-vinil-pirrolidona son muy versátiles y pueden utilizarse para una amplia variedad de analitos, ya que presentan características de retención tanto hidrofílicas como hidrofóbicas.

Los sorbentes de carbono más empleados se obtienen calentando carbón a temperaturas elevadas (2700-3000°C), lo que se conoce como carbono grafitizado. Se caracterizan por poseer una estructura homogénea y una gran superficie específica (100 m<sup>2</sup>/g). En comparación con los sorbentes de tipo C<sub>18</sub>, su eficiencia para retener compuestos polares es superior (149, 150). Con estos sorbentes la retención de los compuestos no sólo se debe a interacciones hidrofóbicas, sino que pueden darse retenciones basadas en interacciones electrónicas, hecho que permite que, incluso los analitos más polares y los analitos solubles en agua, sean retenidos (151).

La forma de utilización de los cartuchos para realizar las EFS es simple y puede tener dos finalidades, por un lado, la extracción selectiva del analito disuelto en la matriz de muestra y, por otro, la retención selectiva de componentes de la matriz bajo condiciones en la que el analito no queda retenido. Los pasos que suelen seguirse para llevar a cabo una extracción de este tipo se detallan a continuación:

**1.- Acondicionamiento:** Para obtener la máxima reproducibilidad, las columnas o cartuchos de EFS requieren un pretratamiento. El objetivo del mismo será eliminar pequeñas partículas del material de empaquetamiento, eluir cualquier contaminante procedente de la fabricación y acondicionar la fase estacionaria. Todo ello conducirá a un máximo contacto entre el analito o componentes de

interés y los grupos funcionales del sorbente. Suelen emplearse en esta etapa de 3 a 5 mL del disolvente seleccionado que será distinto en función de la naturaleza de la fase. En el caso de adsorbentes y empaquetamientos de fase polar (sílice, sílice funcionalizada con diol, etc) se realiza el acondicionamiento con un disolvente no polar como hexano o diclorometano. Para los de fase no polar (sílice funcionalizada o radicales alquilo) se emplea un disolvente polar como pueda ser el metanol, el acetonitrilo o el tetrahidrofurano seguido de un lavado con agua o con un tampón adecuadamente. Cuando se trate de cartuchos de intercambio iónico se elegirá agua y/o un tampón apropiado de baja fuerza iónica (0.01 M).

**2.- Paso de muestra:** En este momento se hace pasar la muestra a un flujo adecuado con el fin de disminuir el tiempo de análisis, pero asegurando la retención del analito en el sorbente.

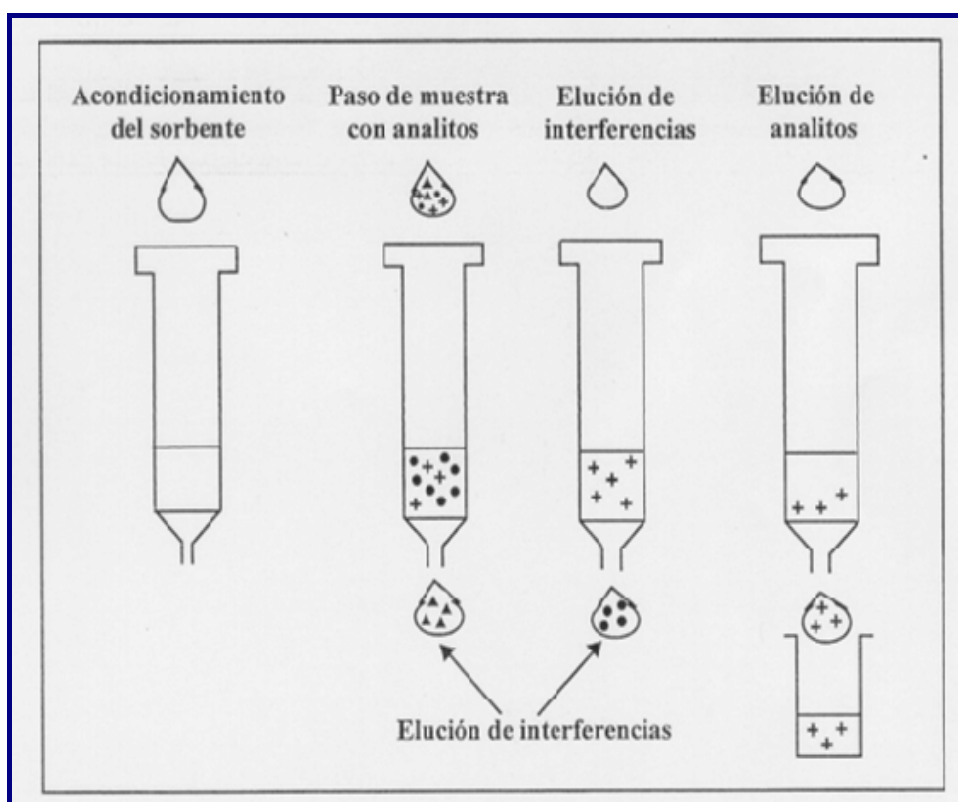
Después, pueden resultar necesarios los dos pasos que se describen a continuación:

**3.- Limpieza del extracto:** Consistirá en el lavado del sorbente con un disolvente o mezcla de disolventes cuya misión será llevar a cabo la elución de interferentes de la matriz quedando aún retenidos los analitos de interés.

**4.- Elución de los analitos de interés:** Se hace pasar a través del cartucho un disolvente que tenga la capacidad de eluir los compuestos que interesan empleando el menor volumen posible de dicho disolvente. Será fundamental

que el eluyente sea compatible con el resto de pasos que se deseen realizar para finalizar el análisis.

En la figura 1.32 se representan los pasos de la EFS que se han descrito anteriormente.



*Figura 1.32. Etapas en la realización de una extracción en fase sólida.*

Se pueden encontrar distintas aplicaciones en las que se ha utilizado la EFS para la preconcentración y limpieza de muestras en EC. Entre ellas se puede destacar la determinación de aminas biógenas y polifenoles en vinos utilizando columnas de fase enlazada C<sub>18</sub> (152, 153). En ambos casos, las microcolumnas rellenas con material C<sub>18</sub> no sólo permitieron la limpieza de las muestras, sino que también permitieron mejorar la sensibilidad del método a través de la preconcentración de los analitos. Otro ejemplo de aplicación de la EFS en la preparación de muestras para EC es la determinación de fármacos que pueden usarse de manera abusiva como barbitúricos, hipnóticos, anfetaminas, compuestos derivados del opio, benzodiazepinas y metabolitos de la cocaína en muestras de orina usando múltiples etapas de EFS para la elución selectiva de los compuestos (154). Por último, la determinación de péptidos en plasma utilizando columnas de ácido carboxílico (ACB) y la posterior separación por medio de la ITFC (155) es otro ejemplo de aplicación de la EFS. En este caso, el pretratamiento de la muestra permitió la eliminación de las interferencias presentes en el suero.

## 1.5. Análisis estadístico elemental

---



Las técnicas matemáticas que se han aplicado en la presente Memoria pueden incluirse dentro del grupo de las técnicas estadísticas básicas y elementales.

El análisis estadístico elemental incluye una gran variedad de parámetros que van desde aquellos que tratan de evaluar la exactitud y la precisión de una determinación hasta los relacionados con los cálculos de rectas de regresión, límites de detección y cuantificación. De los utilizados en la presente Memoria se van hacer sólo una breve mención puesto que son suficientemente conocidos.

### ***Parámetros estadísticos descriptivos clásicos***

✓ Media aritmética. Es la suma de todas las medidas dividida por el número de determinaciones.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

✓ Desviación estándar, s. Es la medida más utilizada de la variabilidad y viene definida por la fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Es el parámetro más característico para estimar la precisión. Informa sobre la dispersión de los resultados alrededor del valor medio y tiene en cuenta el número de grados de libertad ( $n-1$ ) del conjunto de resultados considerados.

✓ Varianza. Es el cuadrado de la desviación estándar.

✓ Coeficiente de variación, C.V. también es conocido como desviación estándar relativa, cuyas unidades se expresan en porcentaje y viene definido por:

$$C.V.(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

✓ Amplitud total,  $A_t$ . También se denomina intervalo y es otra medida de la dispersión que viene definida por la diferencia entre el valor máximo y el mínimo.

$$A_t = x_{\max} - x_{\min}$$

✓ Intervalo de confianza de la media. Conocer este intervalo implica en qué intervalo se puede decir que está incluido el valor verdadero, para un intervalo de confianza dado.

$$\mu = \bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{n}}$$

donde  $t$  es el parámetro de la  $t$  de Student, que está tabulado para un cierto nivel de significación y el número de grados de libertad de la serie de resultados considerado.

### ***Métodos de correlación***

En muchas ocasiones, dos o más variables se miden en los mismos objetos o individuos y es importante encontrar una medida cuantitativa de la relación entre estas variables dependientes. Con este fin se pueden utilizar la covarianza y el coeficiente de correlación, puesto que ambos expresan cuantitativamente la relación lineal entre variables. En general, se prefiere utilizar el coeficiente de correlación,  $r$ , puesto que es independiente de las escalas de medida escogidas, el cual viene dado por la ecuación:

$$r = \frac{\sum [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\{\sum (x_i - \bar{x})^2 \} \{\sum (y_i - \bar{y})^2 \}^{1/2}}$$

El coeficiente de correlación puede tomar valores entre  $-1$  y  $+1$ . El máximo valor absoluto de correlación es uno y se encuentra cuando entre ambas variables existe una correlación perfecta. Cuando no existe correlación el valor de  $r$  es cero, aunque esto no significa que estas dos variables no estén relacionadas sino que no lo están linealmente. Debe tenerse en cuenta que el cálculo de  $r$  generará siempre un valor aun cuando la relación entre los datos sea claramente de carácter no lineal, por lo que siempre es necesario representar gráficamente los puntos, ya que, si no es así, del cálculo de  $r$  se puede deducir erróneamente una relación de carácter lineal.

Cuando tenemos más de dos variables aleatorias es interesante utilizar la matriz de correlación, donde se representan las correlaciones entre todos los pares posibles de variables. Resulta así una matriz cuadrada con igual número de filas que de columnas e igual número de variables, donde los elementos de la diagonal son todos 1 mientras que los elementos de fuera de la diagonal tienen valores entre  $-1$  y  $+1$ .

### ***Rectas de calibrado (Regresión por mínimos cuadrados)***

En las técnicas de análisis instrumental la concentración de una muestra no puede ser medida directamente, sino que es determinada a través de la medida de una cantidad física o señal,  $y$ . La condición para poder relacionar esta medida es que haya una relación empírica o teórica no ambigua entre ella

y la concentración,  $x$ . Para la mayoría de las técnicas analíticas dicha relación se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$y = \alpha + \beta x + \varepsilon$$

donde  $\alpha$  y  $\beta$  representan los valores verdaderos de los parámetros denominados ordenada en el origen y pendiente, respectivamente, y  $\varepsilon$  es el valor de error aleatorio asociado a la respuesta,  $y$ . Dado que  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\varepsilon$  representan valores verdaderos, conceptualmente éstos nunca podrán calcularse con total certeza. En la práctica hallaremos estimaciones de estos valores. Dichas estimaciones se presentan mediante los términos  $a$ ,  $b$  y  $e$ . Así, para  $n$  pares de valores concretos  $(x_i, y_i)$  se posee la relación:

$$y_i = a + bx_i + e_i \quad i= 1, 2, \dots, n$$

El problema del establecimiento del modelo consiste en hallar las estimaciones  $a$  y  $b$ . Como sabemos, en todo proceso de calibración se considera la existencia de errores  $e_i$  en las respuestas  $y_i$ . Los valores  $e_i$  reciben el nombre de residuos y representan las diferencias entre los valores  $y_i$  observados y los valores de  $y$  predichos por el modelo. Por el contrario, se considera que las variables independientes utilizadas en el establecimiento del modelo,  $x_i$ , están libres de error o éste es muy pequeño comparado con los  $e_i$ . Esta condición es realista en los problemas de calibración, donde se considera que los errores

cometidos al preparar los patrones de calibración son significativamente más pequeños que los errores de medida.

Las estimaciones  $a$  y  $b$  de la mejor recta en la cual se haya minimizado la influencia de estos errores,  $e_i$  se puede calcular mediante diversos criterios matemáticos, pero normalmente se utiliza el método de mínimos cuadrados, que minimiza la suma de los cuadrados de los residuos.

$$\sum e_i^2 = \sum [y_i - (a + bx_i)]^2$$

mediante la derivación de esta expresión respecto a  $a$  y  $b$  e igualando a cero, se obtienen las expresiones de la pendiente y la ordenada en el origen presentadas a continuación:

$$b = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

donde  $\bar{x}$  e  $\bar{y}$  son los valores medios del conjunto de valores de  $x$  e  $y$ , respectivamente.

La recta de regresión calculada se utiliza para estimar la concentración de las muestras problema por interpolación. La precisión de la estimación dependen del error de la medida de la muestra y del intervalo de confianza de la curva de calibración, lo cual está relacionado con la incertidumbre de las estimaciones  $a$  y  $b$ . A partir de las expresiones de la pendiente y la ordenada en el origen se pueden calcular sus desviaciones estándar,  $S_a$  y  $S_b$  que vienen dadas por:

$$S_a = S_{y/x} \left\{ \frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2}$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\left\{ \sum (x_i - \bar{x})^2 \right\}^{1/2}}$$

donde  $\bar{x}$  es la media aritmética de los valores del eje de abscisas y  $S_{y/x}$  es la estimación de la desviación estándar de los errores de las respuestas o residuos:

$$S_{y/x} = \left\{ \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right\}^{1/2}$$

siendo  $\hat{y}_i$  los valores de las respuestas calculadas de acuerdo con el modelo.

Los valores de  $S_a$  y  $S_b$  se pueden utilizar para calcular los límites de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen. Así, los límites de confianza para la pendiente estarán dados por  $b \pm tS_b$ , donde el valor de  $t$  se obtiene para un nivel de confianza deseado y  $(n-2)$  grados de libertad. De manera similar los límites de confianza para la ordenada en el origen están dados por  $a \pm tS_a$ .

Para estimar si los puntos experimentales se ajustan bien o no al modelo propuesto de línea recta, se calcula el coeficiente de correlación, que se diferencia de los de regresión en que se utiliza para investigar la relación entre dos variables aleatorias  $y$ , por tanto, con errores en ambas. Sin embargo, el coeficiente de correlación es válido para evaluar la linealidad en métodos de regresión porque está relacionado con el coeficiente de regresión a través de las desviaciones estándar de las variables. No obstante, es más útil calcular el coeficiente de determinación,  $r^2$ , puesto que en la recta de regresión tiene el significado de la parte de variación de  $y$  que es explicada por  $x$ ; así, si  $r^2 = 0.98$  significa que el 98% de la variación puede ser explicada por  $x$  y sólo un 2% permanecería sin ser explicada si ajustamos a un modelo lineal.



### ***Test de la F***

Es una prueba sencilla para evaluar la comparabilidad de la varianza de dos series de resultados. Se define el valor experimental de la F como:

$$F_{\text{exp}} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

donde  $s_1$  y  $s_2$  son las desviaciones estándar de las series 1 y 2 respectivamente. Se sitúa siempre en el numerador el valor más alto, de manera que el cociente sea siempre superior a la unidad.

Para decidir cuando las varianzas de los dos conjuntos difieren de forma significativa se recurre a valores tabulados de F (valores teóricos) para un cierto nivel de confianza. Si  $F_{\text{exp}} < F_{\text{teor}}$  se concluye que no hay diferencias significativas de varianzas (hay homogeneidad de varianzas en ambos conjuntos). Si  $F_{\text{exp}} > F_{\text{teor}}$  las varianzas de los dos conjuntos no son de la misma magnitud (no hay homogeneidad de varianzas).

El valor teórico de F se encuentra en tablas en función de los grados de libertad del conjunto de valores que conforman la varianza del numerador y denominador de la expresión anterior. Para este test, lo habitual es utilizar la tabla de F de una cola, ya que el planteamiento de hipótesis es si la varianza del numerador es mayor significativamente que la del denominador.

### *Test de la t*

Permite evaluar la igualdad estadística entre dos valores (por ejemplo, dos valores medios  $\bar{x}_1$  y  $\bar{x}_2$ ). Si previamente se ha comprobado que existe homogeneidad de varianzas entre dichos conjuntos de resultados, se calcula un valor experimental de  $t$  mediante la expresión:

$$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s / \sqrt{n}}$$

donde el valor de  $s$  es una ponderación entre las desviaciones estándar de los dos conjuntos comparados, que se obtiene mediante la ecuación:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

para  $n_1 + n_2 - 2$  grados de libertad.

Si no existe homogeneidad de varianzas, las expresiones anteriores se modifican para tener en cuenta la varianza de cada serie de resultados. Así:

$$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right) + \left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)}}$$

y los grados de libertad (g.l.) ahora son:

$$g.l. = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2 / (n_1 + 1) + \left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2 / (n_2 + 1)} - 2$$

Los valores de  $t_{\text{exp}}$  se comparan con valores tabulados y, en cualquier caso, siempre que  $|t_{\text{exp}}| < |t_{\text{teor}}|$ , los resultados medios comparados son estadísticamente equivalentes para el nivel de confianza elegido.

### ***Comparación de rectas de calibrado. Análisis de varianza (ANOVA)***

El análisis de varianza es uno de los diseños estadísticos más sencillos que permiten la comparación directa de  $k$  tratamientos. En general, es una medida estadística del error, evaluándose éste al desglosar la variación total en sus

distintas fuentes de error. En la precisión de un método analítico, principalmente contribuyen la variación entre los  $k$  calibrados y la variación de cada muestra dentro de los calibrados (156).

El análisis de varianza supone que los datos pueden considerarse como muestras aleatorias de  $k$  poblaciones normales cuyas varianzas ( $\sigma^2$ ) no presentan diferencias estadísticamente significativas. Esencialmente, este análisis determina si la discrepancia entre los calibrados es mayor que la que razonablemente cabría esperar debido a las variaciones que ocurren dentro de cada uno de los calibrados.

Consideremos que no existen replicados para cada punto del calibrado, de forma que los datos se evalúan como muestra la tabla 1.6.

**Tabla 1.6. Codificación de datos**

$j$	$1$		...		$j-1$		$j$		$j+1$		...		$k$	
Obs.	Matriz 1		...		Matriz $j-1$		Matriz $j$		Matriz $j+1$		...		Matriz $k$	
$i$	x	y	x	y	x	y	x	y	x	y	x	y	x	y
$1$	$x_{1,1}$	$y_{1,1}$	...	...	$x_{1,j-1}$	$y_{1,j-1}$	$x_{1j}$	$y_{1j}$	$x_{1j+1}$	$y_{1j+1}$	...	...	$x_{1,k}$	$y_{1,k}$
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
$i-1$	$x_{1,i-1}$	$y_{1,i-1}$	...	...	$x_{i-1,j-1}$	$y_{i-1,j-1}$	$x_{i-1j}$	$y_{i-1j}$	$x_{i-1j+1}$	$y_{i-1j+1}$	...	...	$x_{i-1,k}$	$y_{i-1,k}$
$i$	$x_{1,i}$	$y_{1,i}$	...	...	$x_{i,j-1}$	$y_{i,j-1}$	$x_{ij}$	$y_{ij}$	$x_{ij+1}$	$y_{ij+1}$	...	...	$x_{i,k}$	$y_{i,k}$
$i+1$	$x_{1,i+1}$	$y_{1,i+1}$	...	...	$x_{i+1,j-1}$	$y_{i+1,j-1}$	$x_{i+1j}$	$y_{i+1j}$	$x_{i+1j+1}$	$y_{i+1j+1}$	...	...	$x_{i+1,k}$	$y_{i+1,k}$
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
$n$	$x_{1,n}$	$y_{1,n}$	...	...	$x_{n,j-1}$	$y_{n,j-1}$	$x_{nj}$	$y_{nj}$	$x_{nj+1}$	$y_{nj+1}$	...	...	$x_{n,k}$	$y_{n,k}$

Si tenemos rectas de calibrado procedentes de distintas matrices, es interesante observar si estas rectas son comparables y con que extensión se pueden combinar los datos para estimar los parámetros apropiados. Para este propósito hemos de calcular la suma de cuadrados, los productos de las desviaciones de los valores individuales con respecto a sus medias y la suma de cuadros de sus desviaciones con respecto a las rectas ajustadas.

**Tabla 1.7.** Análisis de Varianza: Comparación de rectas de regresión

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Varianza
Desviación dentro de cada calibrado sobre cada recta de regresión	$\sum \hat{Y}^2 = S_1$	$\sum n_j - 2k$	$S_1^2$
Diferencias entre los coeficientes de regresión, $b_j$	(por diferencia) $S_2$	$k - 1$	$S_1^2$
Desviación dentro de los calibrados sobre la región lineal determinada por $b'$	$\sum Y^2 - b' \sum XY^2 = S_1 + S_2$	$\sum n_j - k - 1$	$S_3^2$
Desviación dentro de los calibrados sobre la región lineal determinada por $b''$	$\sum Y^2 - b'' \sum XY^2 = S_3$	$K - 2$	$S_4^2$
Diferencias entre los coeficientes, $b'$ y $b''$	$(b' - b'')^2 \sum X^2$	$2 - 1 = 1$	$S_5^2$
Desviación total sobre la región lineal global, $b^o$	$\sum Y^2 - b^o \sum XY^2 = S_T$	$\sum n_j - 2$	$S_T^2$
	$S_2 + S_3 + S_4 = S_6$	$2k - 2$	$S_6^2$

Cada valor individual vendrá designado por las variables  $x_{ij}$  e  $y_{ij}$ , siendo  $i$  la posición que ocupa cada punto experimental dentro de cada calibrado, y  $j$ , la posición que ocupa cada calibrado dentro de los  $k$  totales. Cada calibrado tendrá  $n_j$  puntos experimentales, no siendo necesario que todos los calibrados tengan la misma dimensión. El número total de datos de que disponemos es por tanto:  $N = \sum_{j=1}^k n_j$ . Las sumas de cuadrados, productos de las diferencias,

pendientes y varianzas se calcularán como sigue:

$\Sigma'$  indica la suma total de las desviaciones con respecto a la media de cada calibrado dentro de los calibrados. Se corresponde con la diferencia dentro de los calibrados.

$\Sigma^{\circ}$  indica la suma total de las desviaciones con respecto a la media global (media de todos los calibrados). Se corresponde con la diferencia total.

$\Sigma''$  es la diferencia entre la diferencia total y la diferencia dentro de los tratamientos,  $\Sigma'' = \Sigma^{\circ} - \Sigma'$ , correspondiéndose con la diferencia entre tratamientos.

Los términos correspondientes al análisis de varianza se resumen en la tabla 1.7.

El test a realizar es:

- a) Para la viabilidad de la recta de regresión global se compara la relación de varianzas  $s_6^2/s_1^2$  con el estadístico  $F_{(0.05, 2k-2, N-2k)}$ . Si el valor experimental de  $F$  es menor que el teórico, es debido a que la

desviación de los calibrados individuales sobre la recta de regresión global no es significativa. Por tanto, no existen diferencias significativas entre los calibrados y la calibración se corresponde con la recta de regresión global. Si ocurre lo contrario, es decir, el valor experimental de  $F$  es mayor que el teórico, la desviación de los calibrados individuales sobre la recta de regresión global es significativa existiendo, por tanto, diferencias significativas entre los calibrados. En este caso se puede estudiar a qué es debida la discrepancia (apartados b, c y d).

- b)** Para establecer diferencias entre las pendientes de los calibrados individuales debemos comparar la relación de varianzas  $s_2^2/s_1^2$  con el estadístico  $F_{(0.05, k-1, N-2k)}$ . Si el valor experimental de  $F$  es menor que el teórico, no existen diferencias significativas entre las pendientes individuales y, su media,  $b'$ , se puede tomar como la pendiente representativa (la discrepancia está en el apartado c o d). En caso contrario, existirán diferencias, siendo ésta una de las posibles causas de la inviabilidad de la recta de regresión global.
- c)** Para estudiar la linealidad entre las medias de los calibrados individuales se compara la relación de varianzas  $s_4^2/s_3^2$  con el estadístico  $F_{(0.05, k-2, N-k-1)}$ . Si el valor experimental de  $F$  es menor que el teórico, la desviación de la linealidad entre las medias de los calibrados es inexistente, por lo que, la pendiente  $b''$ , representa satisfactoriamente esta linealidad. En caso contrario, ocurre una desviación significativa de la linealidad entre las medias de los calibrados debiendo estudiarse el apartado d.



- d) Para buscar diferencias significativas entre la pendiente media de los calibrados,  $b'$ , y la pendiente de las medias de los calibrados,  $b''$ , se compara la relación de varianzas  $s_5^2/s_3^2$  con el estadístico  $F_{(0.05, 1, N-k-1)}$ . Si el valor experimental de  $F$  es menor que el teórico no hay diferencias significativas entre ambas pendientes. En caso contrario, ambas pendientes difieren estadísticamente y el fracaso de una recta de regresión global para la calibración se deberá a las diferencias existentes entre los puntos medios.

***Otros usos de la calibración. Comparación de las pendientes de dos rectas de calibrado***

Cuando tenemos dos pendientes empíricas,  $b_1$  y  $b_2$ , y se trata de decidir si son iguales o no, existe un test estadístico que nos permite realizar esta comparación.

En primer lugar, se aplica la prueba de la  $F$  para evaluar si las varianzas de las dos pendientes son iguales. El valor experimental de  $F$  se compara con un valor de  $F$  teórico que es calculado para un número adecuado de grados de libertad ( $n_1-1$  y  $n_2-1$ ) para un nivel de confianza dado,  $\alpha$ .

Si  $F_{\text{exp}}$  es menor que  $F_{\text{teor}}$ , entonces no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas estimadas de los residuos de

ambas líneas; el test se realiza calculando una varianza estimada conjunta de las pendientes de las dos rectas de calibrado, a través de la siguiente ecuación:

$$s_{b_{1,2}}^2 = \frac{(n_1 - 2)s_{b_1}^2 + (n_2 - 2)s_{b_2}^2}{n_1 + n_2 - 4}$$

y comparando el valor  $t$  calculado ( $t_{cal}$ ):

$$t_{cal} = \frac{b_1 - b_2}{s_{b_{1,2}}^2 \left( \frac{1}{\sum (x_{i1} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\sum (x_{i2} - \bar{x}_2)^2} \right)^{1/2}}$$

con el valor  $t$  tabulado con  $n_1+n_2-4$  grados de libertad al nivel de significación elegido. Si  $t_{cal}$  es menor que el tabulado, entonces se asume que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de ambos calibrados.

Si existe una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas estimadas de los residuos de ambas rectas, el test se lleva a cabo calculando el valor  $t$ :

$$t_{cal} = \frac{b_1 - b_2}{(s_{b_1}^2 + s_{b_2}^2)^{1/2}}$$

siendo  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $s_{b_1}^2$  y  $s_{b_2}^2$  las pendientes de las respectivas rectas de calibrado y sus respectivas varianzas. En este último caso, el valor de  $t_{cal}$  se compara con el valor teórico de  $t$ :

$$t = \frac{t_1 s_{b1}^2 + t_2 s_{b2}^2}{s_{b1}^2 + s_{b2}^2}$$

donde  $t_1$  y  $t_2$  son los valores teóricos, para un nivel de significación elegido y  $n_1-2$  y  $n_2-2$  los grados de libertad respectivos, obtenidos a partir de las tablas para un nivel de significación elegido. Si  $t_{cal}$  es menor que  $t$ , entonces no existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes.

PARTE EXPERIMENTAL



## 2. Material y disoluciones

## ***2.A. INSTRUMENTACIÓN UTILIZADA***

### ***Equipo de electroforesis capilar***

Equipo Beckman MDQ con detector de diodos en línea, controlado por un ordenador con el programa Beckman MDQ para el registro y tratamiento de datos. En este equipo se utilizaron capilares Beckman de sílice fundida de 50 cm de longitud efectiva, cuyos diámetros interno y externo son, respectivamente, 75 y 375  $\mu\text{m}$ , alojados en una carcasa con una ventana de detección de 800  $\times$  100  $\mu\text{m}$ .

### ***Registro de voltamperogramas***

El equipo utilizado en la obtención de los voltamperogramas y ciclovoltamperogramas es un Polarógrafo EG&G PAR modelo 303<sup>a</sup>, equipado con un electrodo de referencia de Ag/AgCl, un contraelectrodo de hilo de platino, un electrodo indicador de mercurio que puede funcionar, de forma opcional, como electrodo de gotas estático de mercurio (SMDE) o como electrodo de gota suspendida de mercurio (HMDE), una celda electroquímica de un volumen de 10 mL y un agitador AG&G PAR modelo 305. El polarógrafo

está conectado a un ordenador equipado con un software PAR, mediante el cual se maneja el potencióstato y se memorizan los voltagramas.

### ***Medidas de pH***

Las medidas de pH realizadas en todos los estudios presentados se obtuvieron con un equipo digital Crison, modelo 2002, con una sensibilidad de  $\pm 0.01$  unidades de pH, que está provisto de un electrodo combinado de vidrio y Ag/AgCl.

### ***Balanzas***

Las cantidades necesarias para preparar las disoluciones de los analitos se obtuvieron por pesada en una balanza Sartorius MC1, con resolución para 0.01 mg.

Para preparar disoluciones donde no se requieren tan elevada resolución se utilizó un granatario Sartorius basic, con una resolución para 0.1 g.



### ***Aparato de purificación de agua***

El agua utilizada en la preparación de todas las disoluciones fue obtenida mediante el sistema de purificación Elix/Milli-Q (calidad 18.2 mΩ cm).

## ***2.B. DISOLUCIONES UTILIZADAS***

### ***Disoluciones de analitos***

Se consideran analitos los compuestos químicos estudiados en este trabajo. Las características de las disoluciones utilizadas son que se muestran en la tabla 2.1.

**Tabla 2.1. Analitos**

<b>Compuesto</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Concentración mg/L (disoluciones madre)</b>
Citrato de sildenafilo (*)	Pfizer Spain	MetOH	100
UK-103,320 (*)	Pfizer Spain	MetOH	100
Imatinib	Novartis	H <sub>2</sub> O	150
Metabolito Imatinib	Novartis	H <sub>2</sub> O	200
Mifepristone	Sigma	MetOH	100

(\*)Las disoluciones diluidas contenían un 20% de MetOH y fueron preparadas a partir de las disoluciones madre anteriormente descritas.

Para el estudio de la estabilidad de las disoluciones se prepararon disoluciones madre de cada uno de los compuestos de las concentraciones que se muestran en la tabla 2.1, para las cuales se realizaron medidas espectrofotométricas durante 15 días. Se registraron los espectros entre 190 y 315 nm a una velocidad de barrido de 600 nm min<sup>-1</sup> y se comprobó, por superposición de los espectros con el programa de ordenador acoplado al espectrofotómetro (Data Leader) (157) que los compuestos presentaban espectros constantes durante ese tiempo.

Las disoluciones de los cinco principios activos se han mantenido durante el ensayo en el frigorífico a una temperatura de 4°C y protegidos de la luz.

### ***Disoluciones reguladoras***

Se preparan disoluciones de concentración 200 mM de fosfato a partir de sus correspondientes sales sódicas añadiendo HCl o NaOH hasta alcanzar el pH deseado en cada caso.

### ***Disolución de dodecilsulfato sódico (SDS)***

Se prepararon disoluciones de SDS de concentración 200 mM a partir de sodio dodecilsulfato de 99% de pureza proporcionado por Sigma-Aldrich. La dilución exacta de las mismas proporciona disoluciones de menor concentración.

### ***Otras disoluciones y disolventes utilizados en electroforesis***

Disoluciones de hidróxido sódico y ácido clorhídrico de diferentes concentraciones, utilizadas en el estudio del pH y preparadas a partir de reactivos de calidad analítica.

Otra de las disoluciones utilizadas fue la trietanolamina, reactivo que se utilizó para ajustar el valor de pH en las disoluciones tampón de fosfato.

Los disolventes utilizados fueron de calidad "para análisis".

### ***Otras disoluciones y disolventes utilizados en electroquímica***

Todos los reactivos utilizados en electroquímica fueron de calidad suprapura.

- Disolución  $\text{HClO}_4$  de concentración (70%, densidad 1.67 Kg/L).
- Disoluciones reguladoras  $\text{HAc}/\text{NaAc}$  de concentración 0.1 M de diversos pH.

*Determinación de imatinib y su metabolito*

3. Determinación de imatinib y su metabolito  
en orina mediante electroforesis  
capilar en zona

Imatinib es una de las muchas drogas recientemente lanzadas al mercado para combatir el cáncer. Este compuesto se absorbe en el organismo alcanzando su concentración máxima a las 2-4 horas de su administración oral con una biodisponibilidad absoluta del 98%. Se metaboliza a nivel hepático dando lugar a un metabolito activo, N-desmetil imatinib, excretándose principalmente en heces (68%) y algo menos por orina (13%). Por tanto, el objetivo de este estudio fue proponer un método para la determinación de imatinib y su principal metabolito en orina.

La orina es el producto de la secreción renal con el que se eliminan del organismo los residuos del metabolismo celular de los tejidos. La cantidad de orina eliminada en 24 horas oscila en una persona sana con una dieta normal, entre 1500 y 2000 mL, variando, en condiciones normales, según la cantidad de líquido ingerido y las otras pérdidas de líquidos del organismo (sudor, diarrea, vómitos). La orina recién emitida suele tener un aspecto límpido, pudiendo aparecer turbia por la presencia de moco, pus o sangre. Con el enfriamiento pueden depositarse en el fondo del recipiente distintos precipitados en función de que la orina sea ácida o alcalina.

El color de la orina es, normalmente, amarillo pajizo, pero puede variar según la existencia de diferentes alteraciones o la ingestión de medicamentos que puede dar a la orina un color particular. El olor normal de la orina es característico y también puede variar en función de alimentos que se hayan consumido, de medicamentos o de alteraciones fisiológicas.

La densidad varía entre 1.015 y 1.020 g/cm<sup>3</sup>, desde el punto de vista químico la orina está compuesta por un 96% de agua y 4% de sustancias disueltas que serán los principales interferentes que se encuentren a la hora de

hacer las separaciones. De las sustancias disueltas, algunas son componentes normales, cuya concentración puede variar en relación a las diversas condiciones fisiológicas o patológicas, mientras que otras deber ser consideradas componentes anormales, cuya presencia tiene siempre un significado patológico. Los componentes normales son urea, ácido úrico, creatina, creatinina, amoniaco, ácido hipúrico, cloruros, fosfatos, uratos, oxalatos, urobilina, etc. Y entre los componentes anormales, albúmina (albuminuria), sangre y pigmentos hemáticos (hematuria y hemoglobinuria), acetona (acetonuria), glucosa (glucosuria), pigmentos biliares (bilirrubina), pus (píeria), etc.

Si se realiza un examen microscópico del sedimento (obtenido por centrifugación de la orina) se pueden observar algunas células desprendidas de las vías urinarias bajas (uretra, vejiga) y escasos glóbulos blancos aislados y bien conservados y, a veces, algunos cristales de sustancias inorgánicas precipitadas. Por esta razón, antes de utilizar las muestras de orina recogidas, se dejaron en reposo un tiempo para favorecer la sedimentación de posibles sólidos en suspensión. Si estos hubiesen formado parte de las disoluciones que se inyectan directamente en el equipo habrían obstruido el capilar.

El examen de la orina es el más corriente y usual de los exámenes de laboratorio, indispensable para poder hacer un diagnóstico correcto de ciertas enfermedades y útil e interesante como investigación colateral en casi todos los estados patológicos. El análisis de orina proporciona resultados precisos y atendibles, pero para ello es necesario tomar precauciones y seguir determinadas reglas. Este examen debe ser físico, químico y microscópico (158). En los últimos tiempos los análisis de orina se han convertido en un método



### **Determinación de Imatinib y su metabolito**

bastante aceptado para la investigación de intoxicaciones, empleo de drogas de abuso, control de adictos a las drogas que están siguiendo una terapia de desintoxicación, etc.

### ***3.1. Condiciones de operación***

En el transcurso de este estudio se utilizaron tanto para el electrolito de separación como para las disoluciones de medida, viales de vidrio de 2 mL de capacidad. Este mismo tipo de viales contuvo también las disoluciones de lavado de NaOH y el agua desionizada. Por otro lado, para las muestras de orina se utilizaron viales de polipropileno de 200  $\mu$ L.

Con el objetivo de mantener el nivel de electrolito constante en el vial de separación situado en el polo anódico y evitar en lo posible el efecto de sifón, se utilizaron tres viales con electrolito, uno para lavar el capilar antes de cada separación y situado en el ánodo, y otros dos (uno en el ánodo y otro en el cátodo) para realizar la separación.

El capilar utilizado para todo el estudio era de sílice fundida de una longitud de 60 cm (50 cm hasta el detector) y un diámetro interno de 75  $\mu$ m y estaba montado dentro de una carcasa que presentaba una ventana de detección de 100x800  $\mu$ m.

El capilar se acondicionó inicialmente para activar su superficie interna con un método que incluía un lavado con NaOH 0.5 M (durante 20 minutos), otro con agua (durante 10 minutos para arrastrar el exceso de NaOH) y, por último, una inyección de agua (inyección hidrodinámica, por presión) para realizar la separación a 25 kV y 25°C con tampón fosfato (20 mM, pH 2.0 durante 10 minutos).

### ***3.2. Condiciones de medida***

La identificación y cuantificación de imatinib y su principal metabolito se realizó utilizando el detector de diodos en fila (diodo Array). Por su rapidez de registro, los diodos en fila permiten obtener una representación tridimensional de la absorbancia frente al tiempo y la longitud de onda. Si se realiza un corte a una longitud de onda constante se obtiene el electroferograma, es decir, la representación gráfica de la absorbancia frente al tiempo a una determinada longitud de onda. Cada pico del electroferograma corresponde a un analito cuyo tiempo de migración se obtiene por medida en el máximo correspondiente. El rango de longitudes de onda que se seleccionó para registrar los electroferogramas fue de 190 a 315 nm.

Los analitos se identifican en el diagrama de contorno por medio de su espectro, para ello se realizan inyecciones aisladas de cada uno de los compuestos y se obtienen los espectros en el máximo de los picos. Posteriormente, se determinan los máximos espectrales de absorbancia para obtener los electroferogramas a las longitudes de onda de los máximos de absorbancia correspondientes y realizar las medidas oportunas a dicha longitud de onda. Así, de cada espectro se obtuvo el máximo más significativo, en nuestro caso fue de 257 nm para ambos compuestos, imatinib y su principal metabolito.

### ***3.3. Obtención de la orina***

Para realizar los estudios preliminares así como optimización del método se utilizó orina de personas sanas. Se recogió en recipientes de plástico de 100 mL de capacidad y se dejó un tiempo (aproximadamente 1 hora) para la sedimentación de posibles sólidos en suspensión. Seguidamente se procedió a la dilución de la orina con agua (1:1, v/v).

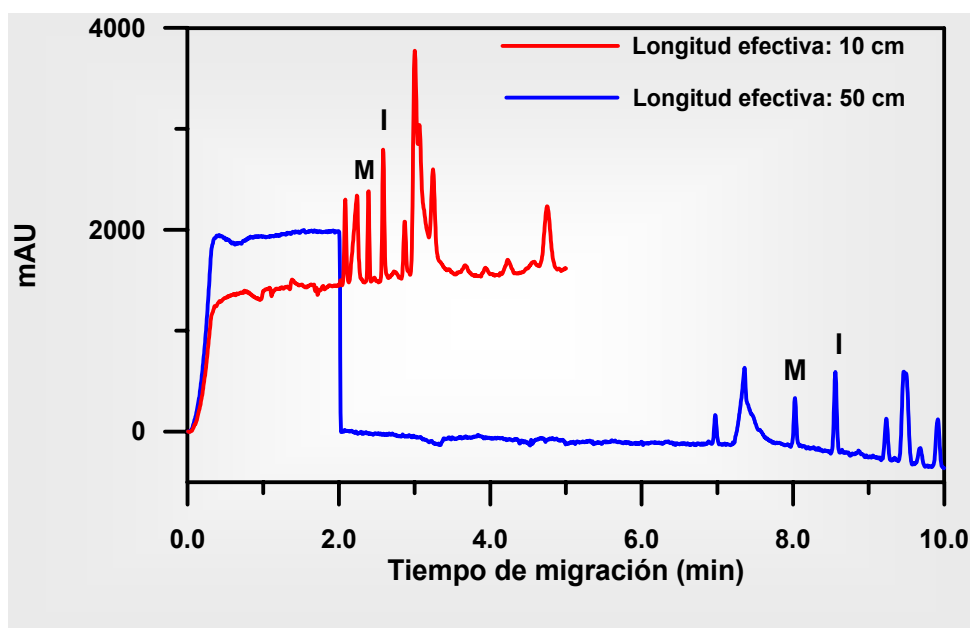
En el apartado de aplicaciones se utilizó la orina de pacientes de leucemia que estaban bajo tratamiento terapéutico de Gleevec (imatinib mesilato).

### ***3.4. Estudios preliminares***

Atendiendo a los objetivos perseguidos a la hora de optimizar un método de separación se realizaron una serie de pruebas para encontrar aquellas condiciones que permitirían optimizar los parámetros químicos e instrumentales.

Los primeros estudios realizados se encaminaron hacia la separación de imatinib y su principal metabolito del resto de los componentes de la orina, y una vez que se consiguió dicha separación, se optimizaron las condiciones que aportasen una buena resolución entre los dos compuestos en un tiempo adecuado y con intensidad de corriente aceptable.

Inicialmente estos estudios se realizaron utilizando el camino más largo del capilar, es decir, la inyección de la muestra se realizaba por el lado del ánodo (50 cm de longitud efectiva). De este modo, el análisis se realizaba en 9 minutos, la resolución de los picos era aceptable pero en cuanto a la sensibilidad era muy baja, esto podía ser debido a la difusión longitudinal molecular que sufrían los componentes de la muestra (figura 3.1). Por esta razón, se realizó la inyección de la muestra por el camino más corto, es decir, por el cátodo (10 cm de longitud efectiva) procediendo posteriormente al cambio de polaridad del sistema. Con esto conseguimos mayor sensibilidad en un menor tiempo de análisis (figura 3.1).



**Figura 3.1.** Influencia de la longitud efectiva del capilar en la determinación de una solución que contenía  $2.4 \text{ mg L}^{-1}$  de Imatinib (I) y  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$  de metabolito (M). Condiciones de operación:  $100 \text{ mM}$  de tampón fosfato de  $\text{pH } 2.0$ ,  $25 \text{ kV}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $5 \text{ s}$  inyección ( $0.5 \text{ psi}$ )

### 3.5. Influencia del pH en la separación

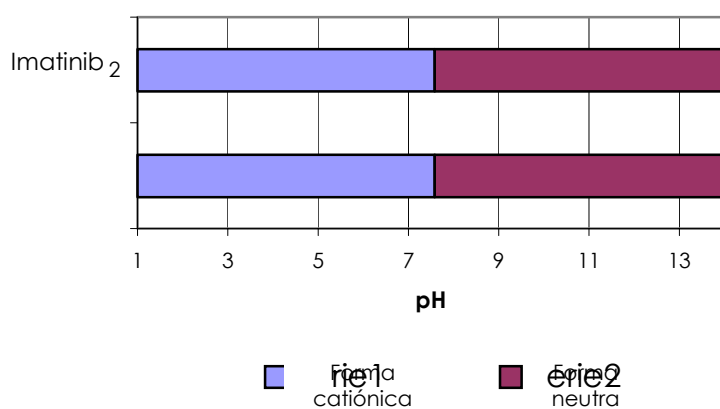
El pH del electrolito es un parámetro fundamental porque, por un lado, gobernará el grado de disociación de las moléculas que se van a separar y, por

otro lado, también gobernará el grado de ionización de la sílice. De forma que a un pH alto los grupos silanoles están totalmente ionizados y existe un potencial zeta muy elevado, esto tiene como resultado un valor elevado de FEO. Lo contrario sucede a pH bajo, ya que la disociación es menor y también lo es el valor de FEO (159). Teniendo en cuenta estos hechos y que el valor de FEO no empieza a ser significativo hasta pH 4.0, se realizaron separaciones a diferentes valores de pH comprendidos entre 2.0 y 12.0 con tampón fosfato 20 mM.

El imatinib así como su metabolito presentan cuatro valores de pKa ( $pK_{a1}= 1.60$ ;  $pK_{a2}= 2.70$ ;  $pK_{a3}= 3.19$  y  $pK_{a4}= 7.58$ ), por tanto, en base a estos valores podremos explicar su comportamiento catiónico o neutro en función del pH.

Para valores de pH comprendidos entre 2.0 y 3.2, los tiempos de migración de ambos compuestos son menores que los del FEO, por tanto imatinib y su metabolito presentarían su forma catiónica en esas condiciones. Esto es debido a que estas dos moléculas presentan una gran densidad de carga positiva con respecto al tamaño de las moléculas, de ahí que sus movilidades fueran mayores que la del FEO (ver figura 3.2).

En el intervalo de pH comprendido entre 3.2 y 7.6 la densidad de carga positiva que presentaban estas moléculas es muy pequeña con respecto a su tamaño, por esta razón tenían prácticamente la misma movilidad que el FEO. En el rango de pH comprendido entre 7.6 y 12.0, los dos compuestos manifestaban el mismo tiempo de migración que el FEO debido a que presentaban su forma neutra.



**Figura 3.2.** Esquema de la ionización de imatinib y su metabolito en función del pH.

Un pH de 2.0 fue elegido para el estudio en ECZ, debido a que se obtuvo una mejor resolución con respecto a valores de pH mayores, además de un menor tiempo de análisis.

Para tratar de disminuir al máximo la adsorción de los cationes sobre la pared del capilar se utilizó trietanolamina, como reactivo adicional, en el electrolito de separación. Para ello, se partió de una disolución 200 mM de tampón fosfato y se ajustó el valor de pH a 2.0 con trietanolamina.

Una vez establecido el valor de pH para llevar a cabo la separación de estos dos compuestos, se procedió a estudiar los demás parámetros químicos e



instrumentales propios de esta técnica de separación. Para ello se utilizaron disoluciones de orina que habían sido diluidas con agua (1:1,v/v) y posteriormente se les adicionaron los compuestos en estudio.

### ***3.6. Influencia de la concentración del tampón de separación***

La fuerza iónica del tampón tiene efectos significativos sobre la movilidad de los solutos y la eficacia de la separación, de ello deriva el interés por el estudio de este parámetro (160). Si la temperatura del capilar está controlada, al aumentar la concentración del tampón, disminuye el FEO porque se produce un fenómeno de compresión de la doble capa difusa a nivel de la pared interna del capilar y disminuye, por tanto, el potencial zeta. La consecuencia final es el aumento de los tiempos de análisis (161). Por otro lado, al disminuir la concentración del tampón los tiempos de análisis se hacen más cortos, pero con el inconveniente de que los picos se pueden ensanchar y pueden dejar de ser simétricos por el fenómeno de electrodispersión (162). También disminuye la capacidad de tamponar del electrolito a bajas concentraciones.

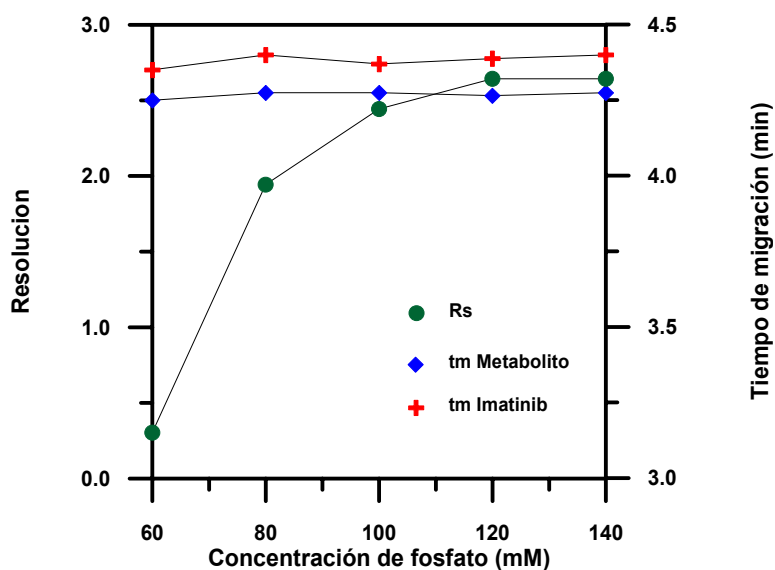
El objetivo fundamental, a la hora de seleccionar una u otra concentración de tampón, es la resolución, es decir, en que medida los picos son más estrechos y alejados unos de otros; pero, también son importantes el tiempo de análisis y la eficacia de la separación.

Para optimizar este parámetro se prepararon diferentes disoluciones de electrolito de separación, a partir de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y ajustando el pH a 2.0 con trietanolamina, en concentraciones variables de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  entre 60 y 140 mM. En todos los casos, las separaciones correspondientes se realizaron a -25 kV y 25°C, con un tiempo de inyección de 5 s a una presión de 0.5 psi sobre una muestra que contenía 1.48 mg L<sup>-1</sup> de metabolito y 2.45 mg L<sup>-1</sup> de imatinib en orina.

A lo largo de todo el intervalo de concentraciones estudiado se puede ver que la variación de la fuerza iónica no ejerce una influencia crucial en los tiempos de migración de los compuestos estudiados debido a que trabajamos a pH ácidos y el FEO es muy bajo. Sin embargo, si que se observa un incremento en la resolución entre los picos en el intervalo comprendido entre 60 y 120mM. Para altas concentraciones, la resolución permanece constante debido al incremento de temperatura que se produce en el capilar causado por el calentamiento por efecto Joule (figura 3.3). Se seleccionó una concentración correspondiente a 100 mM por mantener una buena resolución de pico y una corriente no muy elevada (tabla 3.1 y figura 3.3), lo cual consigue reducir el ruido de la línea base.

**Tabla 3.1.** *Influencia de la concentración de tampón en la intensidad de corriente*

<b>Concentración fosfato (mM)</b>	<b>Intensidad (μA)</b>
<b>60</b>	46.2
<b>80</b>	58.0
<b>100</b>	68.8
<b>120</b>	80.0
<b>140</b>	90.7



*Figura 3.3. Influencia de la concentración de fosfato pH 2.0 sobre los tiempos de migración y la resolución.*

### ***3.7. Estudio de la influencia del voltaje sobre la separación***

El campo eléctrico es el parámetro que resulta más fácil de manipular, un aumento en su valor provoca un aumento de la movilidad del FEO. En contrapartida este aumento también tiene efectos negativos relacionados con

los valores de intensidad de corriente que se alcanzan y el calentamiento por efecto Joule (163).

Cuanto mayor sea el voltaje aplicado mayores eficacias se obtienen y más cortos tiempos de análisis aunque ello conlleva una disminución de la resolución, debida a la mayor producción de calor.

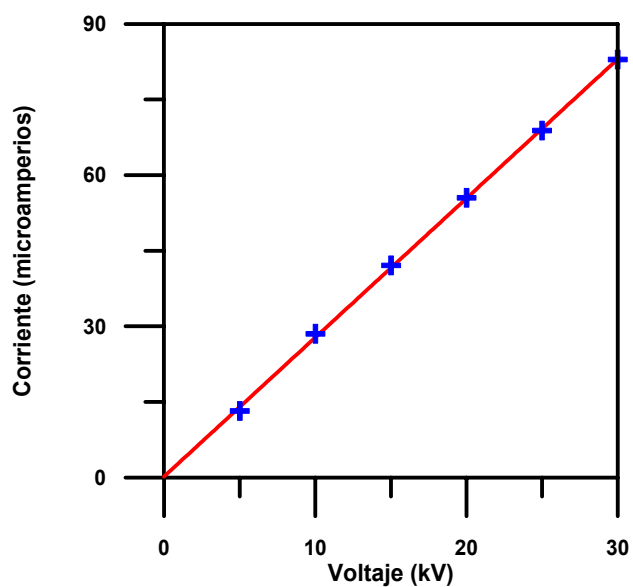
El máximo voltaje que se puede aplicar en una separación puede determinarse gráficamente representando la intensidad de corriente generada frente al voltaje aplicado (ley de Ohm).

El voltaje se varió entre -5 y -30 kV y para cada valor de potencial se realizó una separación con el fin, no sólo de saber como varía la intensidad de corriente con el voltaje aplicado, sino de analizar los electroferogramas resultantes en cada caso para analizar la influencia sobre la separación. En todos los casos las separaciones correspondientes se realizaron con tampón fosfato 100 mM de pH 2.0, 25°C y un tiempo de inyección de 5 s a una presión de 0.5 psi sobre una muestra que contenía 1.48 mg L<sup>-1</sup> de metabolito y 2.45 mg L<sup>-1</sup> de imatinib en orina.

Inicialmente, se comprobó mediante la representación de la ley de Ohm, que existía linealidad entre voltaje aplicado y corriente generada en todo el intervalo estudiado, como se puede ver en la figura 3.4.

Como se puede comprobar en la tabla 3.2, los tiempos de migración disminuyen al aumentar el voltaje aplicado, por tanto, los tiempos de análisis son más cortos. En contrapartida se produce un aumento en la intensidad de corriente (figura 3.4) y calentamiento por efecto Joule.

Con objeto de disminuir el tiempo de análisis se llegó a una situación de compromiso, eligiendo un potencial de  $-25$  kV ya que la resolución entre los picos era aceptable con una intensidad de corriente no muy elevada (no se aprecian los efectos negativos derivados del calentamiento por efecto Joule) y tiempos de análisis aceptables.



*Figura 3.4. Representación gráfica de la ley de Ohm para la selección del voltaje.*

*Tabla 3.2. Variación de los tiempos de migración y resolución con el voltaje.*

<b>Voltaje (kV)</b>	<b>t<sub>m</sub> Metabolito (min)</b>	<b>t<sub>m</sub> Imatinib (min)</b>	<b>Rs</b>
<b>-5</b>	12.08	13.24	2.72
<b>-10</b>	6.14	6.71	3.34
<b>-15</b>	4.16	4.53	3.68
<b>-20</b>	3.09	3.37	4.28
<b>-25</b>	2.44	2.65	4.03
<b>-30</b>	1.96	2.11	3.42

### ***3.8. Efecto de la temperatura en la separación***

La temperatura en el seno del capilar afecta a la viscosidad del medio de forma que un aumento de ésta provoca una mayor movilidad del FEO y de los analitos reduciéndose, por tanto, los tiempos de análisis. Pero, además, se debe tener en cuenta que por encima de 35°C el calentamiento por efecto Joule y los gradientes de temperatura son cada vez más pronunciados y se

originan también ensanchamientos y se produce la pérdida de forma de los picos.

Bajo las condiciones químicas seleccionadas en apartados anteriores, se estudió el efecto de la temperatura en la migración de los compuestos. Para ello se realizaron separaciones a diferentes temperaturas en el intervalo comprendido entre 20 y 35°C.

Como se observa en la tabla 3.3, van disminuyendo los tiempos de migración al aumentar la temperatura y, por consiguiente, los tiempos de análisis, pero se empieza a perder resolución. Finalmente, se seleccionó una temperatura de 25°C porque se consigue una separación rápida, con buena resolución y una línea base sin perturbaciones.

**Tabla 3.3. Influencia de la temperatura.**

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>tm Metabolito (min)</b>	<b>tm Imatinib (min)</b>	<b>Rs</b>
<b>20</b>	2.63	2.86	3.80
<b>25</b>	2.40	2.60	4.10
<b>30</b>	2.20	2.37	3.81
<b>35</b>	2.03	2.19	1.30

### ***3.9. Influencia del tiempo de inyección de la muestra***

Se ha utilizado siempre la inyección hidrodinámica por presión, por tanto, el tiempo que dure la inyección será un parámetro fundamental, ya que determinará el volumen de disolución inyectada.

Para el proceso de separación se utilizó como electrolito de separación una disolución que contenía tampón fosfato 100 mM de pH 2.0. Todos los electroferogramas se registraron a -25 kV y una presión de inyección de 0.5 psi, pero a diferentes tiempos de inyección de muestra en el intervalo de 3 a 15 segundos, siempre utilizando para ello el camino corto del capilar (10 cm de longitud efectiva).

Los resultados de las inyecciones se muestran en la figura 3.5.



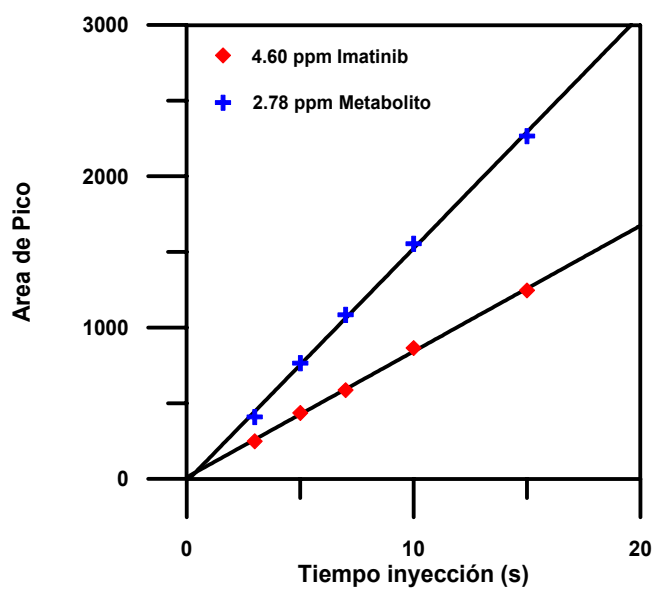


Figura 3.5. Estudio de las áreas de pico en función de los tiempos de inyección.

Tabla 3.4. Influencia del tiempo de inyección en la resolución.

Tiempo de inyección (s)	3	5	7	10	15
Resolución	2.70	2.65	2.70	2.84	2.48

La cantidad de muestra inyectada es muy limitada debido a que se está inyectando por el lado corto del capilar (10 cm de longitud efectiva) y se debería inyectar una cantidad equivalente al 2% de la longitud efectiva del capilar. Sin embargo, al inyectar 10 s (9.7% de la longitud efectiva del capilar) se obtuvo una resolución entre los picos aceptable. Por otro lado, para tiempos de inyección superiores la resolución entre los picos de los compuestos en estudio es menor, al igual que la resolución entre los picos de los componentes de la orina y los de metabolito e imatinib. El tiempo de inyección seleccionado fue de 10 s, ya que se obtuvo una resolución aceptable.

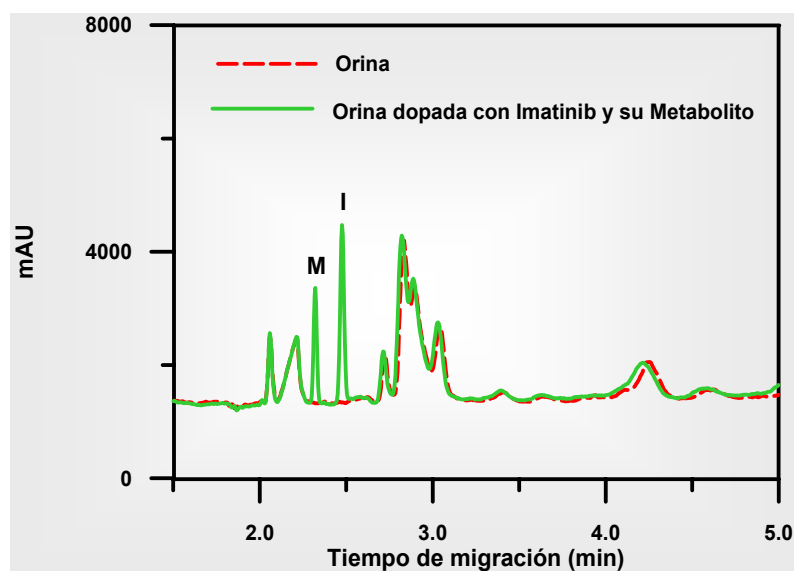
#### ***3.10. Condiciones químicas e instrumentales finales***

Realizado, sistemáticamente, el estudio sobre la influencia de los diferentes parámetros de interés analítico, se pudieron establecer aquellas condiciones consideradas como óptimas. La tabla 3.5 recoge las variables experimentales que se seleccionaron como óptimas para abordar tanto los calibrados y estudios de repetitividad y reproducibilidad, como las determinaciones del imatinib y su principal metabolito en muestras reales.

**Tabla 3.5. Condiciones finales**

<b>Electrolito de separación</b>	100 mM tampón fosfato de pH 2 (ajustado con trietanolamina)
<b>Voltaje</b>	-25 kV
<b>Temperatura</b>	25°C
<b>Tiempo de inyección</b>	10 segundos

La figura 3.6 ilustra un electroferograma de una disolución en orina que contenía 1.5 mg L<sup>-1</sup> de metabolito y 2.4 mg L<sup>-1</sup> de imatinib en las condiciones finales seleccionadas como óptimas y registrado a una longitud de onda de 257 nm. Las muestras de orina fueron diluidas con agua (1:1, v/v).



*Figura 3.6. Electroferograma obtenido bajo las condiciones químicas e instrumentales finales.*

### ***3.11. Límites de detección y cuantificación***

El límite de detección es el nivel de concentración más bajo de analito que proporciona una señal en el instrumento estadísticamente diferente a la señal de un blanco analítico. Debido a la ambigüedad de la definición existen diferentes métodos para calcularlo. La definición que adoptó la IUPAC en 1975

dice que "el límite de detección expresado como una concentración  $c_L$ , se deriva de la medida más pequeña  $y_L$ , que puede ser detectada con una certeza razonable para un procedimiento analítico dado" (164). Este concepto fue aclarado más tarde por la ACS que dice que "el límite de detección es la concentración más baja de un analito que un procedimiento analítico puede detectar con seguridad" (165). En la definición de límite de detección de la IUPAC establece ese nivel de seguridad según la expresión:

$$y_L = y_B + k s_B$$

donde  $y_B$  es el valor medio de la señal del blanco,  $s_B$  es su desviación estándar y  $k$  es un factor numérico escogido según el nivel de confianza deseado. Si la señal del blanco analítico no difiere significativamente de la ordenada en el origen de la recta de calibrado, la expresión que define el límite de detección según la IUPAC es:

$$c_L = \frac{y_B - a + k s_B}{b} = \frac{k s_B}{b}$$

La IUPAC recomienda un factor de seguridad  $k = 3$  de forma que el límite de detección,  $c_L$ , es la concentración de analito que proporciona una señal igual a la del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco, es decir:

$$C_L = \frac{3S_B}{b}$$

Otros autores como Kaiser (166) y Curie (167) proponen aumentar el valor del factor de seguridad,  $k$ . Aunque otros además, consideran que el límite de detección debe tener en cuenta el error de la pendiente de la recta de calibrado (168,169).

Para técnicas de separación tales como la EC se han propuesto otros métodos para calcular los límites de detección y cuantificación. Para el trabajo que se está desarrollando se calcularon en función de la relación señal-ruido sobre la línea base, es decir, el nivel de ruido del electroferograma. Para ello se realizó una primera inyección, por el lado corto, de una disolución ( $t_i = 10$  s) que no contenía ninguno de los analitos y estaba constituida únicamente por la orina (dilución 1:1, v/v). En el electroferograma resultante se mide el nivel de ruido expresado en unidades de absorbancia (UA) a la longitud de onda seleccionada (257 nm), la cual corresponde con el máximo de absorbancia de nuestros analitos y en los tiempos de migración de los dos analitos estudiados.

A continuación, se llevó a cabo la inyección de una disolución de orina (dilución 1:1, v/v) ( $t_i = 10$  s) que contenía a los dos compuestos, cada uno en una concentración de 1.48 y 2.45 mgL<sup>-1</sup> de metabolito e imatinib, respectivamente. Entonces se midió la altura de cada pico, a la longitud de onda correspondiente, en unidades de absorbancia. Conocidos estos valores y la concentración a la que correspondían, se compararon con los datos de unidades de absorbancia pertenecientes al electroferograma tipo para obtener, finalmente, tanto los límites de detección, como los de cuantificación.

La evaluación del nivel de ruido se realizó en una zona del electroferograma que equivalía a unas 10 veces el ancho de los picos. Así, el límite de detección queda establecido como aquella concentración de compuesto que origina un pico con una altura que es tres veces el nivel de ruido (170) y el límite de cuantificación se calcula como 10/3 veces el límite de detección. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 3.6.

*Tabla 3.6. Límites de detección y cuantificación.*

COMPUESTO	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LC (mg L <sup>-1</sup> )
Imatinib	0.1	0.3
Metabolito	0.1	0.3

### **3.12. Calibrado y estudio estadístico**

Para evaluar la respuesta frente a la concentración se utilizaron las áreas de pico corregidas (APC) de cada compuesto, es decir, el área del pico dividida

entre el tiempo de migración del analito, calculadas a partir de los electroferogramas registrados a la longitud de onda característica (257 nm).

El estudio de la linealidad se realizó preparando diferentes calibrados, teniendo en cuenta si la orina era de hombre o de mujer, o si la orina se le había sometido a un proceso de congelación. Las muestras fueron preparadas a partir de orina diluida (1:1, v/v). El intervalo lineal estudiado en todos los casos estaba comprendido entre 0.4 y 30.0 mg L<sup>-1</sup> (n=7). En la tabla 3.7 quedan reflejadas las ecuaciones de las rectas de calibrado ( $\alpha = 0.05$ ).

En las figuras 3.7 y 3.8 se representan las áreas corregidas de los compuestos frente a las concentraciones para un calibrado preparado a partir de una orina de mujer sin haberlo sometido a un proceso de congelación.



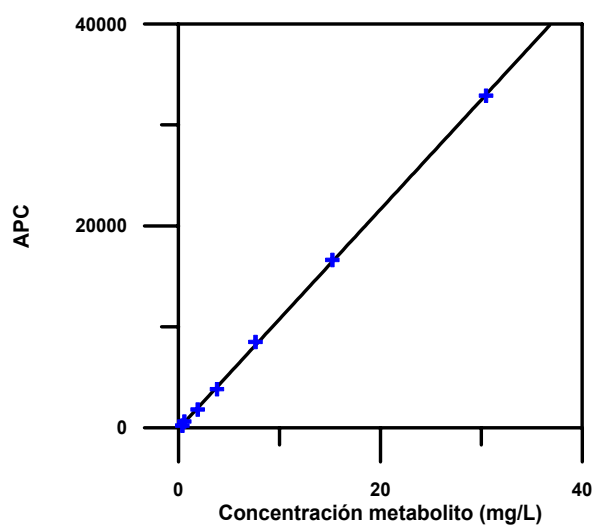


Figura 3.7. Recta de calibrado de metabolito

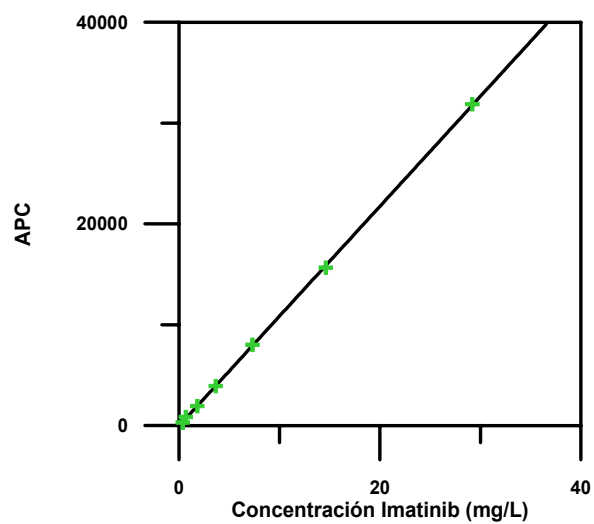


Figura 3.8. Recta de calibrado de Imatinib

*Tabla 3.7. Rectas de calibrado*

COMPUESTO	ECUACIÓN	R <sup>2</sup>
<i>Orina Hombre</i>		
<b>Metabolito</b>	<b>[1]</b> APC = (37.40±572.78) + (1065.15±43.07) C <sub>M</sub>	0.9988
<b>Imatinib</b>	<b>[2]</b> APC = (-16.76±458.14) + (1105.51±35.96) C <sub>G</sub>	0.9992
<i>Orina Mujer</i>		
<b>Metabolito</b>	<b>[3]</b> APC = (-108.08±277.57) + (1086.15±20.87) C <sub>M</sub>	0.9997
<b>Imatinib</b>	<b>[4]</b> APC = (-32.01±165.89) + (1089.32±13.02) C <sub>G</sub>	0.9999
<i>Orina Hombre tras haber sufrido un proceso de congelación</i>		
<b>Metabolito</b>	<b>[5]</b> APC = (6.18±462.41) + (1143.81±34.77) C <sub>M</sub>	0.9993
<b>Imatinib</b>	<b>[6]</b> APC = (-153.39±552.29) + (1182.13±43.34) C <sub>G</sub>	0.9999

Se llevó a cabo el análisis de varianza (test ANOVA) para comparar las diferentes rectas de calibrado que se habían realizado, con el fin de comprobar si existían diferencias significativas entre ellas. Si el valor de F experimental (F<sub>exp</sub>) es menor que el valor de (F<sub>teor</sub>) no hay diferencias significativas entre las varianzas, sin embargo, si el valor de F<sub>exp</sub> es mayor que el valor de F<sub>teor</sub> si habrá diferencias significativas. El test estadístico t se lleva a cabo para comparar las diferentes pendientes de las rectas de calibrado. Si el valor experimental t (t<sub>exp</sub>) es menor

que el teórico ( $t_{teor}$ ) no habrá diferencias significativas entre las pendientes de las rectas de calibrado. En la tabla 3.8 se muestran los valores de F y t.

Se pudo comprobar que no existían diferencias significativas entre las rectas de calibrado realizadas con orina de hombre y mujer (rectas ([1] y [3]) y ([2] y [4])), pero sí había diferencias significativas entre una orina que no había sufrido proceso de congelación y otra que sí lo había sufrido (orina, la cual estuvo congelada durante 2 semanas a  $-18^{\circ}\text{C}$ ), rectas ([1] y [5]) y ([2] y [6]). Esto podía ser debido a los posibles cambios que se pueden dar en la matriz (variación en la fuerza iónica).

**Tabla 3.8. Análisis de varianza**

<b>Rectas de calibrado</b>	<b>F<sub>exp</sub></b>	<b>F<sub>teor</sub></b>	<b>t<sub>exp</sub></b>	<b>t<sub>teor</sub></b>
<b>[1] y [3]</b>	4.26	5.05	1.15	2.57
<b>[2] y [4]</b>	7.63	5.05	1.09	2.57
<b>[1] y [5]</b>	1.53	5.05	3.65	2.57
<b>[2] y [6]</b>	1.45	5.05	3.50	2.57

### **3.13. Precisión**

Para llevar a cabo el estudio de la repetibilidad del método descrito se preparó una muestra que contenía una concentración de 0.6 mg L<sup>-1</sup> y 0.4 mg L<sup>-1</sup> de imatinib y su metabolito, respectivamente, en orina y se hicieron 9 replicados consecutivos en las condiciones químicas e instrumentales seleccionadas como óptimas.

Para evaluar la reproducibilidad entre días consecutivos, se preparó otra muestra igual que la anteriormente citada y se volvieron a hacer nueve separaciones consecutivas en las mismas condiciones seleccionadas.

Se compararon las varianzas de las series según el test estadístico F de Snedecor para pruebas de dos colas, que se aplica en este caso porque se trata de dilucidar si las variaciones entre las series de diferentes días son significativamente diferentes. Así, se encontró que no existían diferencias significativas entre las series para un intervalo de confianza del 95%.

Los resultados obtenidos, en términos de medias ( $APC_{Media}$ ), desviación estándar (DE) y porcentaje de desviación estándar relativa (DER) se muestran en la tabla 3.9.

**Tabla 3.9. Repetibilidad y Reproducibilidad del método (n=9).**

	Metabolito		Imatinib	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
<b>APC<sub>Media</sub></b>	212	203	373	372
<b>DE</b>	17.0	9.34	20.7	18.4
<b>DER</b>	8.03	4.59	5.54	4.95
<b>F<sub>exp</sub></b>	3.32		1.26	
<b>F<sub>teor</sub></b>	3.44		3.44	

### **3.14. Aplicaciones**

Para comprobar la validez del método propuesto se tomaron por triplicado muestras de orina a las que se añadieron los dos compuestos a distintos niveles de concentración y en distintas proporciones. Posteriormente las muestras fueron diluidas con agua (1:1,v/v) y a continuación se procedió a la determinación cuantitativa de imatinib y su metabolito en las diferentes muestras utilizando el método de las adiciones estándar.

El parámetro seleccionado para la cuantificación fue el APC, medida a la longitud de onda de máxima absorción de cada uno de los compuestos, como se hizo en los capítulos anteriores.

Se realizaron las separaciones y se registraron los electroferogramas para su posterior análisis cuantitativo. En la tabla 3.10 se recogen los valores de recuperación para las muestras preparadas en el laboratorio. Como se puede ver, todas las recuperaciones estuvieron próximas al 100%, dentro de la precisión que se espera para la determinación de cada uno de los compuestos.

*Tabla 3.10. Recuperaciones obtenidas en las muestras preparadas en el laboratorio.*

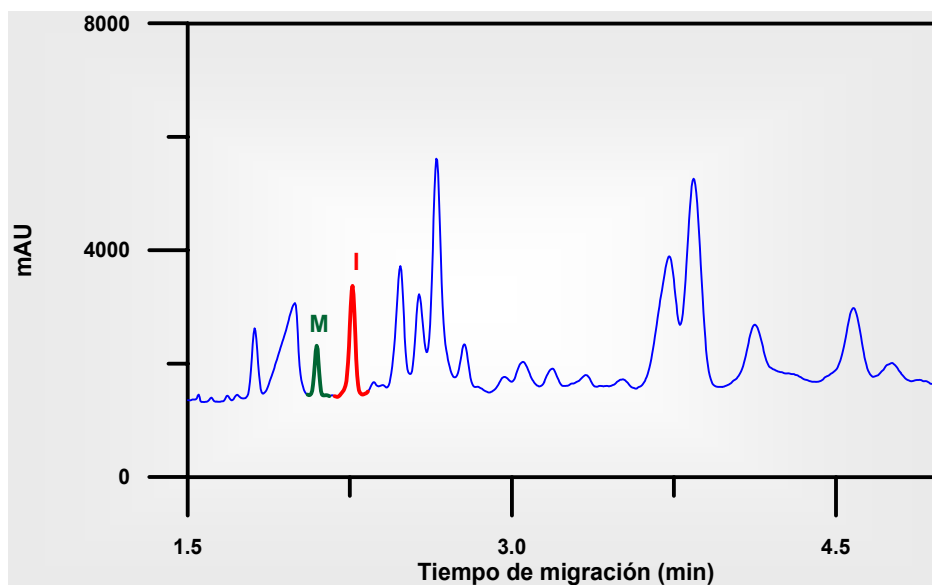
MUESTRA	METABOLITO		IMATINIB	
	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
M 1	3.8	104	7.3	104
M 2	4.8	102	9.5	102

Pero con el fin de comprobar la eficacia de este método, se llevó a cabo el análisis en muestras reales de dos enfermos que se encontraban bajo tratamiento terapéutico con este fármaco, observándose la posibilidad

inmediata de su análisis, debido a la ausencia total de interferencias en las muestras analizadas.

La figura 3.9 muestra el electroferograma correspondiente a la muestra de orina de un paciente A, el cual estaba bajo tratamiento de 100 mg de Gleevec (imatinib) al día. Esta muestra se encontraba congelada, por lo que fue necesario para su análisis un proceso de descongelación y centrifugación, a continuación ésta fue diluida con agua (1:3, v/v) para obtener una concentración de los compuestos de interés dentro del intervalo lineal estudiado. Posteriormente, se procedió a la determinación cuantitativa de imatinib y su metabolito bajo las condiciones químicas e instrumentales optimizadas utilizando el método de las adiciones estándar. La muestra se preparó por triplicado. En este caso, las concentraciones encontradas en orina para el paciente A, teniendo en cuenta el factor de dilución, fueron 6.9 y 3.1 mg L<sup>-1</sup> de imatinib y su metabolito, respectivamente.

De igual manera, se procedió al análisis de una muestra de orina de un paciente B, pero en este caso el tratamiento era de 600 mg/día de Gleevec (imatinib). Por tanto, la dilución necesaria fue mayor, 1:8 (v/v). La muestra se preparó por triplicado, a continuación, se realizaron las separaciones y se registraron los electroferogramas para su posterior análisis cuantitativo. En este caso también se utilizó el método de las adiciones estándar para realizar la determinación de los compuestos. Las concentraciones encontradas, teniendo en cuenta el factor de dilución, fueron 32.4 y 14.3 mg L<sup>-1</sup> de imatinib y su metabolito, respectivamente.



**Figura 3.9.** Electroferograma correspondiente a una muestra de orina del paciente A (100 mg/día) diluida con agua 1:3 (v/v) en las condiciones químicas e instrumentales optimizadas.



4. Determinación de imatinib y su metabolito  
mediante técnicas electroquímicas  
en muestras de orina



El estudio que se propone en este capítulo, se ha realizado con la finalidad de establecer métodos electroquímicos, que permitan la determinación cuantitativa total de Imatinib y su principal metabolito en orina por técnicas electroquímicas tales como:

- Voltamperometría cíclica
- Voltamperometría de redisolución por diferencial de pulso
- Voltamperometría de redisolución por onda cuadrada

El objetivo de este estudio es realizar el análisis de imatinib y su metabolito en muestras biológicas reales, por lo que necesitaremos en todo momento conseguir una apropiada sensibilidad y selectividad.

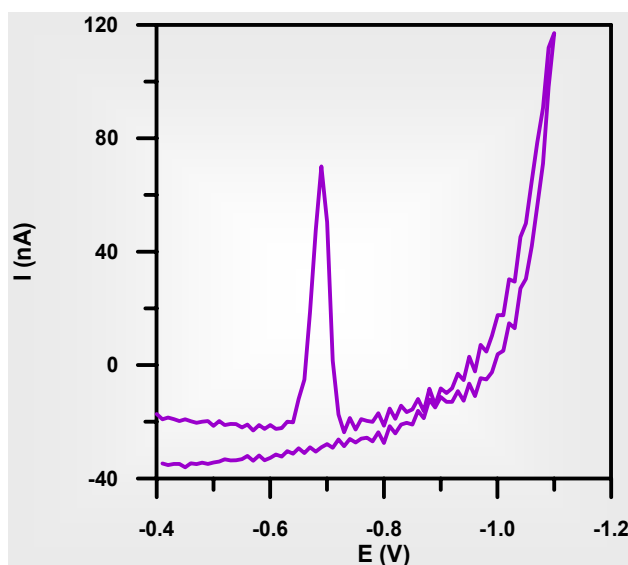
#### **4.1. Estudio de Imatinib por voltamperometría cíclica**

La voltamperometría cíclica es de las técnicas electroquímicas que mayor información suministran sobre una reacción electroquímica en un corto periodo de tiempo. Permite evaluar los siguientes aspectos:

1. Reversibilidad de la reacción redox originado en la superficie electródica de nuestro electrodo estacionario de mercurio.
2. Naturaleza del proceso redox en cuanto a sus propiedades de difusión, adsorción, cinético o catalítico que informan no sólo de la velocidad de desplazamiento del analito sino también de su capacidad de acumularse en dicha superficie o difundir de nuevo a la disolución.

Por tanto, la voltamperometría cíclica nos permitirá conocer la naturaleza de los procesos de oxido-reducción de imatinib. Para ello se preparó una muestra de Imatinib de concentración  $1.0 \times 10^{-6}$  M en  $\text{HClO}_4$  0.010 M registrándose los ciclovoltamperogramas entre -0.45 y -1.20 V a una velocidad de barrido de 100 mV/s después de desairear la muestra pasando  $\text{N}_2$  de alta pureza durante 10 minutos tal y como se realizará en toda la experiencia de este capítulo. La fisonomía del ciclovoltamperograma obtenido se muestra en la figura 4.1, donde se puede observar un único pico de reducción a -0.700 V frente al electrodo de referencia Ag/AgCl. Se puede apreciar asimismo, que este proceso catódico no se corresponde con ningún proceso de oxidación cuando se realiza el barrido inverso hacia potenciales positivos, lo que indica su irreversibilidad.

La fisonomía del ciclovoltamperograma muestra con su forma triangular y extremadamente estrecha la posible acumulación del imatinib sobre el electrodo estacionario de mercurio, lo que procedemos a evaluar a continuación mediante la influencia del parámetro velocidad de barrido.



**Figura 4.1.** Ciclovoltamperograma de  $1.0 \times 10^{-6}$  M de Imatinib en  $\text{HClO}_4$ .

Con el fin de comprobar si el proceso estaba controlado por adsorción o difusión se llevaron a cabo las siguientes experiencias:

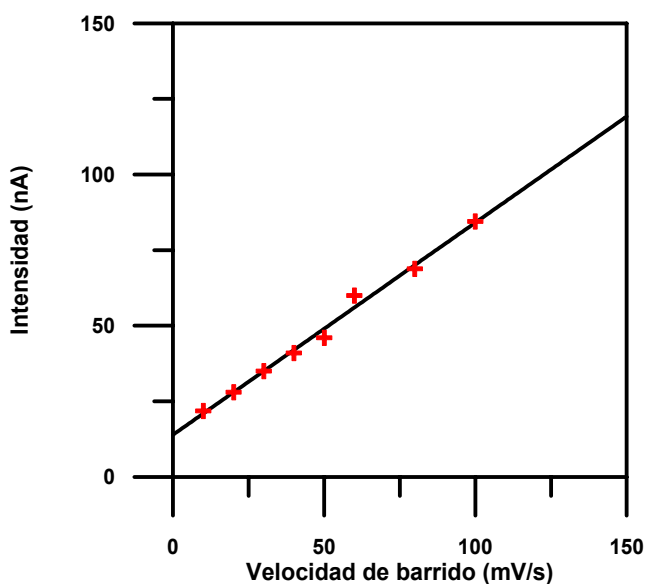
➤ **Variación de la intensidad de pico con la velocidad de barrido**

En este estudio se preparó una muestra de 10 mL de una disolución de  $1.0 \times 10^{-6}$  M de Imatinib en  $\text{HClO}_4$  0.010 M registrándose los ciclovoltamperogramas entre - 0.45 y - 1.20 V a las velocidades de barrido comprendidas entre 10 y 100 mV/s, después de desairear la muestra haciendo burbujear durante 10 minutos  $\text{N}_2$  de alta pureza.

En la tabla 4.1 se muestran los valores de intensidad de pico ( $I_p$ ) para las distintas velocidades de barrido ( $V_b$ ) a las que se registraron los ciclovoltamperogramas. En la figura 4.2 se observa la representación gráfica de  $I_p$  frente a la velocidad de barrido para el único pico catódico existente.

**Tabla 4.1.** Variación de  $I_p$  con la velocidad de barrido

$V_b$ (mV/s)	$I_p$ (nA)
10	21.8
20	28.0
30	35.0
40	41.0
50	46.0
60	60.0
80	68.8
100	84.5



**Figura 4.2.** Representación  $I_p$  frente a la velocidad de barrido para el proceso de reducción de Imatinib.

Como se puede observar en la figura 4.2 existe una relación lineal entre la  $I_p$  y  $V_b$  hasta un valor de 100 mV/s, lo cual nos indica que el proceso está controlado por la adsorción, siendo la ecuación que relaciona la intensidad de pico con la velocidad de barrido de Imatinib sobre el electrodo de trabajo la siguiente:

$$I_p = (13.96 \pm 3.73) + (0.70 \pm 0.07) V_b \quad r^2 = 0.991 \quad (n=8)$$

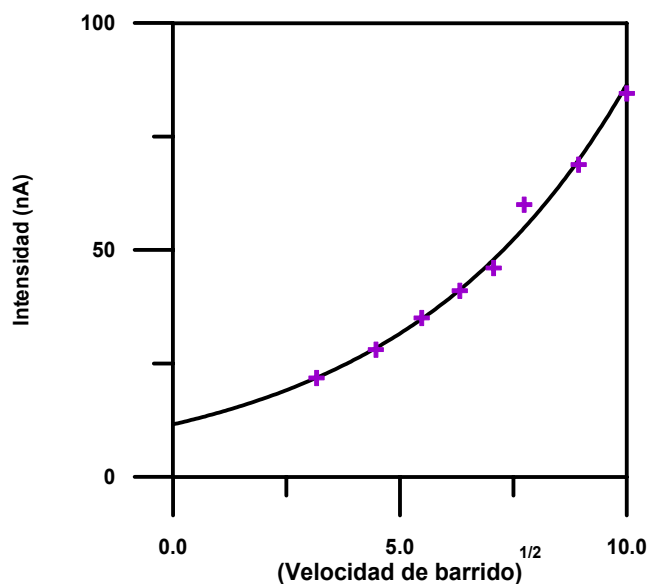
➤ **Variación de la intensidad de pico con la raíz cuadrada velocidad de barrido**

Dicha relación ( $I_p$  frente  $V_b^{1/2}$ ) se llevó a cabo a partir de los datos obtenidos en el apartado anterior. En la tabla 4.2 se muestran los valores correspondientes a intensidad de pico y raíz cuadrada de la velocidad de barrido para esos mismos datos.

*Tabla 4.2. Variación de  $I_p$  con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido*

$V_b^{1/2}$ (mV/s) <sup>1/2</sup>	$I_p$ (nA)
3.16	21.8
4.47	28.0
5.48	35.0
6.32	41.0
7.07	46.0
7.74	60.0
8.94	68.8
10.00	84.5





**Figura 4.3.** Representación gráfica de intensidad de pico frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Como se puede apreciar en la figura 4.3 no existe linealidad entre  $I_p$  y  $V_b^{1/2}$ , lo que indica que el proceso no está controlado exclusivamente por la difusión del compuesto imatinib a la superficie electródica, existiendo una componente de adsorción considerable en el mecanismo de transporte y reducción de dicho compuesto, hecho comentado anteriormente por la fisonomía tan estrecha y con forma de campana del voltamperograma. Los procesos controlados por adsorción presentan ondas en las que la disminución de la intensidad de

corriente alcanza rápidamente, después del máximo, un valor de corriente próximo al de la corriente residual, dando curvas en forma de campana, o lo que es lo mismo, simétricas en torno a  $I_p$ , esto refleja que la especie, que ya ha sido reducida, no difunde a la interfase y está envenenando al electrodo, disminuyendo considerablemente su conductividad.

### ***4.2. Estudios preliminares. Selección de la técnica instrumental.***

Se procedió primeramente al estudio del comportamiento electroquímico de imatinib sobre el electrodo estacionario de mercurio (HMDE) utilizando como técnica electroquímica la voltamperometría de redisolución por diferencial de pulso (DPS).

Para realizar este estudio se preparó una disolución de imatinib de  $4.0 \times 10^{-7}$  M en  $\text{HClO}_4$  0.010 M registrándose su voltamperograma entre -0.35 y -1.25 V a una velocidad de barrido de 10 mV/s y aplicando un pulso de reducción de 40 mV, después de desairear la muestra pasando  $\text{N}_2$  de alta pureza durante 10 minutos. Se realizó un segundo voltamperograma pero en este caso utilizando 10 s de acumulación, para comprobar la naturaleza acumulativa del proceso de reducción de dicho compuesto, evaluar las posibilidades de la técnica de redisolución y alcanzar, por lo tanto, mejores límites de determinación.

Los voltamperogramas obtenidos se muestran en la figura 4.4, donde se puede observar que en estas condiciones aparece un único pico de reducción a un potencial de  $-0.520$  V. En la tabla 4.3, se puede apreciar como esas intensidades de pico aumentan con el tiempo de acumulación.

Con el fin de comparar esta técnica con la voltamperometría de redisolución por onda cuadrada (SWS), se preparó una muestra en las mismas condiciones que la anterior, registrándose su voltamperograma entre  $-0.35$  y  $-1.25$  V a una velocidad de barrido de  $1200$  mV/s (frecuencia  $120$  Hz y un incremento de scan  $10$  mV). Al igual que el caso anterior también se realizó un segundo voltamperograma utilizando  $10$  s de acumulación. Los voltamperogramas se muestran en la figura 4.4, en la cual, se puede observar que el pico de reducción se encuentra desplazado a un potencial de  $-0.700$  V, desplazamiento originado por la alta velocidad de barrido utilizada en la técnica de onda cuadrada y a la irreversibilidad del proceso de reducción del imitanib. Además, podemos observar en la tabla 4.3 como la intensidad de pico aumenta algo más de tres veces con un tiempo de acumulación mínimo de  $10$  segundos, lo que originaría una alta sensibilidad analítica en las muestras biológicas que se pretenden analizar, objeto último de este capítulo.

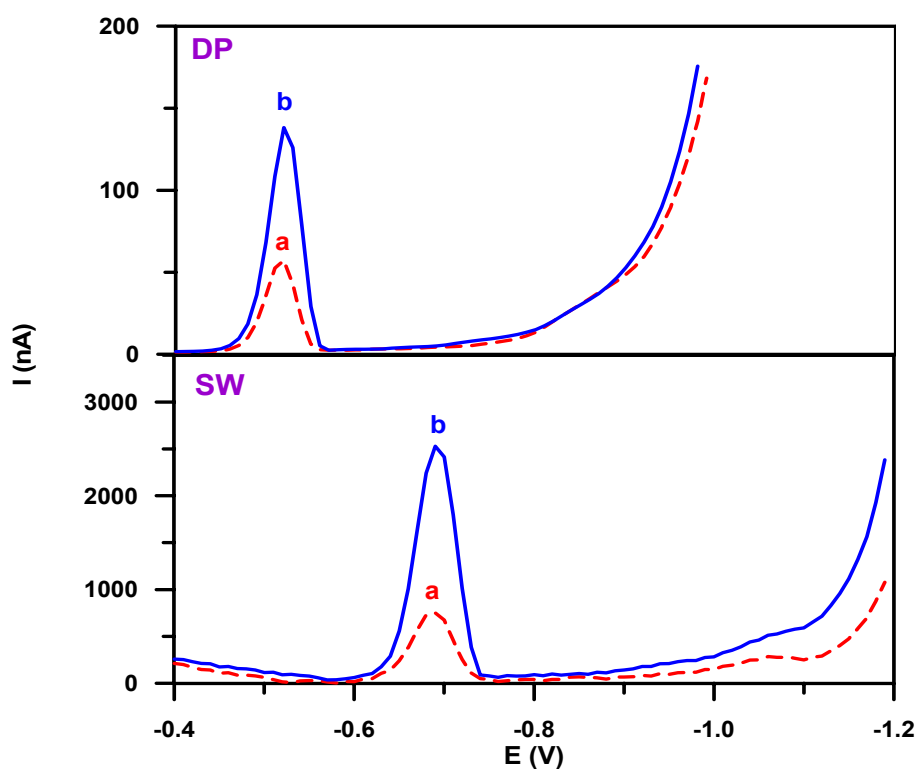
Por tanto, este estudio pone de manifiesto el comportamiento electroquímico de imatinib sobre el HMDE además de la naturaleza acumulativa del proceso de reducción de este compuesto.

Además, también se comprobó que, de entre las técnicas acumulativas ensayadas, DPS y SWS, fue esta última la considerada como más adecuada para proponer la determinación del compuesto, ya que era la que proporcionaba mayor sensibilidad al aplicar tiempos de acumulación

semejantes, hecho que nos ofrecía la posibilidad de cuantificar pequeñas cantidades de imatinib. Otra de las características a tener en cuenta es su alta velocidad de barrido, la cual, nos permite en este caso conseguir un voltamperograma en 0.66 segundos.

*Tabla 4.3. Técnicas electroquímicas. Variación de la intensidad*

TÉCNICA	I <sub>p</sub> (nA)	
	t <sub>ac</sub> 0 s	t <sub>ac</sub> 10 s
DPS	52	134
SWS	720	2466



**Figura 4.4.** Voltamperogramas de reducción por DP y SW a diferentes tiempos de acumulación. (a) 0s; (b) 10s.

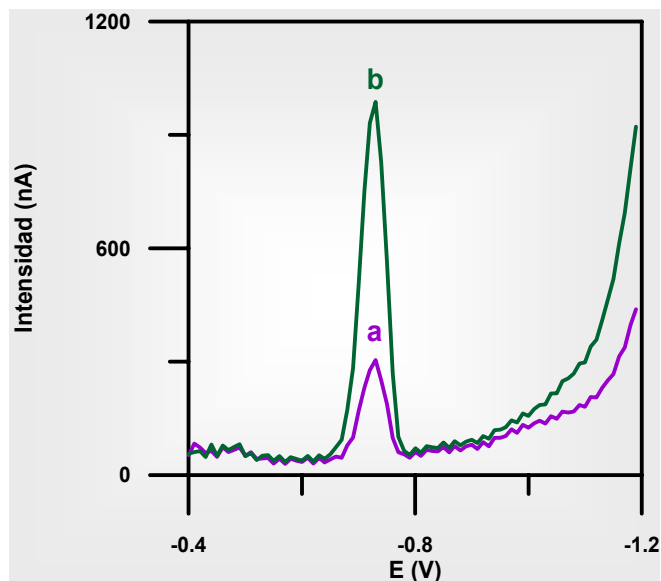
### ***4.3. Optimización del proceso redox mediante voltamperometría de redisolución adsortiva por onda cuadrada.***

Este método se llevó a cabo, como ya se ha dicho con anterioridad, con el fin de proponer métodos más sensibles para la determinación cuantitativa de imatinib. Por este motivo, una vez seleccionada la técnica de voltamperometría de redisolución por onda cuadrada, se procedió a desarrollar inicialmente un estudio sobre la influencia del pH y posteriormente la optimización de los parámetros instrumentales propios de la técnica a aplicar (tiempo de acumulación, potencial de acumulación, frecuencia, etc).

#### ***4.3.1. Influencia del pH***

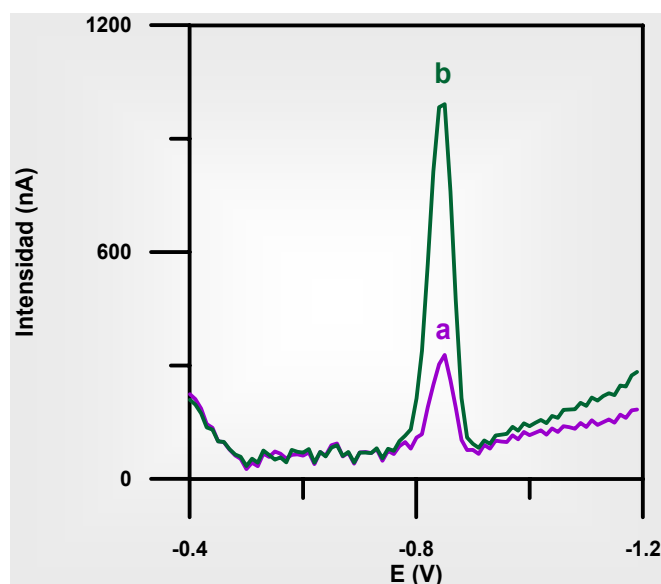
Para llevar a cabo este estudio se realizaron las siguientes pruebas:

- Se preparó una muestra de  $2.0 \times 10^{-7}$  M de imatinib en 10 mL de  $\text{HClO}_4$  0.010 M (pH 2.0), en las condiciones inertes mencionadas anteriormente, registrándose sus voltamperogramas entre  $-0.40$  y  $-1.25$  V con dos tiempos de acumulación diferentes 0 y 10 s (figura 4.5). En estas condiciones se observó un único pico de reducción a  $-0.730$  V, el cual, manifestaba una intensidad de reducción más elevada al aplicar la etapa acumulativa.



**Figura 4.5.** Voltamperogramas de Imatinib en medio fuertemente ácido (pH 2.0). Tiempos de acumulación: (a) 0 s y (b) 10 s.

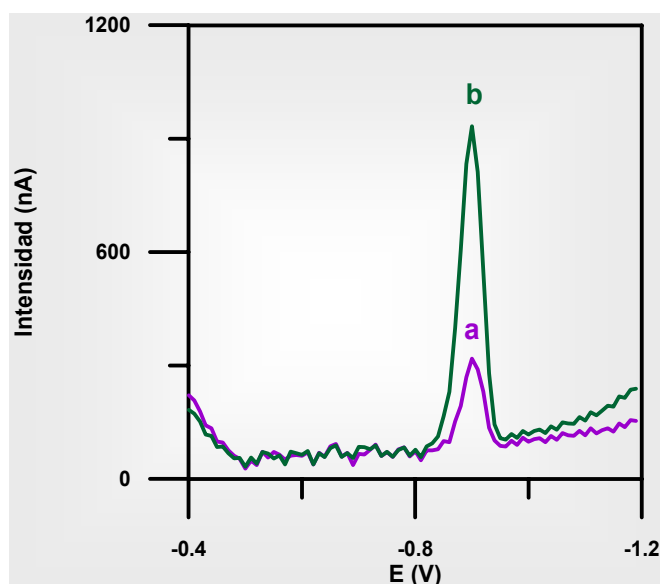
- En otra nueva experiencia se preparó una muestra de  $2.0 \times 10^{-7}$  M de imatinib en HAc/NaAc (pH 3.5), ajustando su fuerza iónica a 0.010 M. Los voltamperogramas se registraron entre  $-0.40$  y  $-1.25$  V a dos tiempos de acumulación diferentes, 0 y 10 segundos (figura 4.6). El pico de reducción para este compuesto a este valor de pH se encontraba a  $-0.850$  V y de nuevo su intensidad crecía al producirse la etapa de acumulación.



**Figura 4.6.** Voltamperogramas de Imatinib en medio ácido (pH 3.5). Tiempos de acumulación: (a) 0 s y (b) 10 s.

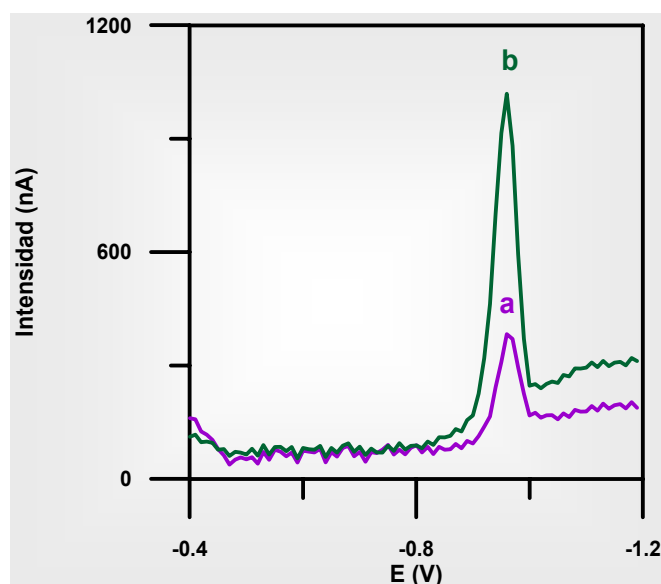
- En una tercera experiencia se registró entre  $-0.40$  y  $-1.25$  V una muestra de  $2.0 \times 10^{-7}$  M de imatinib en un medio tamponado de HAC/NaAc (pH 4.5), ajustando de nuevo su fuerza iónica a un valor de 0.010 M, para dos tiempos de acumulación, 0 y 10 s. En la figura 4.7 se observa un pico de reducción a  $-0.900$  V.





**Figura 4.7.** Voltamperogramas de Imatinib en medio débilmente ácido (pH 4.5). Tiempos de acumulación: (a) 0 s y (b) 10 s.

- Finalmente, en una cuarta experiencia se procedió a registrar los voltamperogramas de una muestra que contenía  $2.0 \times 10^{-7}$  M de imatinib en un medio tamponado de HAc/NaAc (pH 5.5), ajustando su fuerza iónica a 0.010 M, entre  $-0.40$  y  $-1.25$  V, para dos tiempos de acumulación, 0 y 10 s. En la figura 4.8 se puede observar que el pico de reducción del compuesto está desplazado a  $-0.960$  V.



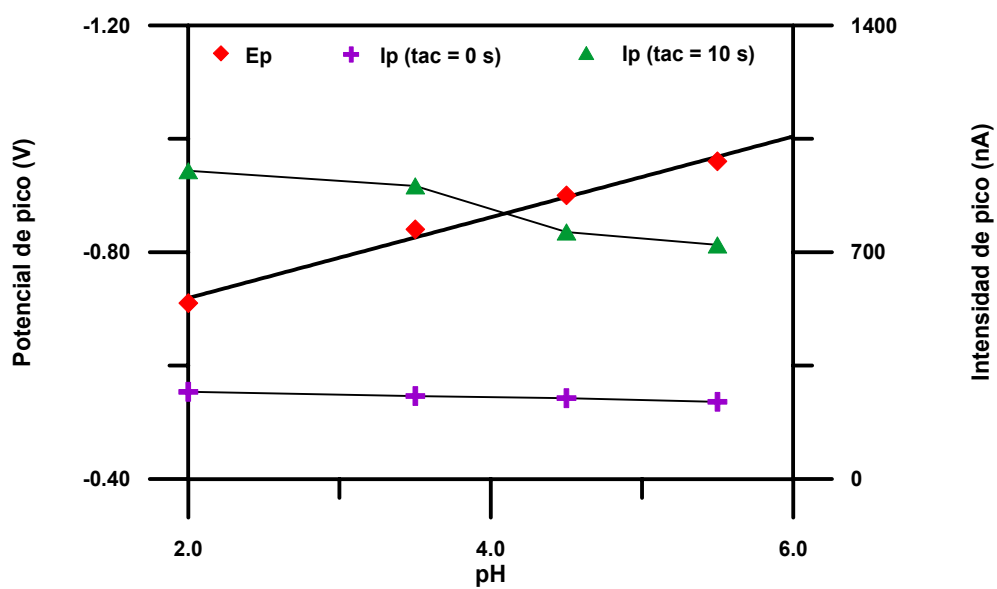
**Figura 4.8.** Voltamperogramas de Imatinib en medio débilmente ácido (pH 5.5). Tiempos de acumulación: (a) 0 s y (b) 10 s.

En la tabla 4.4 se muestran los valores de  $I_p$  para los distintos valores de pH, en la cual se puede observar que se obtiene una mayor intensidad de pico para un valor de pH de 2.0. Además, como se puede apreciar en la figura 4.9, el potencial de pico ( $E_p$ ) se desplaza con el pH hacia valores más negativos, lo que indica la participación de los protones en el proceso de reducción. Por otro lado, teniendo en cuenta la pendiente de este gráfico (71 mV por unidad de pH) y la irreversibilidad del proceso (mostrado en los estudios previos por

voltamperometría cíclica), podemos proponer la intervención de 2 protones y de 2 electrones en el proceso de reducción. Por tanto, se eligió como pH de trabajo para el estudio de imatinib un medio fuertemente ácido, es decir, pH 2.0 dotado con HClO<sub>4</sub>.

**Tabla 4.4.** Variación de la  $I_p$  con el pH

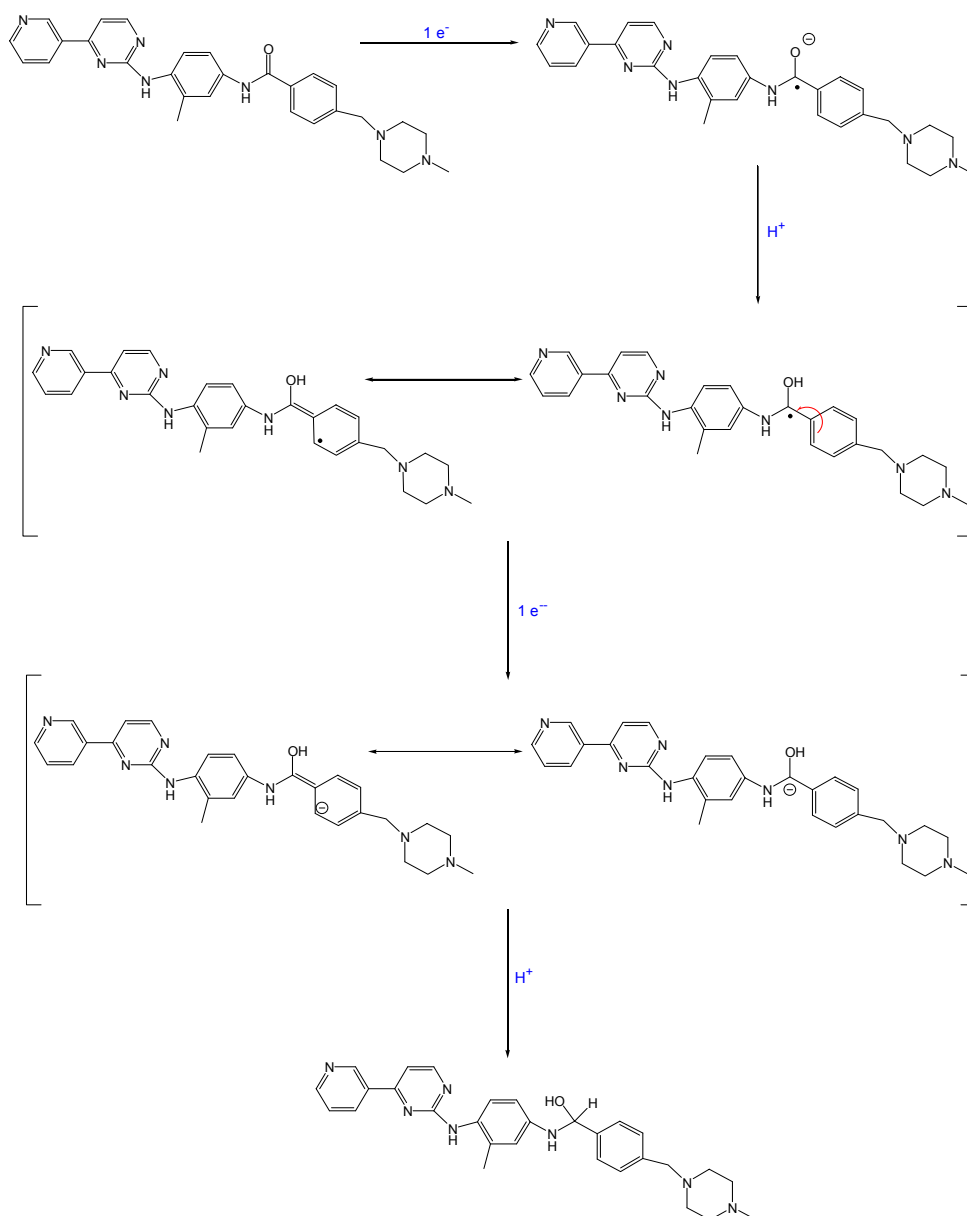
pH	$E_p$ (V)	$I_p$ (nA)	
		$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 10 s
<b>2.0</b>	-0.710	269	951
<b>3.5</b>	-0.850	256	904
<b>4.5</b>	-0.900	249	752
<b>5.5</b>	-0.960	238	722



*Figura 4.9. Influencia del pH con el potencial y la intensidad de pico.*

Como consecuencia de este estudio podemos proponer el siguiente mecanismo de reducción para imatinib:

**Determinación de Imatinib y su metabolito**



**Figura 4.10.** Mecanismo de reducción de Imatinib.

### 4.3.2. Influencia de la fuerza iónica.

Debido a que la fuerza iónica de la disolución puede condicionar la respuesta del proceso de reducción, ya que modifica el entorno iónico de la misma, en este apartado estudiaremos la influencia de este parámetro sobre una muestra que contenía una concentración de  $3.2 \times 10^{-7}$  M de imatinib en medio HClO<sub>4</sub>, 10 mM. En estas condiciones se prepararon diferentes disoluciones del pH seleccionado variando en ellas la concentración de NaClO<sub>4</sub> entre 0 y 87.1 mM, registrándose sus voltamperogramas entre -0.40 y -1.25 V. En la tabla 4.5 se resumen los valores de I<sub>P</sub> y E<sub>P</sub> obtenidos en cada voltamperograma al llevar a cabo el estudio de la influencia de la fuerza iónica.

**Tabla 4.5.** Variación de I<sub>P</sub> y E<sub>P</sub> para Imatinib con la concentración NaClO<sub>4</sub>

NaClO <sub>4</sub> (mM)	Concentración total (mM)*	E <sub>P</sub> (V)	I <sub>P</sub> (nA)
0.0	10.0	- 0.710	426
10.0	20.0	- 0.710	374
29.6	39.6	- 0.710	363
49.0	59.0	- 0.710	350
68.2	78.2	- 0.710	325
87.1	97.1	- 0.710	321

(\*) Suma de la concentración total de HClO<sub>4</sub> y NaClO<sub>4</sub>

Como se puede observar en la tabla 4.5 la intensidad de pico disminuye al aumentar la concentración de  $\text{NaClO}_4$  porque el proceso de adsorción del compuesto y su desplazamiento al electrodo se hace menos efectivo a medida que aumenta la fuerza iónica como ocurre en muchos procesos acumulativos (171). Por tanto, no aumentaremos la fuerza iónica del medio y solo la presencia del ácido perclórico con una fuerza iónica de 10 mM será utilizada a lo largo de todo el estudio.

#### ***4.3.3. Optimización de los parámetros instrumentales***

Una vez establecidas las condiciones químicas para llevar a cabo el estudio electroquímico de este compuesto se procedió a estudiar la influencia de los parámetros instrumentales propios de la técnica empleada sobre los voltamperogramas de imatinib. La concentración de imatinib elegida para llevar a cabo estas optimizaciones ha sido de  $3.2 \times 10^{-7}$  M excepto en el apartado de influencia del tiempo de acumulación que ha sido de  $8.0 \times 10^{-8}$  M para así conseguir unas buenas condiciones de acumulación y evitar en lo posible la saturación del electrodo por dicho compuesto a altos tiempos de acumulación.

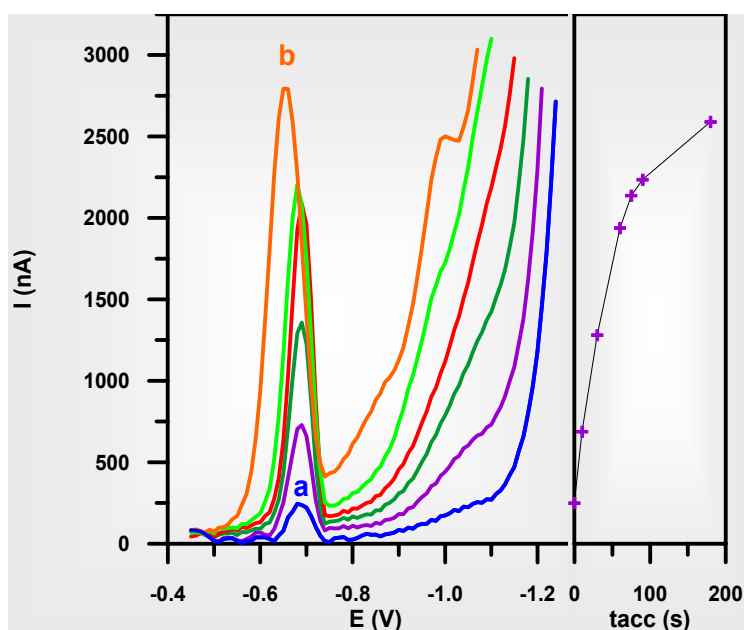
**a. Influencia del tiempo de acumulación.**

Se preparó una disolución de concentración  $8.0 \times 10^{-8}$  M de imatinib,  $0.010$  M  $\text{HClO}_4$  (pH 2.0), desaireándose la muestra en las condiciones inertes mencionadas y registrándose los voltamperogramas entre  $-0.40$  y  $-1.25$  V, utilizando para ello las siguientes condiciones: potencial de acumulación ( $E_{ac}$ )  $-0.40$  V, incremento de scan ( $\Delta s$ )  $10$  mV, frecuencia  $120$  Hz (velocidad de barrido  $1200$  mV/s), área del electrodo grande ( $0.025$  cm<sup>2</sup>) y tiempos de acumulación ( $t_{ac}$ ) comprendidos entre  $0$  y  $180$  segundos.

En la figura 4.11 podemos observar la representación gráfica de la  $I_p$  frente al tiempo de acumulación, así como los voltamperogramas a diferentes  $t_{ac}$ . En esta figura podemos apreciar la existencia de una zona de aumento lineal de la  $I_p$  con el tiempo de acumulación entre  $0$  y  $90$  s, observándose a partir de ese valor una pérdida progresiva de la linealidad de la señal debido por un lado, a la saturación del electrodo por las moléculas de nuestro analito y por otro, a la formación de una doble capa de moléculas, lo que ocasionaría una disminución de la respuesta. (172-175).

Se eligió como óptimo un tiempo de acumulación de  $10$  segundos, fijándose este valor para llevar a cabo el resto de las experiencias, con objeto de proponer un método de suficiente rapidez de información y teniendo en cuenta la elevada posología de este compuesto ( $100$ - $600$  mg/día). Si la sensibilidad del análisis lo requiere, sería viable la utilización de tiempos de acumulación superiores de hasta  $70$ - $80$  segundos.





**Figura 4.11.** Influencia del tiempo de acumulación para el proceso de reducción de Imatinib. (a) 0 s; (b) 180 s.

### ***b. Influencia del potencial de acumulación***

El potencial de acumulación ( $E_{ac}$ ) es un potencial de valor constante aplicado durante toda la etapa de acumulación y reposo. Además es el potencial al cual se inicia el voltamperograma, por lo que la intensidad de pico ( $I_p$ ) va a depender de este parámetro, ya que en algunos procesos acumulativos se necesita de un determinado valor de potencial para que el proceso de

acumulación sea viable, con lo cual, cuanto más próximo esté el valor del  $E_{ac}$  al potencial de pico menor será la  $I_p$ .

Para realizar este estudio se preparó una muestra de concentración  $3.2 \times 10^{-7}$  M de imatinib, 0.010 M  $HClO_4$  (pH 2.0), en las condiciones inertes mencionadas y se registraron los voltamperogramas variando el potencial de acumulación entre  $-0.35$  y  $-0.55$  V, utilizando las mismas condiciones instrumentales expuestas en el apartado anterior y con un  $t_{ac}$  de 10 s.

El análisis de los voltamperogramas obtenidos nos llevó a elaborar la tabla 4.6 donde se aprecia la variación de  $I_p$  y  $E_p$  con el potencial de acumulación ( $E_{ac}$ ) para el proceso de reducción de imatinib.

**Tabla 4.6.** Variación de  $I_p$  y  $E_p$  con el  $E_{ac}$

$E_{ac}$ (V)	$E_p$ (V)	$I_p$ (nA)	
		$t_{ac}$ 0s	$t_{ac}$ 10s
- 0.35	-0.710	397	1486
- 0.40	-0.710	402	1517
- 0.45	-0.710	410	1546
- 0.50	-0.710	392	1346
- 0.55	-0.710	369	1250

Como se puede apreciar la variación del  $E_{ac}$  no produce modificaciones sobre el  $E_p$  pero sí en la  $I_p$ , la cual aumenta ligeramente al variar el potencial desde  $-0.35$  a  $-0.45$  V, volviendo a disminuir posteriormente. Se tomó como valor óptimo un potencial de acumulación de  $-0.45$  V para las experiencias posteriores.

### ***c. Influencia de la frecuencia***

La intensidad de pico aumenta a medida que aumenta la velocidad de barrido ( $v_b$ ) y ésta, en voltamperometría de onda cuadrada, viene definida por el producto de la frecuencia y el incremento de scan.

Sobre una muestra de las características ya mencionadas, se registraron los voltamperogramas entre  $-0.40$  y  $-1.25$  V en las condiciones instrumentales expuestas en los apartados anteriores y variando la frecuencia entre 10 y 120 Hz.

En la tabla 4.7 se resumen los valores de intensidad de pico y del potencial de pico al variar la frecuencia.

*Tabla 4.7. Variación de  $I_P$  y  $E_P$  con la frecuencia para Imatinib*

Frecuencia (Hz)	$V_b$ (mV/s)	$E_P$ (V)	$I_P$ (nA)	
			$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 10 s
10	100	-0.710	32	98
30	300	-0.710	82	254
60	600	-0.710	175	603
90	900	-0.690	268	917
120	1200	-0.690	384	1349

Las ecuaciones siguientes muestran la relación lineal que existe entre la intensidad de pico y la frecuencia:

$t_{ac} = 0$  s

$$I_P = (-9.59 \pm 30.48) + (3.19 \pm 0.39) f \quad r^2 = 0.9955 \quad (n= 5)$$

$t_{ac} = 10$  s

$$I_P = (-59.89 \pm 129.14) + (11.36 \pm 1.75) f \quad r^2 = 0.9930 \quad (n= 5)$$

Como se puede apreciar en la tabla 4.7 la  $I_P$  aumenta de forma proporcional con la frecuencia, por tanto, se seleccionó como óptimo, un valor

de frecuencia de 120 Hz ya que producía la máxima sensibilidad y además nos proporcionaba la máxima velocidad de barrido.

#### ***d. Influencia del incremento de scan***

La importancia del estudio de este parámetro se debe a que influye también sobre la velocidad de barrido ( $v_b$ ) y a su vez nos condiciona al número de puntos con los que se define el pico de reducción, lo cual, está directamente relacionado con la altura de pico.

Se preparó una muestra de las características mencionadas anteriormente y se registraron los voltamperogramas entre  $-0.40$  y  $-1.25$  V en las condiciones instrumentales expuestas anteriormente y variando los valores de incremento de scan ( $\Delta s$ ) entre 2 y 10 mV.

En la tabla 4.8 se muestran los valores de intensidad de pico y del potencial de pico del proceso de reducción al variar el valor de  $\Delta s$ . Como se puede observar, hay un aumento de la  $I_p$  al aumentar el valor de  $\Delta s$ . Se seleccionó como óptimo un valor de 10 mV porque nos permitía conseguir una gran sensibilidad y una elevada velocidad de barrido.

**Tabla 4.8.** Variación de  $I_p$  y  $E_p$  con el  $\Delta s$  para Imatinib

$\Delta s$ (mV)	$V_b$ (mV/s)	$E_p$ (V)	$I_p$ (nA)	
			$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 10 s
2	240	-0.710	126	518
4	480	-0.710	204	869
6	720	-0.710	266	1088
8	960	-0.710	337	1310
10	1200	-0.710	368	1385

**e. Influencia de la magnitud del pulso aplicado**

La intensidad de pico y su resolución están relacionados con el pulso aplicado, las cuales suelen disminuir al aumentar el pulso. Para examinar dicha influencia se preparó una muestra de las características mencionadas anteriormente y en las condiciones inertes ya conocidas. Los voltamperogramas de esta experiencia fueron obtenidos por registros sucesivos en las condiciones instrumentales ya especificadas anteriormente y con valores de pulso aplicado ( $\Delta E$ ) comprendidos entre 10 y 60 mV.

El análisis de los voltamperogramas obtenidos nos condujo a elaborar la tabla 4.9 donde aparecen los valores de  $I_p$  y de  $E_p$  para esta experiencia con

respecto al parámetro en estudio. Podemos observar como a medida que aumenta la magnitud del pulso aplicado se produce un aumento de la señal además de un ligero desplazamiento del potencial de reducción. Se seleccionó como valor óptimo 40 mV, el cual nos permitía obtener una sensibilidad adecuada además de una definición aceptable del pico de reducción.

**Tabla 4.9.** Variación de  $I_p$  y  $E_p$  con el  $\Delta E$  para Imatinib

$\Delta E$ (mV)	$E_p$ (V)	$I_p$ (nA)	
		$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 10 s
10	-0.710	216	1010
20	-0.710	333	1349
40	-0.710	370	1543
60	-0.690	383	1555

**f. Influencia del área del electrodo de trabajo.**

Existe una proporcionalidad entre la intensidad de pico y el área del electrodo de trabajo, la cual aumenta al aumentar dicha área.

Nuevamente se preparó una muestra que contenía una concentración de  $3.2 \times 10^{-7}$  M de imatinib, 0.010 M HClO<sub>4</sub> (pH 2.0) y en las condiciones inertes usualmente utilizadas. Dicha muestra fue registrada en las condiciones instrumentales anteriormente mencionadas y variando el tamaño del área del electrodo.

De los voltamperogramas conseguidos en esta experiencia se obtuvieron los datos de  $E_p$  y de  $I_p$  correspondientes a los diferentes tamaños del área del electrodo, los cuales son mostrados en la tabla 4.10.

Como conclusión de esta experiencia se eligió llevar a cabo este estudio utilizando un tamaño de área de electrodo grande ya que proporcionaba una mayor señal.

**Tabla 4.10.** Variación de  $I_p$  y  $E_p$  con el tamaño del área del electrodo

Área del electrodo (cm <sup>2</sup> )	$E_p$ (V)	$I_p$ (nA)	
		$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 10 s
<b>Pequeño (0.010)</b>	-0.710	86	246
<b>Mediano (0.016)</b>	-0.710	181	616
<b>Grande (0.025)</b>	-0.710	370	1510



***g. Condiciones químicas e instrumentales finales***

Realizado, sistemáticamente, el estudio sobre la influencia de los diferentes parámetros de interés analítico, se pudieron establecer aquellas condiciones consideradas como óptimas. La tabla 4.11 reúne las variables experimentales que se seleccionaron para abordar, tanto los calibrados y los estudios de repetibilidad y reproducibilidad, como las determinaciones de Imatinib y su principal metabolito en orina.

**Tabla 4.11. Condiciones finales**

<b>pH del medio</b>	2.0
<b>Fuerza iónica</b>	0.010 M, HClO <sub>4</sub>
<b>t<sub>ac</sub></b>	0 y 10 s
<b>E<sub>ac</sub></b>	-0.45 V
<b>Δs</b>	10 mV
<b>ΔE</b>	40 mV
<b>Frecuencia</b>	120 Hz
<b>Área del electrodo</b>	Grande (0.025 cm <sup>2</sup> )

#### ***4.3.4. Calibrado y estudio estadístico***

En este apartado se procedió al establecimiento de las rectas de calibrado en las condiciones químicas e instrumentales propuestas, con el fin de verificar la existencia de linealidad entre la concentración y la señal electroquímica de imatinib en dichas condiciones. Con este objetivo se preparó 10 mL de una disolución 0.010 M de  $\text{HClO}_4$  (pH 2.0), sobre la cual directamente en la celda voltamperométrica se fue adicionando el compuesto variando así su concentración, registrándose los voltamperogramas en las condiciones seleccionadas.

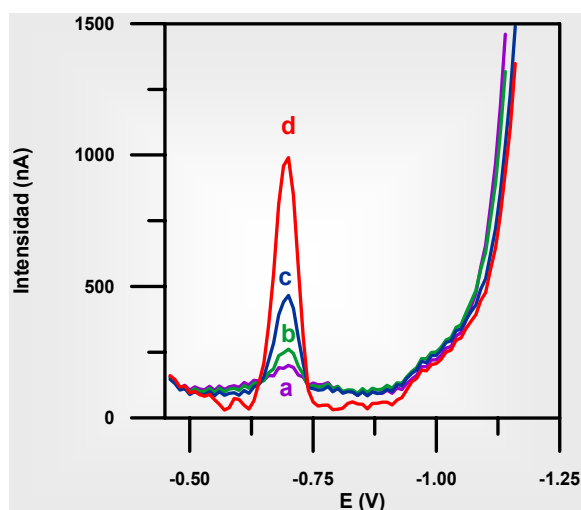
En las figuras 4.12 y 4.13 se reflejan los voltamperogramas correspondientes a algunas de las concentraciones utilizadas en el calibrado de imatinib para tiempos de acumulación de 0 y 10 s, respectivamente. En estas figuras podemos observar como aumenta la señal de medida con la concentración de dicho compuesto permaneciendo constante el potencial del pico de reducción observado. En la tabla 4.12 quedan reflejadas las ecuaciones de las rectas de calibrado ( $\alpha = 0.05$ ), así como los intervalos de linealidad.

**Tabla 4.12. Rectas de calibrado de Imatinib**

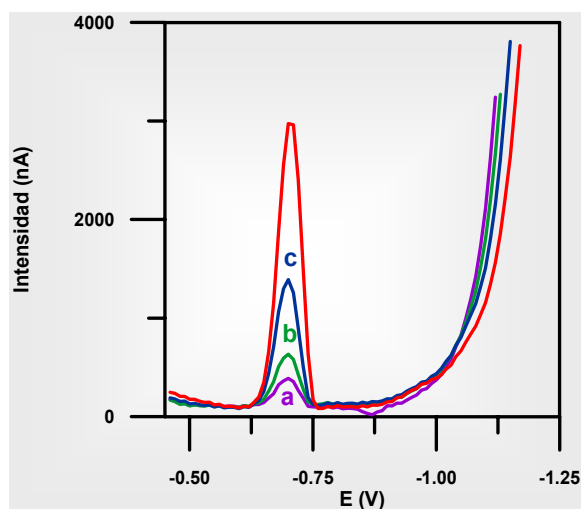
<b>t<sub>ac</sub> (s)</b>	<b>Ecuación</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Rango lineal</b>
<b>0</b>	<b>[1]</b> I <sub>p</sub> = (45.55±33.83) + (1.85×10 <sup>9</sup> ±7.67×10 <sup>7</sup> ) C	0.996	2.0×10 <sup>-8</sup> -1.0×10 <sup>-6</sup> M
<b>10</b>	<b>[2]</b> I <sub>p</sub> = (69.83±34.56) + (6.28×10 <sup>9</sup> ±1.50×10 <sup>8</sup> ) C	0.999	1.0×10 <sup>-8</sup> -4.8×10 <sup>-7</sup> M

Donde I<sub>p</sub> es la intensidad de pico (nA) y C es la concentración de imatinib expresada en términos de Molaridad.

La precisión dentro de un mismo día se evaluó sobre una disolución de 2.0×10<sup>-7</sup> M de imatinib en HClO<sub>4</sub> 0.010 M (pH 2.0) en las condiciones inertes mencionadas, registrándose a continuación nueve voltamperogramas sucesivos entre -0.45 y -1.25 V en las condiciones optimizadas. La tabla 4.13 muestra los valores medios así como las desviaciones estándar relativa dentro de un mismo día. Como se puede observar se obtienen valores de DER aceptables para ambos métodos.



**Figura 4.12.** Voltamperogramas de Imatinib de concentraciones (a)  $4.0 \times 10^{-8}$  M; (b)  $8.0 \times 10^{-8}$  M; (c)  $2.0 \times 10^{-7}$  M; (d)  $4.8 \times 10^{-7}$  M, para tiempo de acumulación 0 s.



**Figura 4.13.** Voltamperogramas de Imatinib de concentraciones (a)  $4.0 \times 10^{-8}$  M; (b)  $8.0 \times 10^{-8}$  M; (c)  $2.0 \times 10^{-7}$  M; (d)  $4.8 \times 10^{-7}$  M, para tiempo de acumulación 10 s.

**Tabla 4.13.** Valores medios, DE y DER

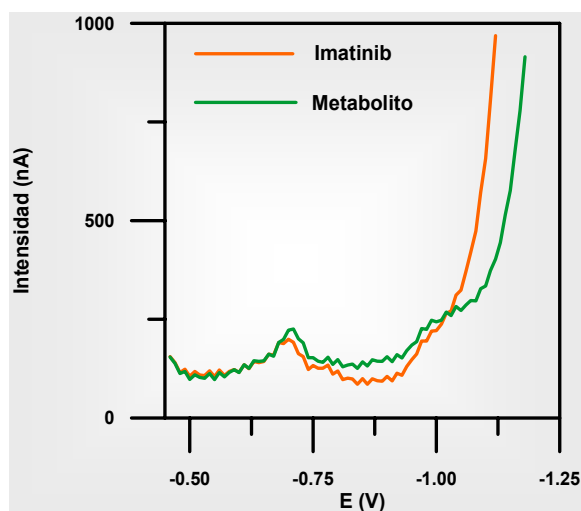
<b>t<sub>ac</sub> (s)</b>	<b>I<sub>p</sub> media (nA)</b>	<b>DE</b>	<b>DER</b>
<b>0</b>	359.7	2.58	0.72
<b>10</b>	1196.2	16.63	1.39

**4.3.5. Determinación de Imatinib y su principal metabolito en orina.**

El principal metabolito de Imatinib difiere sólo estructuralmente en la pérdida del metilo en el anillo de piperazina con respecto al compuesto del que procede. Debido a esto pudimos comprobar que estos dos compuestos presentaban el mismo proceso de reducción en las condiciones químicas e instrumentales seleccionadas anteriormente, como se puede apreciar en las figuras 4.14 y 4.15.

Posteriormente, para confirmar este hecho, se procedió al establecimiento de las rectas de calibrado del metabolito en medio acuoso (rectas [3] y [4] para tiempos de acumulación 0 y 10 s, respectivamente, tabla 4.14), en las condiciones químicas e instrumentales seleccionadas anteriormente

para imatinib, con el fin de comparar las rectas de calibrado de ambos compuestos a tiempos de acumulación 0 s (rectas [1] y [3]) y 10 s (rectas [2] y [4]). (Ver tablas 4.12 y 4.14).



**Figura 4.14.** Voltamperogramas de Imatinib y su metabolito de concentraciones  $4.0 \times 10^{-8}$  y  $3.8 \times 10^{-8}$  M, respectivamente, para tiempo de acumulación 0 s.

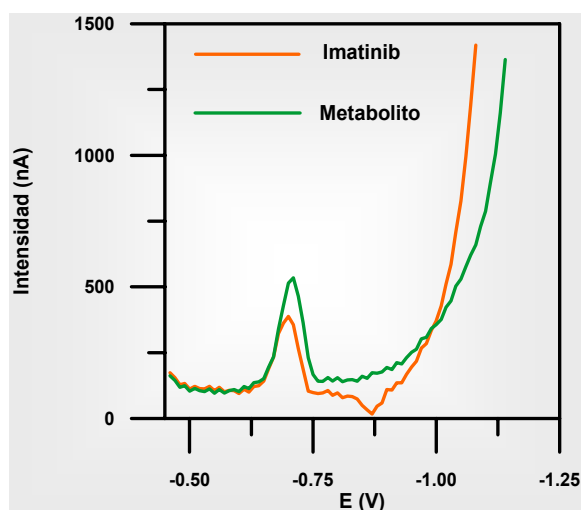


Figura 4.15. Voltamperogramas de Imatinib y su metabolito de concentraciones  $4.0 \times 10^{-8}$  y  $3.8 \times 10^{-8}$  M, respectivamente, para tiempo de acumulación 10 s.

Tabla 4.14. Rectas de calibrado de metabolito

$t_{ac}$ (s)	Ecuación	$R^2$	Rango lineal
0	[3] $I_p = (83.31 \pm 50.10) + (1.85 \times 10^9 \pm 7.63 \times 10^7) C$	0.996	$1.9 \times 10^{-8} - 1.0 \times 10^{-6} M$
10	[4] $I_p = (82.08 \pm 82.64) + (6.66 \times 10^9 \pm 3.72 \times 10^8) C$	0.995	$1.8 \times 10^{-8} - 4.6 \times 10^{-7} M$

Donde  $I_p$  es la intensidad de pico (nA) y C es la concentración de metabolito expresada en términos de Molaridad.

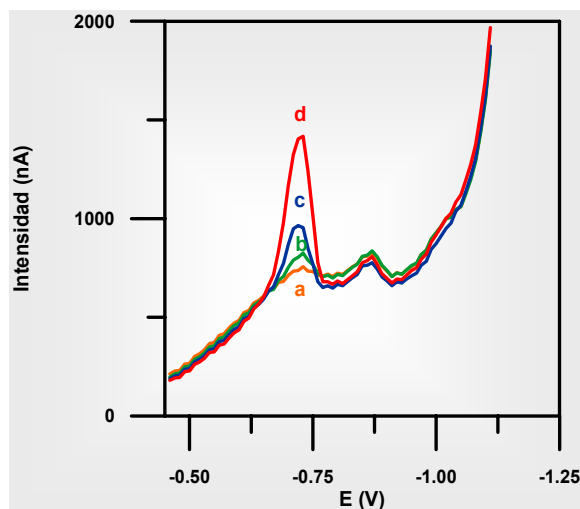
Para este estudio, se llevó a cabo el análisis de varianza (test ANOVA) para comparar las diferentes rectas de calibrado que se habían realizado ([1], [2], [3], y [4]). En la tabla 4.16 se muestran los valores de  $F$  y  $t$ . Se pudo comprobar que no existían diferencias significativas entre las rectas de calibrado de imatinib y su principal metabolito, para los dos tiempos de acumulación estudiados, ya que presentan las mismas propiedades electroquímicas. Con lo cual pudimos realizar el resto del trabajo utilizando imatinib como único reactivo y referir la concentración encontrada en las muestras de orina como la concentración total de imatinib y su principal metabolito.

Por tanto, nuestro objetivo ha sido proponer un método analítico sencillo y rápido que permita la determinación total de Imatinib y su principal metabolito en muestras de orina por esta técnica voltamperométrica.

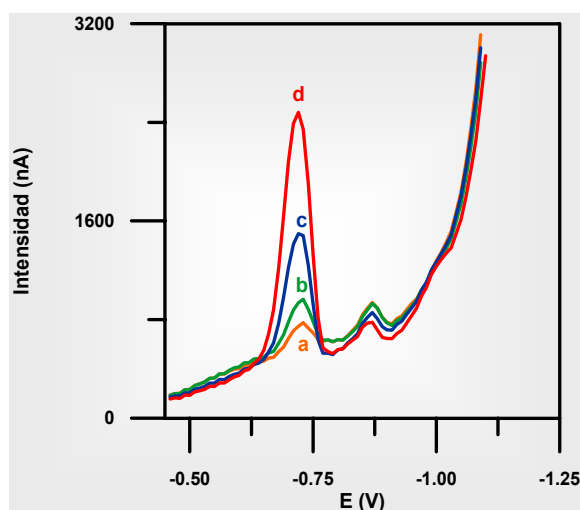
A continuación se realizaron diferentes calibrados en función de la cantidad de orina, procedencia de la orina (hombre o mujer) o si la orina había sufrido un proceso de congelación con el fin de compararlas utilizando para ello el test ANOVA. Esta experiencia se llevó a cabo de la siguiente manera: una cantidad de orina (25 o 50  $\mu\text{L}$ ), sin necesidad de ningún tratamiento previo, fue adicionada sobre 10 mL de disolución  $\text{HClO}_4$  0.010 M, los cuales fueron antes desaireados mediante la utilización de  $\text{N}_2$  de alta pureza durante diez minutos. A continuación, se fue adicionando el compuesto imatinib, directamente en la celda voltamperométrica, variando así su concentración y registrándose los voltamperogramas en las condiciones seleccionadas anteriormente. En cada uno de los casos, antes del voltamperograma la muestra fue previamente desaireada haciendo burbujear  $\text{N}_2$  de alta pureza durante unos minutos. En la tabla 4.15 se encuentran las diferentes rectas de calibrado así como los



intervalos de linealidad para los tiempos de acumulación 0 y 10 segundos. En las figuras 4.16 y 4.17 se muestran los voltamperogramas correspondientes a algunas de las concentraciones utilizadas en el calibrado Mujer A (25 $\mu$ L orina).



**Figura 4.16.** Voltamperogramas de Imatinib en orina de mujer A de concentraciones (a)  $4.0 \times 10^{-8}$  M; (b)  $8.0 \times 10^{-8}$  M; (c)  $2.0 \times 10^{-7}$  M; (d)  $4.8 \times 10^{-7}$  M, para tiempo de acumulación 0 s.



**Figura 4.17.** Voltamperogramas de Imatinib en orina de mujer A de concentraciones (a)  $4.0 \times 10^{-8}$  M; (b)  $8.0 \times 10^{-8}$  M; (c)  $2.0 \times 10^{-7}$  M; (d)  $4.8 \times 10^{-7}$  M, para tiempo de acumulación 10 s.

En la tabla 4.15 se muestran los valores de  $F$  y  $t$  una vez realizado el test ANOVA, en ella podemos apreciar que se encontraron diferencias significativas a la hora de comparar las rectas de calibrado preparadas con diferente cantidad de orina (25 ó 50  $\mu$ L, rectas ([5] y [7]) y ([6] y [8])) y si había sufrido un proceso de congelación (rectas ([5] y [11]) y ([6] y [12])). Este hecho podría deberse a los posibles cambios de fuerza iónica de las diferentes orinas utilizadas en el estudio. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre orina de distinto sexo (rectas ([5] y [9]) y ([6] y [10])).

**Tabla 4.15. Rectas de calibrado**

<b>t<sub>ac</sub> (s)</b>	<b>Ecuación</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Rango Lineal</b>
<b>Mujer A (25 µL orina)</b>			
<b>0</b>	<b>[5]</b> I <sub>p</sub> = (23.12±11.18) + (1.59×10 <sup>9</sup> ±2.53×10 <sup>7</sup> ) C	0.999	2.0×10 <sup>-8</sup> -1.0×10 <sup>-6</sup> M
<b>10</b>	<b>[6]</b> I <sub>p</sub> = (-101.41±80.18) + (4.10×10 <sup>9</sup> ±2.82×10 <sup>8</sup> ) C	0.992	2.0×10 <sup>-8</sup> -6.0×10 <sup>-7</sup> M
<b>Mujer A (50 µL orina)</b>			
<b>0</b>	<b>[7]</b> I <sub>p</sub> = (0.59±20.08) + (1.49×10 <sup>9</sup> ±7.40×10 <sup>7</sup> ) C	0.996	6.0×10 <sup>-8</sup> -6.0×10 <sup>-7</sup> M
<b>10</b>	<b>[8]</b> I <sub>p</sub> = (56.50±55.20) + (3.62×10 <sup>9</sup> ±1.94×10 <sup>8</sup> ) C	0.995	4.0×10 <sup>-8</sup> -6.0×10 <sup>-7</sup> M
<b>Hombre A (25 µL orina)</b>			
<b>0</b>	<b>[9]</b> I <sub>p</sub> = (26.51±12.38) + (1.60×10 <sup>9</sup> ±2.81×10 <sup>7</sup> ) C	0.999	2.0×10 <sup>-8</sup> -1.0×10 <sup>-6</sup> M
<b>10</b>	<b>[10]</b> I <sub>p</sub> = (125.19±77.96) + (4.05×10 <sup>9</sup> ±2.74×10 <sup>8</sup> ) C	0.992	2.0×10 <sup>-8</sup> -6.0×10 <sup>-7</sup> M
<b>Mujer A (25 µL orina descongelada)</b>			
<b>0</b>	<b>[11]</b> I <sub>p</sub> = (41.73±11.38) + (1.28×10 <sup>9</sup> ±2.58×10 <sup>7</sup> ) C	0.999	2.0×10 <sup>-8</sup> -1.0×10 <sup>-6</sup> M
<b>10</b>	<b>[12]</b> I <sub>p</sub> = (68.18±53.30) + (3.60×10 <sup>9</sup> ±1.87×10 <sup>8</sup> ) C	0.992	2.0×10 <sup>-8</sup> -6.0×10 <sup>-7</sup> M

Donde I<sub>p</sub> es la intensidad de pico (nA) y C es la concentración de imatinib expresada en términos de Molaridad, que como hemos indicado equivaldría también a la estimación de la concentración total de imatinib y su principal metabolito.

*Tabla 4.16. Análisis de varianza*

<b>Rectas de calibrado</b>	<b>F<sub>exp</sub></b>	<b>F<sub>teor</sub></b>	<b>t<sub>exp</sub></b>	<b>t<sub>teor</sub></b>
<b>[1] y [3]</b>	3.000	3.430	0.061	2.190
<b>[2] y [4]</b>	5.710	3.438	2.230	2.306
<b>[5] y [7]</b>	1.980	2.950	3.218	2.090
<b>[6] y [8]</b>	5.252	3.179	3.131	2.095
<b>[5] y [9]</b>	1.070	3.478	0.002	2.090
<b>[6] y [10]</b>	1.119	3.179	0.277	2.095
<b>[5] y [11]</b>	1.040	3.478	24.740	2.090
<b>[6] y [12]</b>	0.195	3.179	3.329	2.095

Como conclusión de este estudio realizado, podemos decir que la determinación de imatinib y su principal metabolito en orina no se podrá llevar a cabo por medida directa sino utilizando el método de las adiciones estándar porque depende de la cantidad de orina que utilizemos además de si se ha producido o no un proceso previo de congelación de la muestra.

Los métodos electroquímicos aseguran mediante la utilización del método de la adición estándar cualquier ligera modificación en la matriz biológica que pudiera condicionar tanto la velocidad de desplazamiento del analito al electrodo y de cómo sea su proceso de acumulación.

**a) Límites de detección y cuantificación**

Aunque la IUPAC propone las fórmulas citadas en el capítulo 3 para el cálculo de los límites de detección y cuantificación, se pueden establecer estos límites a partir de los datos obtenidos para la recta de calibrado. Así, los límites de detección se calculan partiendo de la fórmula:

$$LD = Y_B + 3 S_B$$

$y_B$ : señal de una muestra en blanco o "señal de fondo"

$S_B$ : desviación estándar del blanco

Ahora bien, se discute cómo se obtienen en la práctica los términos  $y_B$  y  $S_B$  cuando se utiliza una recta de regresión para la calibración. Una suposición básica del método de los mínimos cuadrados no ponderados es que cada punto en la representación gráfica tiene una variable estándar estimada por el estadístico  $s_{y/x}$ . Es, por tanto, adecuado utilizar  $s_{y/x}$  en lugar de  $S_B$  en la estimación del límite de detección. Es, por supuesto, posible realizar el experimento del blanco varias veces y obtener un valor independiente para  $S_B$ , sin embargo, la determinaciones múltiples del blanco consumen mucho tiempo, y el uso de  $s_{y/x}$  es muy adecuado en la práctica. El valor de  $a$ , la ordenada en el origen calculada, se puede utilizar como una estimación de  $y_B$ , la propia señal del blanco. Por tanto, la ecuación para el cálculo del límite de detección vendrá dada:

$$LD = Y_B + 3 S_{y/x}$$

donde,

$Y_B$ = ordenada en el origen de la recta de regresión calculada.

$$S_B = S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

$\hat{y}_i$  = puntos sobre la recta de regresión calculada correspondientes a los valores individuales de x, es decir, los valores de y ajustados a partir de la ecuación de regresión. El valor de  $\hat{y}_i$  para un valor de x dado se calcula rápidamente a partir de la ecuación de regresión.

$y_i$ = valores de y obtenidos experimentalmente, es decir, la señal analítica correspondiente a valor de x determinado.

De igual forma, el límite de determinación o cuantificación se calcula mediante la siguiente expresión:

$$LC = Y_B + 10S_B$$

Así, de esta manera los límites de detección y cuantificación calculados a partir de las rectas de calibrado preparadas a partir de 25  $\mu$ L de orina (rectas **[5]** y **[6]** para tiempos de acumulación 0 y 10 s, respectivamente), fueron los siguientes:

Tabla 4.17. Límites de detección y cuantificación

$t_{ac}$ (s)	LD (M)	LC (M)
0	$5.55 \times 10^{-9}$	$1.85 \times 10^{-8}$
10	$5.19 \times 10^{-9}$	$1.73 \times 10^{-8}$

### b) Precisión

Para llevar a cabo este estudio, se preparó una muestra de la siguiente manera: se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de orina dopada con una cantidad de imatinib para obtener una concentración final de  $8.0 \times 10^{-8}$  M, sin necesidad de ningún tratamiento previo, sobre 10 mL de una disolución en  $\text{HClO}_4$  0.010 M, pH 2.0. A continuación, se registraron sucesivamente nueve voltamperogramas en las condiciones seleccionadas como óptimas.

Para evaluar la reproducibilidad entre días consecutivos, se preparó otra muestra igual que la anteriormente citada y se volvieron a registrar nueve voltamperogramas consecutivos en las mismas condiciones seleccionadas.

Se compararon las varianzas de las series según el test estadístico F de Snedecor para pruebas de dos colas, que se aplica en este caso porque se trata de dilucidar si las variaciones entre las series de diferentes días son significativamente diferentes. Así, se encontró que no existían diferencias significativas entre las series para un intervalo de confianza del 95%.

Los resultados obtenidos, en términos de medias, desviación estándar (DE) y porcentaje de desviación estándar relativa (DER) se muestran en la tabla 4.18.

**Tabla 4.18.** Valores medios, DE y DER

	$t_{ac}$ 0 s		$t_{ac}$ 10 s	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
$I_p$ media (nA)	130	134	323	328
DE	3.00	2.67	9.10	4.42
DER	2.30	1.99	2.80	1.35
$F_{exp}$	1.26		4.23	
$F_{teor}$	4.43		4.43	

***b) Aplicaciones en muestras de laboratorio y muestras reales***

Debido a que las muestras reales disponibles en el laboratorio pertenecían a dos enfermos bajo tratamiento médico con imatinib con



diferentes posologías (100 y 600 mg/día), las cuales llevaban congeladas en el momento de este estudio siete meses, nuestro primer objetivo fue evaluar tras un proceso de congelación, la posible modificación de la señal voltamperométrica de imatinib sobre nuestro electrodo de trabajo. Por ello, en primer lugar se procedió a realizar la preparación de tres muestras problema con diferentes concentraciones de imatinib en orina y posteriormente se realizaron sus medidas voltamperométricas. Tras este análisis, las tres muestras de orina fueron congeladas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante diez días y, tras este periodo, se procedió a su descongelación, centrifugación y posterior análisis.

El procedimiento operatorio en todo momento fue el siguiente: sobre una disolución de 10 mL de  $\text{HClO}_4$  0.010 M (pH 2.0) se adicionó un volumen de 25  $\mu\text{L}$  de muestra problema (orina dopada), los cuales no necesitaron ningún tratamiento previo. En todos los casos se utilizó el método de las adiciones estándar para realizar la determinación de la concentración total de estos compuestos. Los voltamperogramas fueron registrados en las condiciones ya establecidas para la técnica propuesta.

En la tabla 4.19 se recogen los valores de recuperación para las muestras preparadas en el laboratorio. Como se puede observar se obtuvieron valores de recuperación muy semejantes tanto si el proceso era o no acumulativo. Además se pudo comprobar que el proceso de congelación no modificaba la señal del compuesto de interés.

*Tabla 4.19. Recuperaciones obtenidas en las muestras preparadas en el laboratorio*

MUESTRA	IMATINIB (*)	Recuperación (%)		Recuperación (%)	
		$t_{ac}$ 0 s		$t_{ac}$ 10 s	
		Orina	Orina Descongelada	Orina	Orina Descongelada
<b>M1</b>	$2.0 \times 10^{-5}$	110	108	103	94
<b>M2</b>	$2.80 \times 10^{-5}$	104	107	105	96
<b>M3</b>	$3.64 \times 10^{-5}$	108	103	96	100

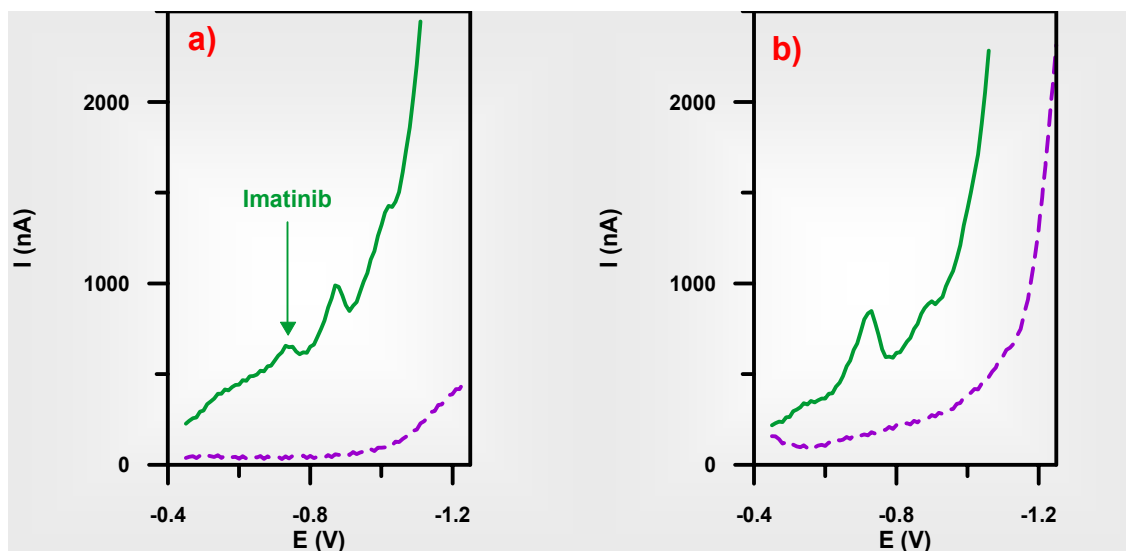
(\*) Concentración Molar de imatinib en orina, equivale a una concentración de imatinib en la celda voltamperométrica de  $5.0 \times 10^{-8}$ ,  $7.0 \times 10^{-8}$  y  $9.1 \times 10^{-8}$  M para M1, M2 y M3, respectivamente.

En segundo lugar, con el fin de comprobar la eficacia de este método, se llevó a cabo el análisis en muestras reales de dos enfermos bajo tratamiento terapéutico con este fármaco. En este caso estas muestras estaban congeladas a  $-18^{\circ}\text{C}$ , con lo cual hubo que descongelarlas y centrifugarlas para proceder a su análisis.

Una muestra de  $25 \mu\text{L}$  de orina de un paciente A (dosis de imatinib  $100 \text{ mg/día}$ ) fue adicionada sobre una disolución de  $10 \text{ mL}$  de  $\text{HClO}_4$   $0.010 \text{ M}$  ( $\text{pH } 2.0$ ) registrándose a continuación sus voltamperogramas. Se utilizó el método de las

adiciones estándar para la determinación de imatinib y su principal metabolito. En este caso la concentración total de Imatinib y su metabolito encontrada fue  $1.99 \times 10^{-5}$  y  $2.04 \times 10^{-5}$  M (factor de dilución 401, concentración en celda  $5.02 \times 10^{-8}$  M) para tiempos de acumulación 0 y 10 s, respectivamente. La figura 4.18 muestra los voltamperogramas correspondientes a la muestra de orina del paciente A.

Por otra parte, una muestra de 5  $\mu$ L de orina de un paciente B (dosis de Imatinib 600 mg/día) fue adicionada sobre una disolución de 10 mL de  $\text{HClO}_4$  0.010 M, la cual había sido previamente purgada, registrándose a continuación sus voltamperogramas. Se utilizó el método de las adiciones estándar para la determinación de Imatinib y su principal metabolito. Para esta muestra la concentración total de Imatinib y su metabolito encontrada fue de  $1.02 \times 10^{-4}$  y  $1.04 \times 10^{-4}$  M (factor de dilución 2000, concentración en celda  $2.40 \times 10^{-7}$  M) para tiempos de acumulación 0 y 10 s, respectivamente. Como podemos comprobar, este valor de concentración es cinco veces mayor que en el caso anterior puesto que el paciente A toma una dosis menor que el paciente B.



**Figura 4.18.** Voltamperogramas correspondientes a una muestra de orina de un paciente A (100 mg/día), factor de dilución 401, en las condiciones químicas e instrumentales optimizadas. (a) 0 s; (b) 10 s.

Los métodos electroquímicos y en particular la técnica de voltamperometría de redisolución adsorbtiva por onda cuadrada permite, sin ningún tratamiento de la muestra biológica, un análisis inmediato del contenido de imatinib y su principal metabolito en orina. Siendo necesario destacar:

- La mínima cantidad de muestra de orina necesaria.
- La rapidez del análisis, ya que el registro de cada voltamperograma necesita menos de un segundo para su realización. Solo serían considerables los tiempos de purga y de acumulación.

En la tabla 4.20 se muestran los resultados obtenidos al analizar estas muestras reales por los métodos propuestos: electroforéticos (Capítulo 3) y electroquímicos. Como se puede observar estos métodos propuestos son adecuados para la determinación de Imatinib y su principal metabolito en muestras de orina, dado que los resultados obtenidos son comparables cuando se aplican a las mismas muestras. Los valores de recuperación fueron calculados con respecto a la concentración encontrada utilizando el método de electroforesis capilar.

**Tabla 4.20.** Comparación de resultados obtenidos por métodos electroforéticos y electroquímicos

MUESTRA	Electroforesis Capilar (*)	Voltamperometría			
		$t_{ac}$ 0 s		$t_{ac}$ 10 s	
		(*)	Recup. (%)	(*)	Recup. (%)
<b>Paciente A</b>	$1.98 \times 10^{-5}$	$1.99 \times 10^{-5}$	100	$2.04 \times 10^{-5}$	103
<b>Paciente B</b>	$9.61 \times 10^{-5}$	$1.02 \times 10^{-4}$	106	$1.03 \times 10^{-4}$	107

(\*) Concentración molar de imatinib y su metabolito en orina. En todos los casos se utilizó el método de las adiciones estándar.

*Determinación de sildenafil  
y su metabolito*

5. Determinación de citrato de sildenafil y su principal metabolito (UK-103,320) en suero mediante electroforesis capilar electrocinética micelar





Un reto importante para la Química Analítica es la determinación de drogas y sus metabolitos de degradación. Así es el caso del citrato de sildenafil (Viagra), que una vez que es ingerida, sufre reacciones metabólicas dentro del organismo. Estas reacciones originan unos derivados, los metabolitos, como es el caso del metabolito UK-103,320 el cual puede ser detectado en sangre.

En este capítulo se propone un método para la separación de citrato de sildenafil y su principal metabolito UK-103,320 en el seno de un fluido biológico como es el suero sanguíneo. El objetivo será obtener un método de análisis que pueda ser aplicado en los campos clínico y forense debido al posible empleo ilícito de este compuesto. La técnica empleada para conseguir la separación ha sido la ECEM.

La sangre humana es una forma especial de tejido líquido que circula en los vasos del organismo. En el hombre, como en los demás animales, se haya formada por una parte corpusculada (elementos celulares de la sangre) y una parte líquida (plasma). El plasma consta de agua, sales minerales y moléculas orgánicas de tamaño diverso (glúcidos, lípidos, próticos y derivados de éstos). El plasma es, por tanto, la parte líquida de la sangre, que resta tras la separación de los corpúsculos (leucocitos, eritrocitos y plaquetas). Se puede obtener fácilmente centrifugando con anticoagulantes (citrato, oxalato, etc.) la sangre extraída. Aparece como un líquido normalmente limpio, algo amarillento, de peso específico próximo a  $1.027 \text{ g/cm}^3$ , con viscosidad de unas 2.1 Cp y reacción levemente alcalina (el pH de la sangre está constantemente equilibrado, por un sistema de sustancias tampón, alrededor del valor de 7.4). Además del agua, el plasma contiene proteínas (entre ellas el fibrinógeno), sales minerales, glúcidos, lípidos y otras sustancias orgánicas e inorgánicas. Las

proteínas plasmáticas, después del agua, representan el principal componente del plasma, alcanzando una concentración media de 6.7 g por cada 100 cm<sup>3</sup>. Determinan las características físico-químicas fundamentales de la sangre (viscosidad, peso específico) entre las cuales resulta de especial interés la presión oncótica o coloidosmótica, que influye en los intercambios nutritivos entre la sangre y los tejidos a nivel de los capilares. Las proteínas plasmáticas se dividen en tres grupos fundamentales que pueden diferenciarse por sus características físico-químicas y biológicas. Son las albúminas, globulinas y fibrinógeno. El hígado, normalmente, produce las albúminas, el fibrinógeno, la protombina y hacia el 80% de las globulinas. El bazo, los elementos linfocitos y otras partes del sistema retículo-endotelial producen las globulinas beta y gamma. El periodo de vida varía con la proteína, de 12 a 30 días, aunque el cómputo es complicado por la capacidad de intercambio de las proteínas del plasma. La importancia de las proteínas plasmáticas radica en que la mayor parte de las moléculas llevadas de un lugar a otro del cuerpo circulan sobre una proteína. Entre estas moléculas quedan incluidos los fármacos. Hay que tener en cuenta que en la sangre los fármacos pueden encontrarse libres, fijados a eritrocitos o unidos a proteínas plasmáticas. La fracción unida a las proteínas plasmáticas es inactiva. Para que un fármaco se combine reversiblemente a las proteínas plasmáticas se requiere que la estructura terciaria de ésta esté intacta. Por tanto, los dos compuestos estudiados se unirán a las proteínas para circular por la sangre y este hecho hará que se necesite encontrar un método que permita su determinación despreciando la unión a las proteínas.

La sangre extraída sin adición de anticoagulantes coagula al cabo de poco tiempo formando un retículo macromolecular de fibrina. Asimismo, puede

hacerse coagular el plasma tratado con anticoagulantes, si se le añade una cierta cantidad de iones de calcio (en forma de cloruro cálcico). En cualquier caso, tras separar el retículo de fibrina se obtiene el suero. No hay que confundir el plasma sanguíneo con el suero, este último es un líquido transparente, amarillento y ligeramente viscoso que se separa de la sangre coagulada. Constituye, por tanto, la fracción no coagulable de la sangre extravasada. El suero posee la misma composición que el plasma, exceptuando el fibrinógeno (que precipita, junto con las células sanguíneas en el coágulo) y las sales de calcio (que intervienen activamente en el proceso de coagulación) (158).

El citrato de sildenafil y UK-103,320 son dos moléculas con estructura química muy similar, ya que sólo difieren en un grupo metilo, por lo que la resolución de sus mezclas es, obviamente, complicada. En el caso de la electroforesis habrá que conseguir que la composición del electrolito de separación sea tal que consiga la separación deseada con alta resolución y en el menor tiempo posible.

Al emplear la ECEM se necesita un surfactante que permitirá que las proteínas que forman parte del suero se introduzcan en las micelas y que aparezca una competencia por las uniones que se establecen entre los principios activos y estos componentes de la sangre, los principios activos pueden dejar libres los sitios de unión de las proteínas plasmáticas a los que se podrán unir los monómeros del surfactante. Las proteínas saldrán muy cerca del flujo electroosmótico (FEO) y los compuestos de interés podremos encontrarlos separados de ellas y bien resueltos.

La combinación de la extracción en fase sólida (EFS) con la ECEM ha resultado ser una atractiva combinación para el análisis de diferentes

compuestos en fluidos biológicos, preparaciones farmacéuticas y muestras de carácter ilícito (176).

### *5.1. Condiciones de operación*

Las separaciones se llevaron a cabo empleando viales de vidrio de 2 mL de capacidad para los electrolitos de separación y un vial que contenía la disolución de NaOH. Por otro lado, para las muestras de suero se utilizaron viales de polipropileno de 200  $\mu$ L de capacidad. Los viales usados en los pasos de lavado fueron distintos a los usados en las separaciones con el fin de mantener el nivel de electrolito constante en el vial situado en el polo anódico.

El capilar empleado para la separación fue de sílice fundida con una longitud de 60 cm (50 cm hasta el detector) y un diámetro interno de 75  $\mu$ m. Dicho capilar estaba introducido en un cartucho que presentaba una ventana de detección de 800  $\times$  100  $\mu$ m.

Antes de iniciar cualquier separación, el capilar hubo de ser acondicionado haciendo pasar NaOH 0.5 M a alta presión durante 20 minutos y después agua durante 10 minutos para arrastrar el exceso de NaOH. Estos lavados fueron seguidos por un lavado con el tampón de separación (10 mM fosfato de pH 12.3 y SDS de concentración 30 mM) y una separación entre los dos tampones (de ánodo y cátodo) de una duración de 10 minutos.

En el método optimizado se realizaron unos lavados previos a las separaciones con el electrolito de separación; después se lleva a cabo la inyección de la disolución de medida a baja presión (inyección hidrodinámica) y, por último, la separación. En todos los casos las dos primeras inyecciones de una secuencia no se tienen en cuenta por considerar que el equipo debe equilibrarse antes de empezar a proporcionar resultados fiables.

## ***5.2. Condiciones de medida***

El detector empleado para la identificación de los compuestos en estudio fue un detector de diodos en fila (*Diode Array*). El registro se realizó en el rango de longitudes de onda de interés, en este caso entre 190 y 315 nm. Los analitos se identifican en el diagrama de contorno por medio de su espectro, para ello se realizan inyecciones aisladas de cada uno de los compuestos y se obtienen los espectros en el máximo de los picos. Posteriormente, se determinan los máximos espectrales de absorbancia para obtener los electroferogramas a las longitudes de onda de los máximos de absorbancia correspondientes y realizar las medidas oportunas a dicha longitud de onda. En los estudios preliminares las medidas necesarias fueron tiempos de migración y resolución. En la calibración se utilizaron las áreas de pico corregidas que se obtienen tras dividir el área del pico entre su correspondiente tiempo de migración. Así, de cada espectro se obtuvo

el máximo más significativo, en nuestro caso fue de 230 nm para ambos compuestos, citrato de sildenafil (CS) y su metabolito UK-103,320 (UK).

### ***5.3. Pretratamiento de la muestra***

#### ***5.3.1. Obtención del suero***

La sangre utilizada fue extraída de personas sanas en ayunas y posteriormente centrifugada. El suero obtenido de esta manera se depositó en tubos de plástico con fondo cónico de 2 mL de volumen, provistos de una tapa. Seguidamente se guardaron los tubos de plástico a  $-18^{\circ}\text{C}$  para su conservación.

#### ***5.3.2. Tratamiento del suero humano***

La extracción en fase sólida (EFS) se ha establecido como una de las técnicas de preparación de muestra más ampliamente utilizadas. Se ha utilizado tanto en el enriquecimiento de analitos traza como en la limpieza de la matriz (142-144).

En la introducción se han comentado las ventajas de la EFS, es fácil de usar, requiere menos recursos (tiempo y cantidad de disolventes), es capaz de producir extractos más limpios, es fácilmente automatizada y puede llegar a obtener factores de concentración (concentración final del analito / concentración inicial) del orden de 1000. De igual forma se han comentado los inicios de la técnica y sus principales usos (145-147).

Para llevar a cabo la extracción del citrato de sildenafil (CS) y UK-103,320 (UK) del suero humano se utilizó un cartucho tC<sub>18</sub> (WATERS sep-pack plus, Milford, MA, USA) en fase reversa. El cartucho se activó siguiendo siempre la misma secuencia de operaciones y se hizo pasar la muestra después a través de ellos para llevar a cabo, posteriormente, la elución del CS y UK en el disolvente apropiado. Todo esto supuso una serie de estudios previos que proporcionasen el método de extracción con el que la recuperación del CS y UK introducidos fuese del 100 %.

a) Secuencia de activación del cartucho

Los pasos que debían seguirse para activar cada uno de los cartuchos tC<sub>18</sub> utilizados fueron los siguientes:

- 1) 5 mL de metanol
- 2) 5 mL de tampón fosfato de pH 7.0, 10 mM

La conexión de los cartuchos a un sistema de vacío facilitaba el paso de los distintos disolventes y disoluciones, a la vez que permitía controlar el flujo a través de los cartuchos.

Se tomaron dos cartuchos y tras activarlos se hizo pasar a través de uno de ellos solamente suero (1 mL) y, a través del otro, suero dopado al que se había añadido CS y UK en una concentración de 1.42 y 1.95 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente. Así, la disolución que eluyera del primero de los cartuchos se usaría como blanco mientras que la del segundo se usaría para cuantificar.

### b) Optimización del proceso de elución con disolventes

Una vez que habían quedado retenidos en el cartucho determinados componentes del suero y los dos compuestos de interés, había que encontrar la forma de eluir el CS y UK en un volumen pequeño y sin necesidad de un número de operaciones elevado.

Con el fin de determinar en qué medida habían quedado retenidos los dos compuestos, se comenzó un proceso de elución que supuso la recogida de 4 fracciones obtenidas tras hacer pasar fracciones de 2 mL de una disolución de fosfato de pH 7.0, 10 mM. El registro espectrofotométrico de las distintas fracciones demostró (siempre en comparación con el blanco) que ninguna de ellas contenía estos dos compuestos. Puesto que los dos compuestos estudiados son muy solubles en metanol, se decidió obtener 3 fracciones de 3 mL cada una de una mezcla metanol:agua al 50% (V/V). Se volvieron a registrar en el espectrofotómetro y se comprobó que aparecía el espectro suma de los compuestos en la segunda fracción.

Se dedujo entonces, que la mezcla de elución debía contener metanol en un porcentaje más elevado. Así, procediendo como se ha descrito anteriormente, pero utilizando una mezcla de metanol:agua al 80% (V/V) se



obtuvieron 5 fracciones y mediante medidas espectrofotométricas se comprobó que los dos compuestos comenzaban a salir desde la primera fracción y, aunque en mucha menor cantidad, continuaban saliendo en las últimas fracciones.

Atendiendo a los dos estudios precedentes se pensó que, ya que el CS y UK no eluían con los 8 mL de disolución fosfato de pH 7.0 (10 mM) se podría realizar como paso previo a la elución de los dos compuestos pues permitiría eliminar algunos componentes del suero ya que quedarían retenidos en los cartuchos puesto que serían más polares que el CS y UK. A continuación, se utilizó como eluyente 1.5 mL de metanol, así nos aseguraríamos que todo el CS y UK se habrían eluido. Esto se corroboró por espectrofotometría.

De esta forma la secuencia que seguiría tras la activación de los cartuchos sería la siguiente:

- 1) Lavado de los cartuchos con 8 mL de fosfato pH 7.0, 10 mM. El residuo recogido se tira.
- 2) Elución con 1.5 mL de metanol.
- 3) Evaporación en placa hasta total sequedad.
- 4) Redisolución del residuo obtenido con 500  $\mu$ L de metanol:fosfato (pH 12.3, 1 mM) al 20% (V:V).

De esta forma, quedaba optimizado el proceso de extracción para que posteriormente el CS y UK fuesen separados utilizando la EC.

### ***5.4. Estudios preliminares. Optimización de las condiciones de separación en ECZ.***

Inicialmente se estudió la posibilidad de realizar la separación por ECZ. El pH de la disolución del electrolito de separación es un factor muy importante en cuanto a la ionización de los grupos silanol de la pared del capilar y sobre las moviidades de los compuestos que van a ser estudiados. Por esta razón, se llevó a cabo un estudio de la influencia del pH en el electrolito de separación en el rango comprendido entre 3.0 y 12.0 con el fin de evaluar las posibilidades de separación del CS y UK.

Entre los valores de pH comprendidos entre 3.0 y 7.0, CS y UK están en su forma catiónica debido a que a esos valores de pH se produce una protonación de los grupos amino de ambas moléculas y además los tiempos de migración del CS y UK eran menores que el del FEO.

En un intervalo de pH entre 8.0 y 9.0, CS y UK presentaban el mismo tiempo de migración que el FEO debido a que presentaban su forma neutra.

En el rango de pH comprendido entre 10.0 y 12.0, los tiempos de migración de ambos compuestos son mayores que los del FEO, por lo tanto CS y UK presentarían su forma aniónica en esas condiciones.

Un pH de 6.2 fue elegido para el estudio en ECZ, debido a que a valores de pH mayores la resolución obtenida era muy pequeña, de igual manera ocurría para valores de pH menores al valor seleccionado.

A un extracto de suero se le adicionó una cantidad conocida de CS y UK y posteriormente la disolución resultante se inyectó en el equipo de electroforesis. La separación se llevó a cabo con una disolución 30 mM de tampón fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) de pH 6.2 y con un voltaje de 25 kV a una temperatura de 25°C. Realizada esta experiencia se pudo observar que los tiempos de migración para UK y CS eran 3.13 y 3.41 min, respectivamente, y que la resolución obtenida entre los dos picos no era satisfactoria. Además se pudo comprobar que el tiempo de migración del FEO no era reproducible a ese valor de pH. Por esas razones se decidió utilizar la modalidad de electroforesis capilar electrocinética micelar (ECEM).

### ***5.5. Estudios preliminares en ECEM.***

En este caso se utilizó SDS como agente micelar por ser el que más comúnmente se ha utilizado en ECEM para la separación de este tipo de compuestos. También se probaron el ácido deoxicólico y Tween 20 como agentes micelares, sin embargo no se encontraron resultados satisfactorios.

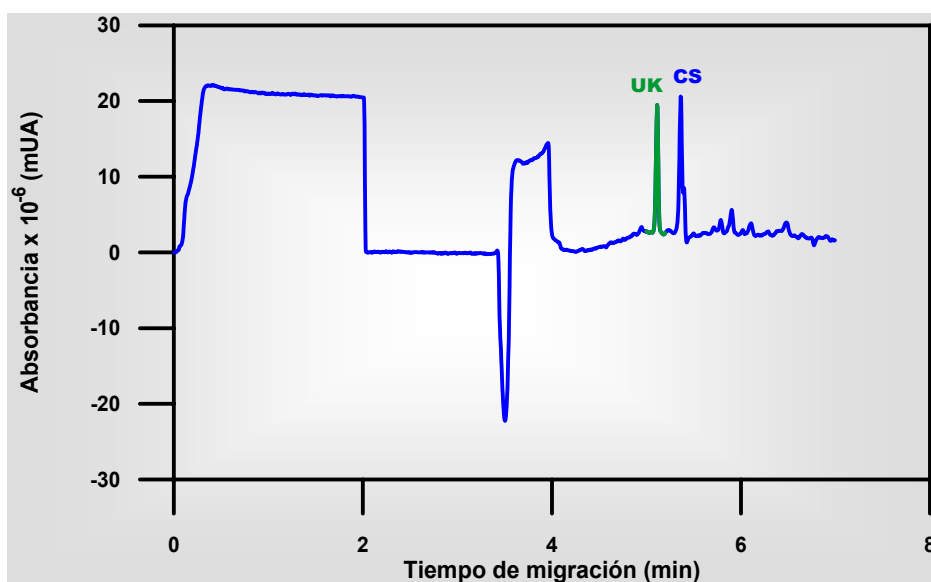
A la vista de los resultados anteriores y teniendo en cuenta la ionización de los compuestos, se observó que se necesitaba un pH suficientemente básico, por un parte, para que CS y UK adquirieran carga negativa y, por otra parte para que las micelas presentaran una migración neta hacia el cátodo que

permitieran obtener un tiempo de análisis razonable. Así, para optimizar este parámetro, se realizaron separaciones de una muestra acuosa (con 20% Metanol) la cual contenía CS y su metabolito y una muestra del extracto del suero al cual se le había adicionado CS y UK utilizando como electrolito de separación diferentes disoluciones reguladoras de concentración 30 mM ajustadas a valores de pH 9.0, 10.0 y 12.3 (fosfato) y SDS de concentración 30 mM. Estas separaciones se llevaron a cabo aplicando un potencial de 25 kV al capilar de separación y manteniendo una temperatura de 25°C.

Finalmente, se eligió el tampón fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) de pH 12.3 para el estudio por las siguientes razones:

- a) A este pH presenta una elevada capacidad de tamponamiento ya que tiene un valor de  $\text{pK}_{\text{a}3}$  de 12.0.
- b) CS y UK adquieren carga negativa (teniendo en cuenta que el  $\text{pK}_{\text{a}}$  de ambos compuestos tienen un valor de 8.8). Para valores de pH próximos a 9.0, tanto CS como UK presentan cierta fracción de carga positiva que da lugar a la formación de un par iónico con el SDS. Este par iónico interacciona con las paredes del capilar produciendo tiempos de migración más largos y una resolución relativamente pobre.
- c) Se minimizaron los tiempos de análisis y se obtuvo buena resolución entre los picos.

Como se ve en electroferograma de la figura 5.1 los picos correspondientes a CS y UK aparecen perfectamente separados entre sí.



**Figura 5.1.** Electroferograma de una muestra que contenía  $2.25 \text{ mgL}^{-1}$  de UK y  $1.68 \text{ mgL}^{-1}$  de CS en un extracto de suero (condiciones de separación: tampón fosfato  $10 \text{ mM}$  de pH 12.3 y  $25 \text{ mM}$  SDS;  $25^\circ\text{C}$  y  $25 \text{ kV}$ )

### **5.6. Influencia de la concentración del tampón de separación.**

El efecto que produce sobre una separación electroforética la variación de la fuerza iónica del medio no tiene por qué seguir una regla fija. En la gran mayoría de los casos, un aumento de la concentración de tampón supone un

aumento en los tiempos de migración, mejorando la resolución y evitando, en algunos casos, distorsiones en los picos del electroferograma debido a la supresión de los efectos de electrodispersión. Sin embargo, un aumento de la concentración del tampón también ocasiona altas intensidades de corriente que recorren el capilar generando mucho calor por efecto Joule lo cual puede provocar el ensanchamiento de los picos y pérdida de resolución.

Para optimizar este parámetro, se prepararon diferentes disoluciones de electrolito de separación que contenían 30 mM de SDS y tampón fosfato de pH 12.3 de concentraciones variables entre 5 y 30 mM. Las separaciones correspondientes, de una muestra de extracto de suero que contenía una concentración de 2.00 mg L<sup>-1</sup> de cada uno de los compuestos, se realizaron a 25 kV y 25°C de temperatura en el capilar.

Tal y como se preveía del estudio realizado se podía decir que un aumento en la concentración del tampón se traducía en un aumento en los tiempos de migración de CS y UK, además se pudo comprobar que los picos obtenidos eran más asimétricos a medida que aumentaba la fuerza iónica del tampón. Una concentración de 10 mM de tampón fosfato fue seleccionada como óptima por mantener una buena resolución de pico y una corriente pequeña, lo cual consigue reducir el ruido de la línea base.

En la siguiente tabla se muestran los tiempos de migración del FEO y de los dos compuestos así como la resolución obtenida:

**Tabla 5.1.** Variación de los tiempos de migración con la concentración de fosfato

Concentración fosfato (mM)	$t_m$ FEO (min)	$t_m$ UK (min)	$t_m$ CS (min)	Rs
5	3.14	4.65	4.92	4.65
10	3.45	5.03	5.27	4.95
20	3.85	5.84	6.12	5.27
30	4.13	6.50	6.85	5.56

### 5.7. Influencia de la concentración de SDS.

Como se explicó en el capítulo de introducción teórica, la modalidad de cromatografía capilar electrocinética micelar se basa en la presencia en el electrolito de separación de un surfactante que tenga la capacidad de formar agregados micelares. Tal como es el caso del dodecilsulfato de sodio (SDS), que presenta esta capacidad a concentraciones superiores a 10 mM.

Cuando una muestra contiene analitos cargados, éstos se separan en función de sus movilidades o en función de sus interacciones con las micelas dependiendo de su carga y de la carga de las micelas.

La influencia del SDS sobre el tiempo de migración de los compuestos estudiados se muestra en la figura 5.2. Todos los electroferogramas fueron registrados utilizando un potencial de 25 kV, una temperatura de 25°C y un electrolito de separación compuesto por tampón fosfato de pH 12.3, 10 mM en el que la concentración de SDS se fue variando desde 10 hasta 40 mM. Los resultados muestran que la concentración de SDS tiene un ligero efecto sobre la movilidad del FEO a la vez que sobre la movilidad de los dos compuestos. Esa variación en los tiempos de migración de estos dos compuestos se debe a que al aumentar la concentración de SDS se modifica también la fuerza iónica del electrolito de separación, disminuyendo el potencial zeta de la doble capa lo cual provoca un ligero aumento de los tiempos de migración del CS y UK. Además un aumento en la concentración de SDS provoca a su vez un aumento de la fase pseudo-estacionaria, lo cual conlleva un retraso en los tiempos de migración de los dos compuestos.

En vista de los resultados de este estudio y para posteriores experiencias, se seleccionó como óptima una concentración de 30 mM de SDS en el electrolito, porque en estas condiciones se consiguen picos estrechos, bien resueltos y en un tiempo de análisis aceptable.



---

Determinación de citrato de sildenafil y su metabolito

---

*Tabla 5.2. Variación de los tiempos de migración con la concentración de SDS*

Concentración SDS (mM)	$t_m$ FEO (min)	$t_m$ UK (min)	$t_m$ CS (min)	Rs
10	3.64	4.99	5.04	1.02
20	3.65	5.24	5.40	2.98
30	3.68	5.56	5.85	5.08
40	3.70	5.91	6.32	6.96

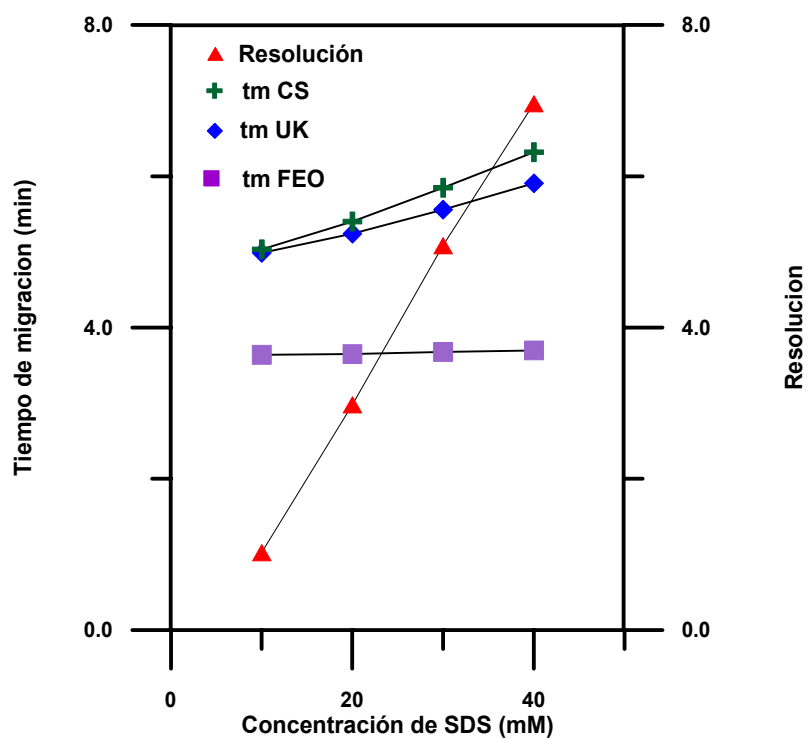


Figura 5.2. Influencia de la concentración de SDS en los tiempos de migración

### 5.8. Estudio de la influencia del voltaje sobre la separación.

Una vez optimizadas las variables químicas de la separación, abordamos la optimización de las variables instrumentales comenzando con el voltaje.

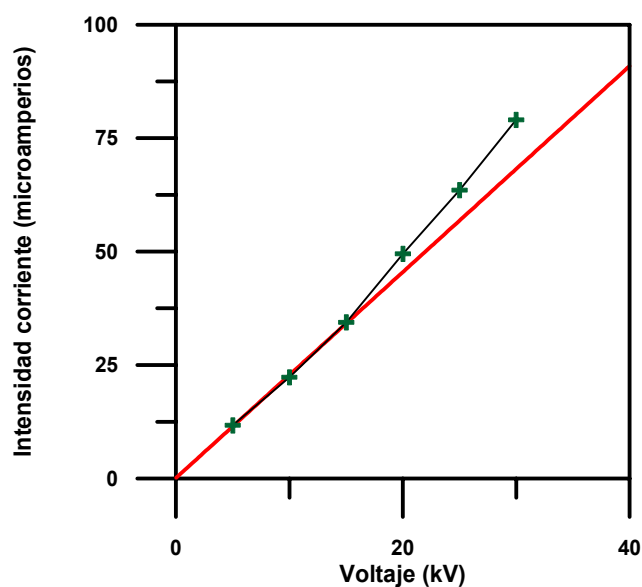
Cuanto mayor sea el voltaje aplicado mayores eficacias se obtienen y más cortos tiempos de análisis aunque ello conlleva una disminución de la resolución, debida a la mayor producción de calor.

En principio, el máximo voltaje que se puede aplicar viene dado por el punto en el cual se pierde la linealidad en la representación de la Ley de Ohm, es decir, la representación de la intensidad que atraviesa el capilar relleno del electrolito de separación cuando se varía el voltaje desde valores muy bajos hasta 30 kV. Este máximo valor depende de las características de la disolución tampón, siendo los valores más frecuentes para el trabajo en electroforesis capilar voltajes hasta 30 kV, intensidades de corriente hasta 300  $\mu$ A y potencias hasta 6 W.

De igual manera, la aplicación del voltaje requiere hacerlo de manera gradual, es decir, aplicar una rampa lineal de voltaje. Se sabe que hay una relación directa entre voltaje aplicado y calor generado. Aplicando una rampa de voltaje progresiva y adecuada se puede evitar un calentamiento brusco del capilar, de manera que se evite un calentamiento instantáneo de la zona de muestra que provoque su dilatación y, como consecuencia, la pérdida de la misma.

Para optimizar el voltaje se llevaron a cabo separaciones utilizando como electrolito de separación una disolución que contenía tampón fosfato 10 mM de pH 12.3 y SDS de concentración 30 mM. Todos los electroferogramas se registraron a 25°C, pero aplicando diferentes voltajes, comprendidos en el intervalo de 5 a 30 kV (Tabla 5.3). La representación gráfica de la Ley de Ohm probó que existía linealidad entre voltaje aplicado y corriente generada hasta 15 kV, como se puede ver en la figura 5.3.

Con el objeto de disminuir el tiempo de análisis se llegó a una situación de compromiso, eligiendo un potencial de 25 kV ya que la resolución entre los picos era aceptable con una intensidad de corriente no muy elevada y tiempos de análisis aceptables.



*Figura 5.3. Influencia del voltaje en la corriente obtenida*

*Tabla 5.3. Variación de los tiempos de migración y resolución con el voltaje.*

<b>Voltaje (kV)</b>	<b><math>t_m</math> FEO (min)</b>	<b><math>t_m</math> UK (min)</b>	<b><math>t_m</math> CS (min)</b>	<b>Rs</b>
<b>5</b>	17.3	25.8	27.3	4.88
<b>10</b>	8.73	13.0	13.8	5.27
<b>15</b>	5.81	8.68	9.20	5.39
<b>20</b>	4.32	6.46	6.85	5.42
<b>25</b>	3.41	5.09	5.40	5.33
<b>30</b>	2.78	4.15	4.41	5.20

### **5.9. Efecto de la temperatura.**

La temperatura se relaciona con la viscosidad del medio electroforético. De este modo, un aumento de la temperatura disminuye la viscosidad, por lo que aumenta la velocidad del FEO y, como consecuencia, la movilidad aparente de los compuestos. Todo ello acorta el tiempo de análisis, aunque a veces a expensas de perder resolución. El intervalo de trabajo suele oscilar entre 20 y 50°C y, aunque es habitual trabajar a temperatura ambiente, lo más importante es mantenerla constante. Durante el proceso de separación, se

estudió el efecto de la temperatura en la migración de los compuestos. Para ello, se utilizó como electrolito de separación una disolución que contenía tampón fosfato 10 mM de pH 12.3 y SDS de concentración 30 mM. Todos los electroferogramas se registraron a 25 kV, pero a diferentes temperaturas, comprendidas entre en el intervalo de 20 a 35°C.

Como se preveía, un aumento de la temperatura produjo una disminución de los tiempos de migración y, por consiguiente, del tiempo de análisis (ver tabla 5.4 y figura 5.4). También se observó que en todo el intervalo de temperatura estudiado, los picos de CS y UK aparecían perfectamente separados, si bien la máxima resolución se producía a 30°C, volviendo a disminuir esta a medida que aumentaba la temperatura de separación.

Al igual que en el caso anterior hubo que encontrar una solución de compromiso que tuviera en cuenta dos factores, la resolución por un lado y el ruido de la línea base por otro. Finalmente, se seleccionó como óptima una temperatura de 25°C porque se consigue una resolución buena en un tiempo de análisis aceptable además de presentar menos ruido en la línea base.

Tabla 5.4. Influencia de la temperatura

Temperatura (°C)	$t_m$ FEO (min)	$t_m$ UK (min)	$t_m$ CS (min)	Rs
20	3.76	5.47	5.72	3.89
25	3.36	4.86	5.10	4.11
30	3.00	4.34	4.57	4.23
35	2.70	3.90	4.10	4.13

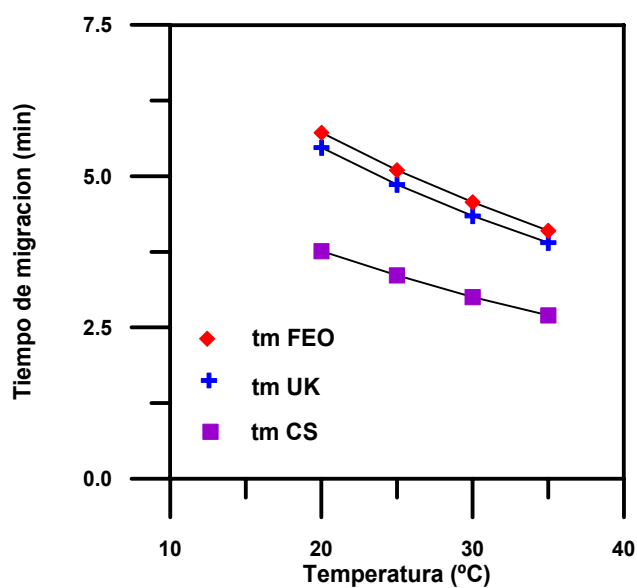


Figura 5.4. Influencia de la temperatura en los tiempos de migración.

**5.10. Influencia del tiempo de inyección de la muestra.**

En este trabajo se siguió utilizando la inyección hidrodinámica por presión. Para establecer la correspondencia con los tiempos de inyección se utilizaron las áreas de pico corregidas (APC). Estas APC se calcularon para cada compuesto en el máximo de absorbancia (230 nm), en este caso fue el mismo para los dos.

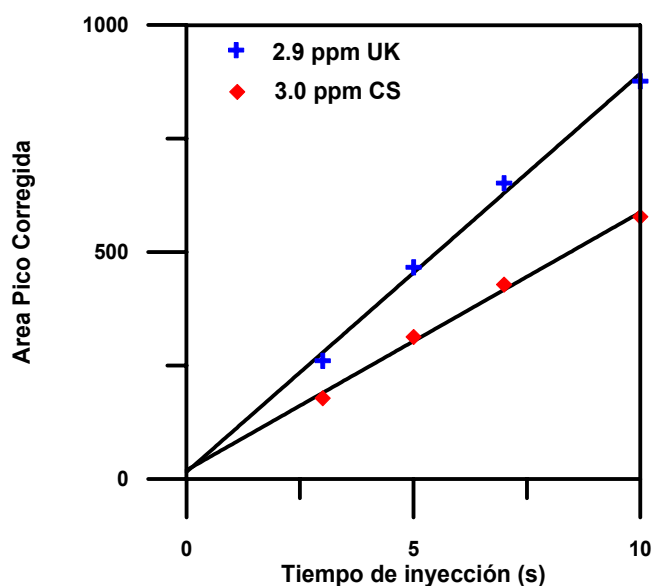
Para el proceso de separación se utilizó como electrolito de separación una disolución que contenía tampón fosfato 10 mM de pH 12.3 y SDS de concentración 30 mM. Todos los electroferogramas se registraron a 25 kV y una presión de inyección de 0.5 psi, pero a diferentes tiempos de inyección de muestra, comprendidas en el intervalo de 3 a 30 segundos (tabla 5.5).

Los resultados de las inyecciones se muestran en la figura 5.5.

**Tabla 5.5. Influencia del tiempo de inyección en la resolución.**

<b>Tiempo de inyección (s)</b>	3	5	7	10	15	20	25	30
<b>Resolución</b>	4.66	4.38	4.00	3.30	2.62	2.74	2.20	1.10





*Figura 5.5. Estudio de los tiempos de inyección en función de las APC*

Se puede observar que si se representa el área de pico corregida frente al tiempo de inyección, la respuesta es proporcional. Sin embargo, la ordenada en el origen es significativamente distinta de cero debido al fenómeno de "inyección espontánea" que sucede por el simple hecho de introducir el capilar en un vial repleto de disolución (177). En este estudio, se apreció que tanto para CS como para UK las ordenadas en el origen difieren significativamente de cero. También se pudo observar como al aumentar el tiempo de inyección disminuía

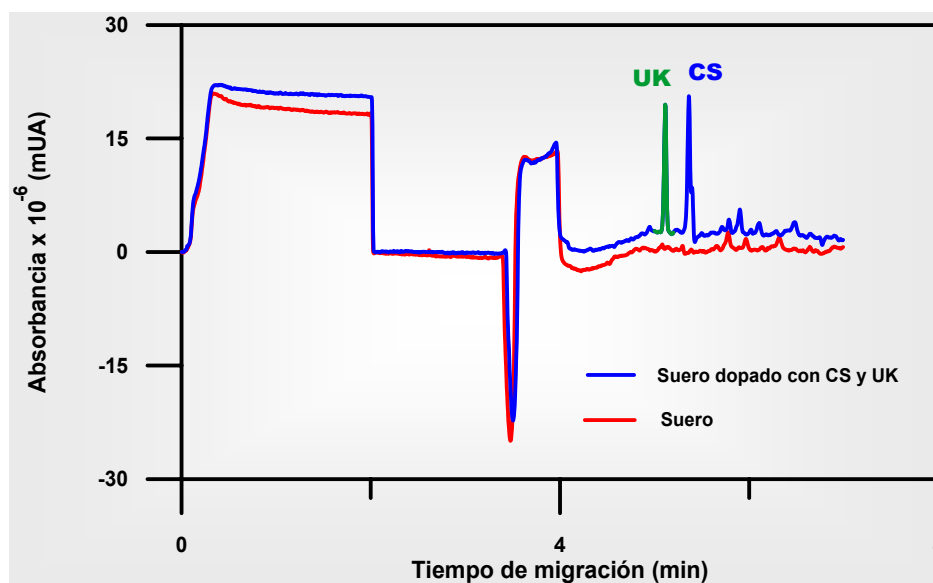
la resolución de los picos, por esa razón se eligió como tiempo óptimo de inyección de muestra 7 segundos.

### ***5.11. Condiciones químicas e instrumentales finales.***

El estudio precedente permitió establecer las condiciones óptimas para la calibración, es decir, para realizar la cuantificación de CS y UK. La corriente generada bajo las condiciones seleccionadas fue de 68  $\mu$ A y el tiempo de análisis 7 minutos. Las condiciones finales se resumen en la tabla 5.6 y en estas condiciones se registró el electroferograma de la figura 5.6.

***Tabla 5.6. Condiciones finales***

<b><i>Electrolito de separación</i></b>	10 mM tampón fosfato de pH 12.3
	30 mM SDS
<b><i>Voltaje</i></b>	25 kV
<b><i>Temperatura</i></b>	25°C
<b><i>Tiempo de inyección</i></b>	7 segundos



**Figura 5.6.** Electroferogramas de una muestra de extracto de suero libre de compuestos y una muestra que contenía  $2.25 \text{ mgL}^{-1}$  de UK y  $1.68 \text{ mgL}^{-1}$  de CS en extracto de suero obtenidos con un electrolito compuesto por tampón fosfato  $10 \text{ mM}$  de  $\text{pH } 12.3$  y  $25 \text{ mM}$  SDS;  $25^\circ\text{C}$  y  $25 \text{ kV}$ .

### 5.12. Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación fueron hallados en función de la línea base o nivel de ruido de un electroferograma tipo que se obtuvo

inyectando una disolución ( $t_i = 7$  s) que no contenía ninguno de los analitos y estaba constituida únicamente por un extracto de suero. Este electroferograma sirve de referencia para medir el nivel de ruido expresado en forma de unidades de absorbancia (UA) a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción (230 nm). A continuación se inyectó otra disolución de un extracto de suero ( $t_i = 7$  s) que contenía a los dos compuestos, cada uno en una concentración de 4.80 y 4.90 mgL<sup>-1</sup> de CS y UK, respectivamente. Entonces se midió la altura de cada pico, a la longitud de onda correspondiente, en unidades de absorbancia. Conocidos estos valores y la concentración a la que correspondían, se compararon con los datos de unidades de absorbancia pertenecientes al electroferograma tipo para obtener, finalmente, tanto los límites de detección como los de cuantificación de la forma descrita en el capítulo 3. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 5.7.

*Tabla 5.7. Límites de detección y cuantificación*

<b>COMPUESTO</b>	<b>LD (mgL<sup>-1</sup>)</b>	<b>LC (mgL<sup>-1</sup>)</b>
<b>CS</b>	0.28	0.91
<b>UK</b>	0.29	0.96

### ***5.13. Calibrado y estudio estadístico***

Para evaluar la respuesta frente a la concentración se hicieron cinco calibrados a lo largo de un día y, después, se realizaron cinco calibrados durante cinco días consecutivos.

Considerando los calibrados que se efectuaron dentro de un mismo día, se prepararon cada uno de ellos de manera aislada y con seis valores de concentración para cada uno de los analitos, 0.71, 1.40, 2.08, 2.75 y 3.41 mg L<sup>-1</sup> para CS y 0.95, 1.88, 2.79, 3.68 y 4.57 mg L<sup>-1</sup> para UK.

Al igual que con los tiempos de inyección, la respuesta evaluada para el estudio del comportamiento lineal con la concentración fueron las APC de cada uno de los compuestos calculadas sobre los electroferogramas registrados a la longitud de onda característica de 230 nm.

Las disoluciones patrones se prepararon añadiendo las cantidades necesarias de los compuestos al extracto de suero hasta alcanzar las concentraciones deseadas. Las condiciones de operación fueron las mencionadas en la tabla 5.6 con un tiempo de inyección constante de 7 segundos.

La precisión dentro de un mismo día se evaluó, por tanto, en base a cinco calibrados llevados a cabo el segundo día del estudio. Las ecuaciones de regresión lineal fueron calculadas para cada uno de los cinco calibrados y quedan reflejadas en la tabla 5.8 ( $\alpha = 0.05$ ). Además, los valores de desviación estándar relativa (DER) entre las pendientes son de 6.40 % para CS y 3.37 % para

UK. La tabla 5.9 muestra los valores medios y las DER dentro de un mismo día para las distintas concentraciones empleadas de los dos compuestos.

Se llevó a cabo el análisis de varianza (test ANOVA) para comparar las diferentes ecuaciones de las rectas calibrado realizadas a lo largo de cinco días distintos. En general, es una medida estadística de error, evaluándose éste al desglosar la variación total en sus distintas fuentes de error. En la precisión de un método analítico, principalmente contribuyen la variación entre los distintos calibrados y la variación de cada muestra dentro de los calibrados (178).

La tabla 5.10 muestra el análisis de varianza para la comparación de las rectas de calibrado individuales que permiten juzgar estadísticamente la viabilidad de la recta de regresión. Si el valor de  $F_1$  experimental es menor que el valor teórico, la desviación de los calibrados individuales sobre la recta global no es significativa y si el valor de  $F_2$  es menor que el teórico quiere decir que no existen diferencias significativas entre las pendientes individuales y su media se puede tomar como la pendiente representativa. Como se puede apreciar, las variables experimentales de los estadísticos  $F_1$  y  $F_2$  son inferiores a los teóricos, deduciéndose que ninguna recta se aparta significativamente de la recta global ( $F_1$ ) y que la pendiente es representativa de todas la rectas ( $F_2$ ). Por esa razón las dos rectas de calibrado representativas para UK y CS, respectivamente pueden ser:

$$APC = 5.50 + 181.68 C_{UK} \quad r^2 = 0.998$$

$$APC = 33.29 + 187.44 C_{CS} \quad r^2 = 0.999$$

### Determinación de citrato de sildenafil y su metabolito

Los valores de DER para las pendientes fueron 2.72 y 4.10 % para CS y UK, respectivamente, lo cual confirma que la precisión de las pendientes entre días es aceptable. Los valores de DER son bastante aceptables para muestras biológicas y demuestran la robustez del método.

**Tabla 5.8.** Rectas de calibrado para un mismo día

UK	Ecuaciones	R <sup>2</sup>
Calibrado 1	ACP = 35.07 + 180.15 C <sub>UK</sub>	0.999
Calibrado 2	ACP = 24.10 + 181.85 C <sub>UK</sub>	0.999
Calibrado 3	ACP = 13.42 + 190.15 C <sub>UK</sub>	0.997
Calibrado 4	ACP = 19.06 + 178.15 C <sub>UK</sub>	0.997
Calibrado 5	ACP = 28.73 + 179.75 C <sub>UK</sub>	0.996

CS	Ecuaciones	R <sup>2</sup>
Calibrado 1	ACP = 50.53 + 170.15 C <sub>CS</sub>	0.995
Calibrado 2	ACP = 22.18 + 182.33 C <sub>CS</sub>	0.999
Calibrado 3	ACP = -11.07 + 190.38 C <sub>CS</sub>	0.999
Calibrado 4	ACP = 36.53 + 175.04 C <sub>CS</sub>	0.993
Calibrado 5	ACP = 43.87 + 181.99 C <sub>CS</sub>	0.993

*Tabla 5.9. Valores medios y DER*

	<b>Concentración (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Media</b>	<b>DER</b>
<b>UK</b>	0.95 (n = 5)	184.00	4.89
	1.88 (n = 5)	375.20	3.42
	2.79 (n = 5)	528.80	5.21
	3.68 (n = 5)	704.20	2.53
	4.57 (n = 5)	836.60	3.15
<b>CS</b>	0.71 (n = 5)	151.40	7.14
	1.40 (n = 5)	293.80	7.43
	2.08 (n = 5)	394.80	3.06
	2.75 (n = 5)	535.40	3.86
	3.41 (n = 5)	642.40	3.47



*Tabla 5.10. Análisis de varianza. Comparación de las rectas de regresión.*

Fuente de variación	Suma de cuadrados		Grados de libertad		Media cuadrática	
	UK	CS	UK	CS	UK	CS
<b>Desviación dentro de los calibrados</b>	7177.86	3111.98	12	12	598.15	259.33
<b>Diferencias entre los coeficientes de regresión</b>	614.79	768.12	3	3	204.93	256.04
<b>Desviaciones entre los calibrados individuales</b>	5212.97	4408.61	6	6	868.83	734.77
<b>Desviación total sobre el calibrado global</b>	12390.83	7520.59	18	18	688.38	417.81

	$F_{1(exp)}$	$F_{1(teor)}$	$F_{2(exp)}$	$F_{2(teor)}$
<b>UK</b>	1.45	3.00	0.34	3.49
<b>CS</b>	2.83	3.00	0.99	3.49

#### **5.14. Aplicaciones**

Finalmente, para comprobar la validez del método se tomaron por triplicado muestras de suero a las que se añadieron los dos compuestos a

## Capítulo 5

---

distintos niveles de concentración y en distintas proporciones y se procedió a la determinación cuantitativa de UK y CS en las diferentes muestras utilizando el método propuesto. En todo momento los porcentajes de recuperación fueron calculados con respecto a una muestra patrón. Las disoluciones de muestra patrón se prepararon añadiendo las cantidades necesarias de los compuestos al extracto de suero hasta alcanzar las concentraciones deseadas.

Se realizaron las separaciones en las condiciones finales seleccionadas y se registraron los electroferogramas para su posterior análisis. Se utilizaron para cuantificar las APC a 230 nm.

En la tabla 5.11 se muestran las recuperaciones obtenidas de las muestras sintéticas preparadas en el laboratorio. Estas recuperaciones son la media de tres valores ya que cada muestra se preparó por triplicado. Como se puede ver, todas las recuperaciones estuvieron próximas al 100 %, dentro de la precisión que se espera para la determinación de cada uno de los compuestos.

**Tabla 5.11.** Recuperaciones obtenidas en las muestras preparadas en el laboratorio.

		UK	CS
M 1	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	3.07	2.29
	Recuperación %	104	99.7
M 2	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	1.16	0.84
	Recuperación %	98	96

6. Determinación de citrato de sildenafil y su principal metabolito (UK-103.320) en suero mediante electroforesis capilar con preconcentración por amplificación de campo



Con el objeto de mejorar la sensibilidad alcanzada en la determinación tanto de citrato de sildenafil como de su principal metabolito en suero, se procedió al estudio de la aplicación de métodos de preconcentración en el interior del capilar como puede ser la técnica de inyección de amplificación de campo.

### ***6.1. Condiciones de operación***

En el transcurso de este estudio se utilizaron viales de dos tipos, para los electrolitos de separación y para el NaOH se utilizaron viales de vidrio de 2 mL de capacidad y para las muestras de suero viales de 200  $\mu$ L de polipropileno.

Como en el capítulo anterior, con el objetivo de mantener el nivel de electrolito constante en el vial de separación situado en el polo anódico y evitar en lo posible el efecto de sifón, se utilizaron tres viales con electrolito, uno situado en el ánodo para lavar el capilar antes de cada separación y otros dos (uno en el ánodo y otro en el cátodo) para realizar la separación.

El capilar utilizado para todo el estudio era de sílice fundida de una longitud de 60 cm (50 cm hasta el detector) y un diámetro interno de 75  $\mu$ m y estaba montado dentro de una carcasa que presentaba una ventana de detección de 800  $\times$  100  $\mu$ m. Llegado el momento de establecer los límites de detección y cuantificación, y con el fin de aumentar la sensibilidad del método, se utilizó un capilar de las mismas características que el primero en cuanto a

longitud y diámetro interno, pero con una burbuja en la celda de detección que presentaba un diámetro interno de 200  $\mu\text{m}$ . Con esta burbuja se consigue aumentar la longitud de paso óptico unas tres veces, con lo que la señal (absorbancia) aumenta considerablemente y se pueden reducir los límites de detección y cuantificación. Teniendo en cuenta la ley de Lambert Beer un aumento en la longitud de paso óptico supone un incremento de la absorbancia. Pero, en contrapartida, habrá que controlar la resolución, que disminuye, y tener en cuenta que estos capilares suponen un coste adicional.

El capilar nuevo (en principio sin burbuja) se acondicionó para activar su superficie interna con un método inicial que incluía un lavado con NaOH, otro con agua y, por último, una inyección de agua (inyección hidrodinámica, por presión) para realizar la separación a 25 kV y 25°C con tampón de separación (10 mM fosfato de pH 12.3 y SDS de concentración 30 mM).

En el método optimizado se realizaron unos lavados previos a las separaciones con el electrolito de separación. Después se llevó a cabo la inyección de un gran volumen de muestra a baja presión (hidrodinámica), a continuación se aplicó un potencial de -25 kV (inversión de polaridad) durante el tiempo necesario para que la corriente alcanzara el 95% del valor inicial y por último, se llevó a cabo la separación aplicando un potencial de 25 kV.

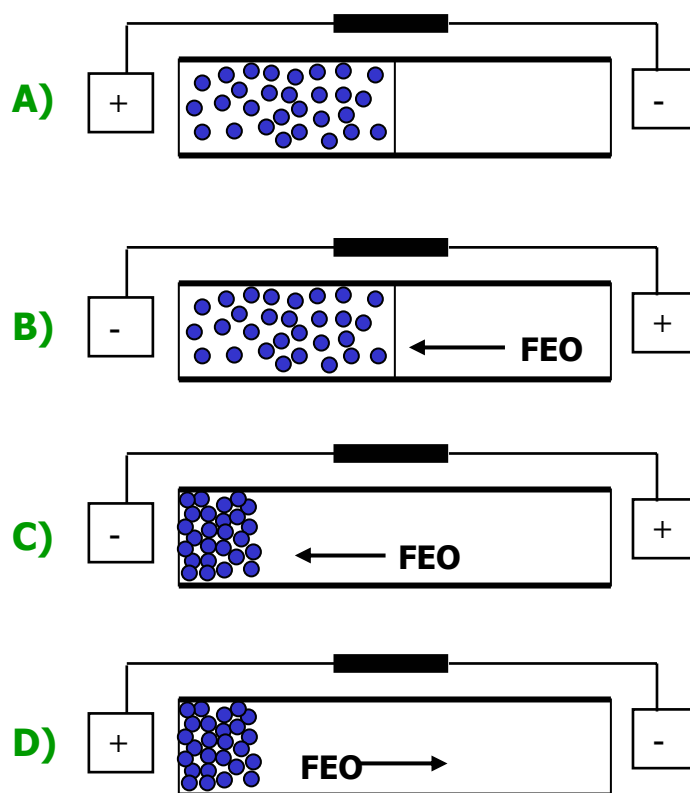
Con el objeto de rebajar los LD y LQ nos propusimos un método que permitiera la preconcentración del CS y UK dentro del capilar, esto unido a la utilización del capilar de burbuja y a procesos de extracción en fase sólida permitiría la cuantificación de los compuestos estudiados a nivel de concentración en el suero.

Debido a que los dos compuestos son aniones a pH básico utilizamos el método descrito por Burgi y Chien (179) para la preconcentración de aniones usando grandes volúmenes de inyección que pueden llegar a ser hasta el 50% de la longitud del capilar, si el analito tiene una movilidad la mitad de la del FEO. La cantidad máxima de muestra que puede ser inyectada sin pérdida de resolución viene dada por la siguiente ecuación:

$$\%L_{\max} = \frac{\mu_i}{\mu_{FEO}} \times 100$$

Esta expresión establece la relación entre la movilidad de los iones y la movilidad del flujo electroosmótico.

Supongamos que se ha inyectado por el lado anódico un gran volumen de una muestra, disuelta en un tampón diluido, formada por aniones y cationes. Si invertimos la polaridad de los electrodos después del proceso de inyección y aplicamos una diferencia de potencial entre ambos electrodos, debido a la diferencia de conductividad entre la zona de muestra y el tampón de separación, los aniones se preconcentran en la parte posterior de la zona de muestra y los cationes en la parte anterior de la zona de muestra. Al existir un FEO que impulsa al electrolito hacia el extremo catódico, los cationes y el electrolito que compone la muestra serán expulsados del capilar. Cuando todo el disolvente de la muestra sea prácticamente expulsado del capilar se vuelve a invertir la polaridad y se iniciará el proceso de separación. (Figura 6.1)



**Figura 6.1.** Preconcentración de una muestra. A) Inyección de la muestra. B) Inversión de la polaridad. C) Tiempo de preconcentración. D) Separación.

Un aspecto muy importante es saber cuando se ha expulsado el disolvente de la muestra. Esto nos permitirá conocer el momento exacto en el que se debe invertir la polaridad de los electrodos. Para ello se rellena inicialmente únicamente con el electrolito de separación y se aplica el voltaje



### Determinación de citrato de sildenafil y su metabolito

de separación durante unos minutos midiéndose la intensidad de corriente que pasa por el capilar. Posteriormente, procederemos a inyectar la muestra, invertir la polaridad y aplicar el voltaje. En cada momento iremos comparando la intensidad de corriente que pasa por el capilar con la intensidad de corriente del capilar relleno únicamente con tampón. Primeramente la corriente será inferior y posteriormente irá aumentando a medida que se elimina del capilar el disolvente de la muestra, cambiándose la polaridad cuando se alcanza una corriente del 95% con respecto al valor de referencia.

Un resumen del método de separación que se ha propuso para este estudio queda reflejado en la tabla 6.1.

<i>Tabla 6.1. Método de separación</i>					
<b>PASOS</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>VALOR</b>	<b>DURACIÓN</b>	<b>VIALES</b>	<b>RESUMEN</b>
<b>1</b>	Lavado		2 min	Electrolito 1	20 psi
<b>2</b>	Inyección		275 s	Muestra	0.5 psi
<b>3</b>	Preconcentración	-25 kV	93 s	Electrolito 2	Rampa 0.17 kV/min
<b>4</b>	Separación	25 kV	6 min	Electrolito 2	Rampa 0.30 kV/min
<b>5</b>	Autocero				
<b>6</b>	Final		6 min		

Electrolito 1: Vial de lavado en el polo anódico  
Electrolito 2: Viales de electrolito, uno en el ánodo y otro en el cátodo

En todos los casos las dos primeras inyecciones de una secuencia no se tienen en cuenta por considerar que el equipo debe equilibrarse antes de empezar a proporcionar resultados fiables.

### **6.2. Condiciones de medida**

La identificación y cuantificación del citrato de sildenafil y su principal metabolito se realizó utilizando el detector de diodos en línea en un rango de longitudes de onda de 190 a 315 nm. En todos los casos se registraron los electroferogramas tridimensionales, por lo que es posible conocer el espectro de cada pico y conocido el espectro, se podrá seleccionar la longitud de onda de máxima absorbancia que se utilizará tanto en las medidas necesarias en los estudios preliminares como en las medidas necesarias para la cuantificación. Como ya se especificó en el capítulo anterior la longitud de onda seleccionada fue de 230 nm para ambos compuestos.

### **6.3. Estudios preliminares**

El objetivo de estos estudios es encontrar aquellas condiciones que aseguren una mayor sensibilidad para la determinación de citrato de sildenafil y su principal metabolito (UK-103,320) en suero humano. En este caso se ha empleado una técnica de preconcentración por amplificación de campo, la cual nos permitirá detectar cantidades inferiores. Esta técnica se basa en el hecho de que la velocidad del ión en estudio depende linealmente del campo eléctrico del medio en el que se encuentre. En función de tal hecho se dispone la muestra en un medio de conductividad eléctrica distinta a la de la disolución electrolítica de separación. Aprovechando el fenómeno de esta diferencia de conductividad entre la muestra y el medio de separación se pueden inyectar grandes volúmenes de muestra en el interior del capilar.

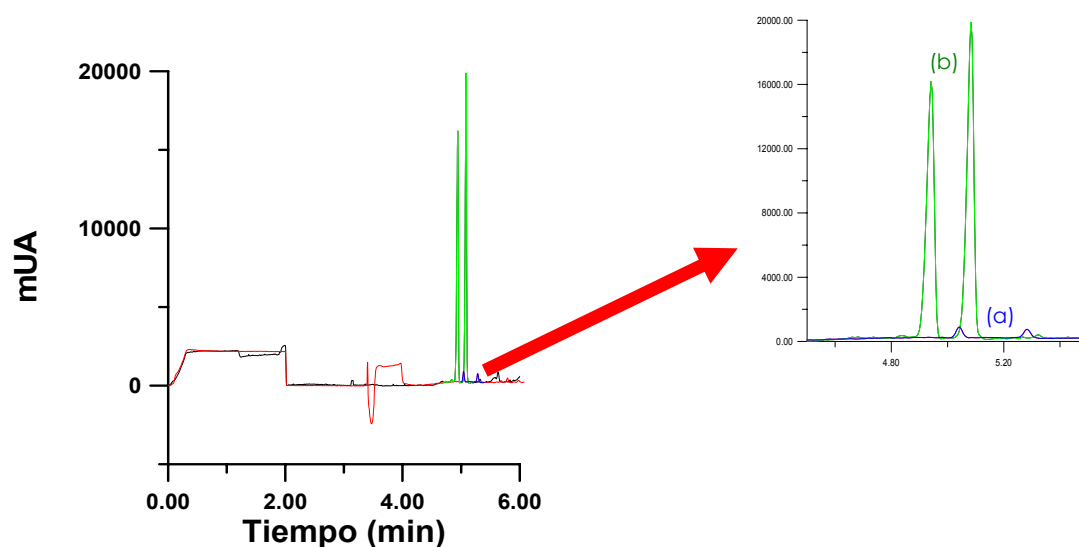
En el anterior capítulo se estudió la separación de estos dos compuestos mediante ECEM. Para ello se utilizó SDS como aditivo micelar y el tampón fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{Na}_3\text{PO}_4$ ) de pH 12.3 por las siguientes razones:

- A este pH presenta una elevada capacidad de tamponamiento ( $\text{pK}_{\text{a}3}=12.0$ ).
- Los dos compuestos adquieren carga negativa.
- Se obtuvieron buena resolución entre los picos y tiempos de análisis aceptables.

En orden a presentar una comparación visual entre los dos métodos de electroforesis capilar descritos en esta memoria para CS y UK en suero, la figura

6.2 muestra los electroferogramas obtenidos mediante el método directo y el de amplificación de campo para una muestra que contenía  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  de UK y CS en un extracto de suero. Comparando estos dos métodos de separación se puede observar como se aumentó la sensibilidad cuando se utiliza la técnica de preconcentración por amplificación de campo (la señal obtenida era hasta veinte veces mayor que en ECEM).

En los siguientes apartados se muestran como se fueron optimizando los diferentes parámetros químicos e instrumentales que influyen en el método de amplificación de campo para la determinación y cuantificación de estos dos compuestos de interés en suero.



**Figura 6.2.** Electroferogramas de una muestra que contenía  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  de UK y CS en un extracto de suero. (a) Condiciones de separación ECEM:  $10 \text{ mM}$  tampón fosfato de  $\text{pH } 12.3$  y  $25 \text{ mM SDS}$ ;  $25^\circ\text{C}$  y  $25 \text{ kV}$ , tiempo de inyección  $7 \text{ s}$ . (b) Condiciones de separación método amplificación de campo: tiempo de inyección  $275 \text{ s}$ , tiempo de polaridad reversa  $93 \text{ s}$ ,  $15 \text{ mM}$  tampón fosfato de  $\text{pH } 12.3$  y  $25 \text{ mM SDS}$ ,  $25^\circ\text{C}$  y  $25 \text{ kV}$ .

#### ***6.4. Influencia de la fuerza iónica en la muestra***

Como ya se comentó anteriormente la muestra se debe disponer en un medio de conductividad eléctrica o fuerza iónica distinta a la del tampón de separación. De esta manera, el ión migrará a una velocidad más alta hasta que sobrepase la interfase entre la matriz de la muestra y el electrolito de separación. En este momento su velocidad disminuirá porque se encuentra en un campo eléctrico de intensidad más baja. Por tanto, se puede concluir que el efecto lineal es que el analito se focaliza en una zona estrecha en la interfase. Atendiendo a este fenómeno siempre interesa inyectar a la muestra en un medio con una conductividad lo más baja posible.

Para realizar este estudio se prepararon muestras que contenían UK ( $80 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y CS ( $80 \mu\text{g L}^{-1}$ ) en un extracto de suero. Las muestras de extracto de suero fueron disueltas en diferentes concentraciones de tampón fosfato (0.5 -10 mM) las cuales contenían un 20% metanol.

Del estudio realizado se puede decir que para concentraciones mayores de 5 mM en fosfato se producía un solapamiento de los picos de los dos compuestos de interés. Una concentración de 1 mM de tampón fosfato fue seleccionada como óptima por mantener una buena resolución entre los picos.

En la siguiente tabla se muestran los tiempos de migración del FEO y de los dos compuestos así como la resolución obtenida:

*Tabla 6.2. Influencia de la fuerza iónica en la muestra*

Concentración fosfato (mM)	t <sub>m</sub> FEO (min)	t <sub>m</sub> UK (min)	t <sub>m</sub> CS (min)	Rs
0.5	3.42	4.92	5.08	3.16
1	3.45	4.93	5.09	3.17
3	3.44	4.87	5.02	2.90
5	3.43	4.85	5.01	1.80
8	3.44	4.83	4.99	1.05
10	3.45	4.80	4.97	0.98

### **6.5. Influencia de la concentración del tampón de separación**

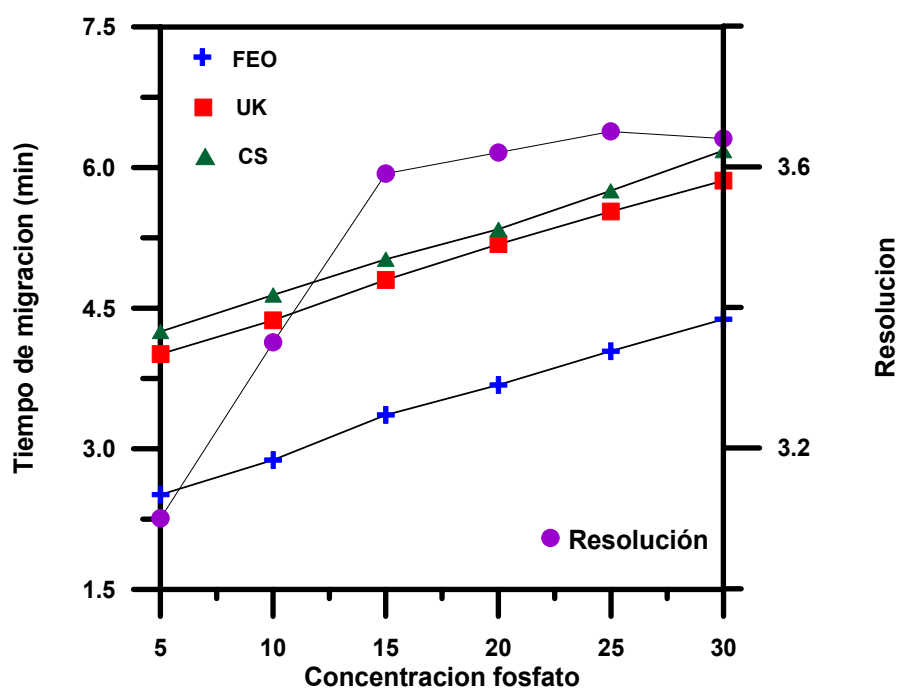
Teniendo en cuenta todos los efectos que tienen tanto las altas como las bajas concentraciones de tampón sobre el capilar y las especies que en su interior se mueven (180,181), se tendrá que seleccionar aquella concentración de tampón donde la suma de efectos positivos y negativos favorezcan a la separación.

Se ensayaron concentraciones comprendidas entre 5 y 30 mM de tampón fosfato de pH 12.3 y 25 mM de SDS. Las separaciones correspondientes

### **Determinación de citrato de sildenafil y su metabolito**

de una muestra de extracto de suero que contenía una concentración de  $80 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada uno de los compuestos, se realizaron a 25 kV y  $25^{\circ}\text{C}$  de temperatura en el capilar, manteniendo siempre una presión de 0.5 psi y 275 segundos para la inyección de la muestra.

Como cabía esperar, a medida que la concentración iba aumentando, se producía un incremento en los tiempos de migración (figura 6.3) y de la intensidad de corriente, lo cual aumentaba los tiempos de análisis manteniéndose la resolución entre los picos. Una concentración de 15 mM de tampón fosfato fue seleccionada como óptima por mantener una resolución adecuada y una corriente pequeña, lo cual consigue reducir el ruido de la línea base.



*Figura 6.3. Influencia de la concentración del tampón fosfato sobre los tiempos de migración.*

### 6.6. Influencia de la concentración de SDS

El intervalo de concentraciones de SDS analizado estuvo comprendido entre 20 y 35 mM y se pudo comprobar como el SDS apenas afectó a la



movilidad del FEO, pero afectó de una forma crítica a la resolución de los dos compuestos en estudio (Figura 6.4). Esto es debido a la hidrofobicidad y repulsiones electrostáticas que presentan los compuestos estudiados y las micelas, ya que están cargados negativamente a este valor de pH. La concentración finalmente seleccionada fue 25 mM en función de la resolución y los tiempos de análisis.

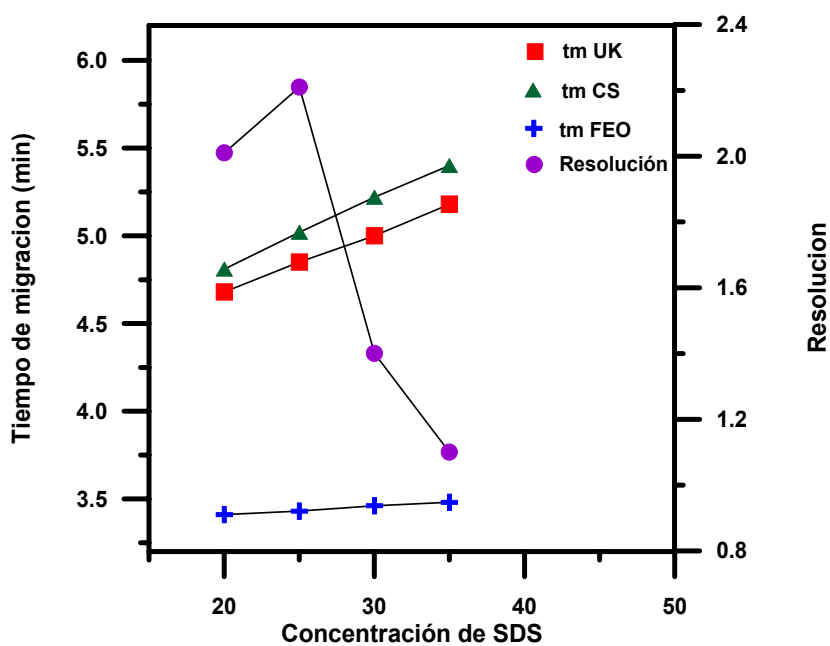


Figura 6.4. Influencia de la concentración de SDS sobre los tiempos de migración la resolución.

### ***6.7. Optimización del voltaje de separación***

Como ya se ha expuesto anteriormente, cuanto mayor sea el voltaje de separación aplicado, mayor será la eficacia obtenida y más cortos serán los tiempos de análisis aunque ello puede conllevar una disminución de la resolución, debida a la mayor producción de calor.

Para optimizar este parámetro se preparó una muestra de extracto de suero que contenía  $80 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada uno de los compuestos en estudio con una concentración 1 mM de tampón fosfato y 20% en metanol. Se realizaron separaciones variando el voltaje entre 5 y 30 kV y con los valores de intensidad de corriente se realizó la representación gráfica de la ley de Ohm (figura 6.5), en la que se pudo comprobar que existía linealidad hasta 15 kV. Con objeto de disminuir el tiempo de análisis se llegó a una situación de compromiso, eligiendo un potencial de 25 kV ya que la resolución entre los picos y el ruido de la línea base eran aceptables con una intensidad de corriente no muy elevada y tiempos de análisis aceptables.

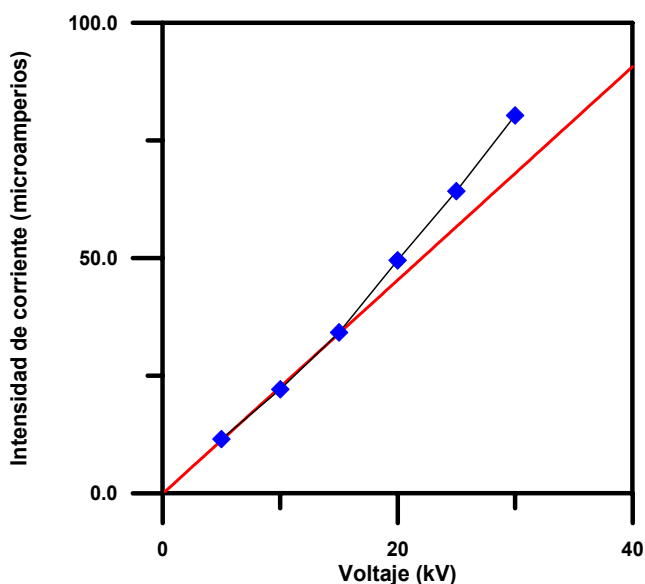


Figura 6.5. Influencia del voltaje en la corriente generada.

### ***6.8. Estudio de la influencia del voltaje y tiempo de preconcentración en la etapa de inversión de polaridad***

#### **a) Optimización del voltaje de la fase de preconcentración por inversión de la polaridad.**

Una vez optimizado el voltaje de separación realizamos la optimización del voltaje aplicado en la fase de preconcentración. Como era de esperar, a medida que el voltaje era mayor el tiempo que se aplicaba el voltaje de

preconcentración debía de ser menor (95% de la corriente máxima), esto es debido a que la velocidad electroforética de los compuestos es proporcional al voltaje aplicado (tabla 6.3). Por ello si el tiempo permanece constante los analitos serán expulsados del capilar. Aunque en algunos textos bibliográficos se recomienda trabajar en esta etapa a un voltaje inferior al de separación (163), en nuestro caso esto no fue así, seleccionando -25 kV como valor óptimo porque se consigue una separación rápida, con buena resolución y una línea base sin perturbaciones.

**Tabla 6.3.** Variación de los tiempos de expulsión, migración y resolución con el voltaje de la fase reversa.

<b>Voltaje (kV)</b>	<b>Tiempo expulsión (s)</b>	<b>t<sub>m</sub> FEO (min)</b>	<b>t<sub>m</sub> UK (min)</b>	<b>t<sub>m</sub> CS (min)</b>	<b>Rs</b>
- 5	210	3.13	4.59	4.79	1.27
- 10	105	3.30	4.75	4.92	1.71
- 15	70	3.42	4.90	5.05	1.82
- 20	52	3.47	4.96	5.11	2.72
- 25	42	3.45	4.95	5.10	3.25
- 30	35	3.44	4.91	5.07	2.58

**b) Influencia del tiempo de preconcentración en la etapa de inversión de la polaridad.**

Una vez que se ha introducido la muestra, la siguiente etapa es focalizar la muestra en una parte del capilar, es decir, realizar la preconcentración, ya que de esta manera eliminamos electrolito de la muestra.

Se denomina tiempo de preconcentración al tiempo durante el cual se puede aplicar un voltaje con la polaridad inversa sin que esto conlleve la expulsión del analito.

La optimización de este parámetro es clave ya que si es demasiado elevado puede conllevar la pérdida del analito. Para encontrar el tiempo adecuado, se propone lo siguiente: inicialmente se mide la corriente generada en el electrolito de separación utilizado ( $I_0$ ) al voltaje de separación optimizado previamente. El procedimiento de trabajo cuando se utiliza la técnica de amplificación de campo consiste en realizar la inyección de la muestra durante un tiempo lo suficientemente largo para rellenar el capilar en torno a un 50% de su longitud total. Una vez introducido el analito, se procede a aplicar un voltaje de polaridad inversa, con objeto de expulsar del interior de nuestro capilar parte de la matriz introducida (cationes y electrolito de la muestra) pero no nuestro analito de carga negativa. El tiempo de expulsión se optimiza de modo que la intensidad de corriente alcanzada llegue a un valor correspondiente al 95% de la intensidad  $I_0$ . Este sería el tiempo necesario para lograr la preconcentración sin la expulsión del analito del capilar. Por último, es necesario cambiar de nuevo la polaridad para realizar la separación de los compuestos. En nuestro caso, 93 s fue el tiempo de expulsión seleccionado teniendo presente que la inyección de la muestra se había realizado durante 275 s y con una presión de 0.5 psi.

### **6.9. Influencia del tiempo de inyección de la muestra**

El tiempo de inyección fue optimizado con el fin de mejorar los límites de detección en suero humano. Según los trabajos de Burgi y Chien (179) el tiempo máximo de inyección para un analito viene determinado por su movilidad según la expresión:

$$\%L_{\max} = \frac{\mu_i}{\mu_{FEO}} \times 100$$

Este cálculo está basado en las diferentes movilidades que presentan el analito y el FEO, así por ejemplo, si se inyectara 125 s, a una presión de 0.5 psi, se rellenaría una longitud máxima de 14.2 cm, esto representa aproximadamente el 28% de la longitud total del capilar (utilizando un capilar de 60 cm de longitud total y 75  $\mu\text{m}$  D.I.).

Sin embargo, en la práctica es más fácil rellenar la totalidad del capilar utilizando diferentes tiempos de inyección y a continuación realizar la fase de preconcentración siguiendo el procedimiento que se ha detallado en el apartado anterior. De esta forma se puede optimizar la máxima capacidad de carga que permite nuestro sistema, teniendo en cuenta que estamos trabajando con un extracto de un fluido biológico.

Para realizar esta experiencia se utilizó como electrolito de separación una disolución que contenía tampón fosfato 15 mM de pH 12.3 y SDS 25 mM. Todos los electroferogramas se registraron a 25 kV y una presión de inyección de 0.5 psi, pero a diferentes tiempos de inyección de muestra, comprendidos en el

### Determinación de citrato de sildenafil y su metabolito

intervalo de 100 a 300 s (tabla 6.4). Se eligió como tiempo óptimo de inyección 275 s en base a la resolución obtenida entre los picos y la intensidad de la señal obtenida (APC).

*Tabla 6.4. Estudio de los tiempos de inyección*

Tiempo inyección (s)	Volumen inyectado (nL)	Long. capilar rellenado (cm)	% Longitud total del capilar	UK APC	CS APC	Rs
100	500	11.3	22.7	4231	4325	1.90
150	750	17.0	34.0	7876	9264	1.94
200	1000	22.7	45.3	10346	10702	1.95
210	1050	23.8	47.6	10546	11275	1.95
250	1250	28.3	56.7	11862	12089	2.04
275	1375	31.2	62.3	13521	13982	2.06
300	1500	34.0	68.0	11797	14325	1.80

### 6.10. Condiciones químicas e instrumentales finales

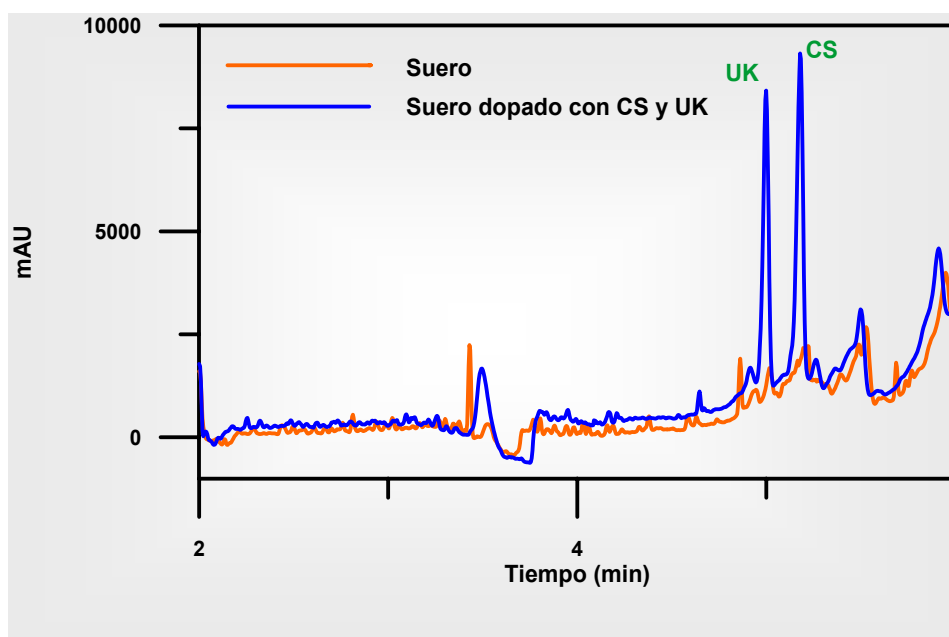
Una vez estudiada la influencia de los parámetros químicos e instrumentales característicos de la técnica se seleccionaron como valores óptimos los que se muestran en la tabla 6.4. Tales condiciones fueron utilizadas para establecer la linealidad de la respuesta frente a la concentración, la precisión del método, así como para establecer los límites de detección y cuantificación del método.

El electroferograma representado en la figura 6.6 se obtuvo bajo las condiciones finales a la longitud de onda de 230 nm (máximo de absorbancia de estos compuestos).

**Tabla 6.4. Condiciones finales**

<b>Electrolito de separación</b>	tampón fosfato 15 mM de pH 12.3 25 mM SDS
<b>Voltaje</b>	25 kV
<b>Temperatura</b>	25 °C
<b>Tiempo de inyección</b>	275 s
<b>Etapas de preconcentración</b>	-25 kV y 93 s





**Figura 6.6.** Electroferogramas de una muestra de extracto de suero libre de compuestos y una muestra que contenía  $82 \mu\text{gL}^{-1}$  de UK y CS en extracto de suero obtenidos con un electrolito compuesto por tampón fosfato 15 mM de pH 12.3 y 25 mM SDS: 25°C, 25 kV, 275s inyección 93 s expulsión.

### 6.11. Límites de detección y cuantificación

Se calcularon, como ya se describió en el capítulo anterior, en función del nivel de ruido del electroferograma. De esta, forma se inyectó una muestra de

suero (sin los compuestos de interés) sometida al mismo proceso de extracción que la muestra que iba a contener a los compuestos en estudio y que serviría de referencia para comparar el nivel de ruido del electroferograma en blanco con la señal del electroferograma obtenido después de inyectar la muestra con CS y UK. Dicha muestra contenía 81.7 y 81.3  $\mu\text{g L}^{-1}$  de CS y UK, respectivamente, en el extracto final de suero. Los límites de detección y cuantificación calculados aparecen en la tabla 6.5.

**Tabla 6.5. Límites de detección y cuantificación**

<b>Compuesto</b>	<b>LD (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>LC (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>
<b>CS</b>	17.0	56.1
<b>UK</b>	17.0	56.1

Con la intención de rebajar los límites de detección y cuantificación, se realizó el mismo tratamiento, pero esta vez con el capilar de burbuja (longitud total 60 cm, 50 cm hasta el detector, diámetro interno del capilar 75  $\mu\text{m}$  y 200  $\mu\text{m}$  de diámetro interno en la celda de detección de la burbuja). Se inyectaron las dos muestras (blanco y problema) y se volvieron a calcular los límites obteniéndose los resultados que se resumen en la tabla 6.6. Como se puede observar los límites de detección y cuantificación se redujeron a la mitad.

*Tabla 6.6. Límites de detección y cuantificación*

Compuesto	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LC ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
CS	8.0	26.4
UK	8.0	26.4

### **6.12. Calibrado y estudio estadístico**

Para evaluar la respuesta frente a la concentración se hicieron cuatro calibrados durante cuatro días consecutivos.

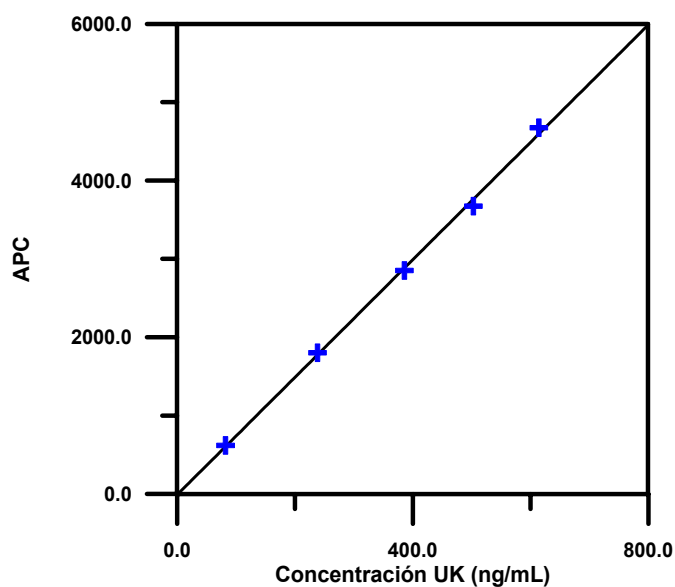
Considerando los calibrados que se efectuaron en un día, se preparó cada uno de ellos de manera aislada y con cinco valores de concentración para cada uno de los analitos, 82.0, 238.0, 386.0, 503.0 y 614.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para CS y UK.

Al igual que con los tiempos de inyección, la respuesta evaluada para el estudio del comportamiento lineal o no con la concentración fueron las APC de cada uno de los compuestos calculadas sobre los electroferogramas registrados a la longitud de onda característica de 230 nm.

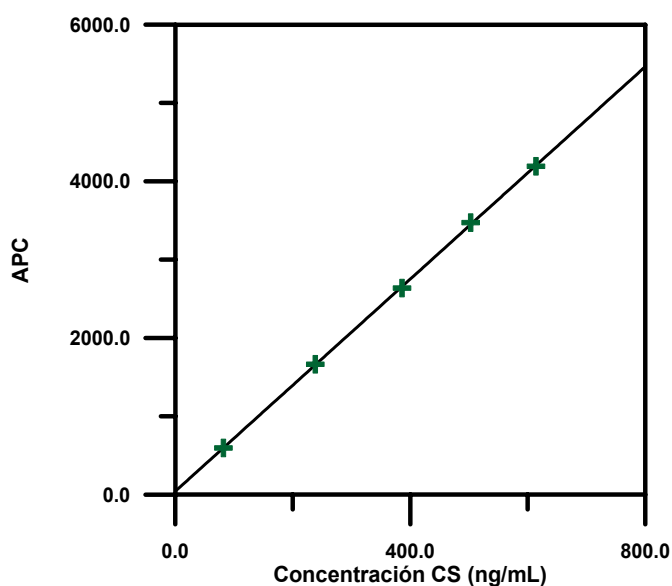
Las disoluciones patrones, al igual que el capítulo anterior, se prepararon añadiendo las cantidades necesarias de los compuestos al extracto de suero

hasta alcanzar las concentraciones deseadas. Las condiciones de operación fueron las mencionadas en la tabla 6.4 con un tiempo de inyección constante de 275 s y un tiempo de expulsión de 93 s.

En las figuras 6.7 y 6.8 se representan las áreas corregidas medidas en el máximo de absorbancia de cada de los compuestos frente a las concentraciones.



*Figura 6.7. Recta de calibrado UK*



*Figura 8. Recta de calibrado CS*

La precisión dentro de un mismo día se evaluó en base a los valores de concentración para UK y CS utilizados en el calibrado realizado el primer día. Los valores de desviación estándar relativa (DER) se muestran en la tabla 6.7 ( $\alpha = 0.05$ ) así como los valores medios de APC. Como se puede observar, las DER no son nunca superiores al 8.7, lo cual nos demuestra la precisión para analizar estos compuestos en suero humano.

Se llevó a cabo el análisis de varianza (test ANOVA) para comparar las diferentes ecuaciones de las rectas de calibrado realizadas a lo largo de cuatro días distintos. En general, como ya se dijo en el capítulo anterior es una medida

estadística de error, evaluándose éste al desglosar la variación total en sus distintas fuentes de error.

*Tabla 6.7. Valores medios DE y DER.*

	Concentración (µg/L)	Media APC	DE	DER
<b>UK</b>	82 (n=5)	619.00	53.65	8.67
	238 (n=5)	1800.75	30.16	1.67
	386 (n=5)	2850.25	62.49	2.19
	503 (n=5)	3671.75	132.74	3.62
	614 (n=5)	4674.50	254.76	5.45
<b>CS</b>	82 (n=5)	594.75	39.50	6.64
	238 (n=5)	1664.00	46.53	2.80
	386 (n=5)	2636.25	107.92	4.09
	503 (n=5)	3472.50	33.43	0.96
	614 (n=5)	4191.50	207.97	4.96

**Tabla 6.8. Rectas de calibrado para días consecutivos**

<b>UK</b>	<b>Ecuaciones</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Calibrado 1</b>	$APC = (47.31 \pm 54.68) + (6.79 \pm 0.13) C_{UK}$	0.999
<b>Calibrado 2</b>	$APC = (62.01 \pm 287.41) + (6.57 \pm 0.70) C_{UK}$	0.997
<b>Calibrado 3</b>	$APC = (177.00 \pm 344.71) + (6.43 \pm 0.84) C_{UK}$	0.995
<b>Calibrado 4</b>	$APC = (-108.00 \pm 303.94) + (7.27 \pm 0.74) C_{UK}$	0.997

<b>CS</b>	<b>Ecuaciones</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Calibrado 1</b>	$APC = (24.05 \pm 85.69) + (7.27 \pm 0.21) C_{CS}$	0.999
<b>Calibrado 2</b>	$APC = (-43.71 \pm 94.03) + (7.66 \pm 1.69) C_{CS}$	0.994
<b>Calibrado 3</b>	$APC = (122.69 \pm 193.81) + (7.01 \pm 0.47) C_{CS}$	0.999
<b>Calibrado 4</b>	$APC = (-142.35 \pm 232.49) + (8.04 \pm 0.57) C_{CS}$	0.998

La tabla 6.9 muestra el análisis de varianza para la comparación de las rectas de calibrado individuales que permiten juzgar, estadísticamente, la viabilidad de la recta de regresión. Como se puede apreciar, las variables

## Capítulo 6

---

experimentales de los estadísticos  $F_1$  y  $F_2$  son inferiores a los teóricos, deduciéndose que ninguna recta se aparta significativamente de la recta global ( $F_1$ ) y que la pendiente es representativa de todas las rectas ( $F_2$ ). Por esta razón las dos rectas de calibrado representativas para UK y CS, respectivamente pueden ser:

$$APC = (42.26 \pm 60.78) + (6.77 \pm 0.15) C_{UK}$$

$$APC = (-9.82 \pm 230.41) + (7.49 \pm 0.56) C_{CS}$$

Los valores de DER para las pendientes fueron 5.39 y 4.37% para UK y CS, respectivamente, lo cual nos confirma que la precisión de las pendientes entre días es aceptable. Los valores de DER son bastante aceptables para el análisis muestras biológicas y demuestran la robustez del método.



*Tabla 6.9. Análisis de varianza. Comparación de las rectas de regresión*

Fuente de variación	Suma de cuadrados		Grados de libertad		Media cuadrática	
	UK	CS	UK	CS	UK	CS
Desviación dentro de los calibrados	80.13	181.7	12	12	6.678	15.14
Diferencias entre los coeficientes de regresión	65.11	108.7	3	3	21.70	36.24
Desviaciones entre los calibrados individuales	73.39	155.4	6	6	12.23	25.90
Desviación total sobre el calibrado global	153.5	337.1	18	18	8.529	18.73

	$F_{1(\text{exp})}$	$F_{1(\text{teor})}$	$F_{2(\text{exp})}$	$F_{2(\text{teor})}$
UK	1.83	3.00	3.25	3.49
CS	1.71	3.00	2.39	3.49

### **6.13. Aplicaciones**

El método propuesto se aplicó a la cuantificación de los compuestos en estudio en muestras preparadas en el laboratorio por triplicado, con distintas relaciones entre sus concentraciones, todas ellas, naturalmente, dentro del intervalo de linealidad encontrado. En todo momento los porcentajes de recuperación fueron calculados con respecto a una muestra patrón.

Al igual que en el capítulo anterior, se utilizaron para cuantificar las APC a 230 nm con un tiempo de inyección de 275 s y de expulsión de 93 s en las condiciones finales. Se realizaron las separaciones y se registraron los electroferogramas para su posterior análisis.

En la tabla 6.10 se muestran las recuperaciones obtenidas de las muestras sintéticas preparadas en el laboratorio. Estas recuperaciones son la media de tres valores ya que cada muestra se preparó por triplicado. Como se puede ver, todas las recuperaciones estuvieron próximas al 100%, dentro de la precisión que se espera para la determinación de cada uno de los compuestos.

**Determinación de citrato de sildenafil y su metabolito**

*Tabla 6.10. Recuperaciones obtenidas en las muestras preparadas en el laboratorio*

		<b>UK</b>	<b>CS</b>
<b>M 1</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	160	457
	<b>Recuperación %</b>	92	100
<b>M 2</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	153	152
	<b>Recuperación %</b>	99	96
<b>M 3</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	604	213
	<b>Recuperación %</b>	100	92

7. Determinación de citrato de sildenafil y su principal metabolito (UK-103.320) en suero mediante técnicas electroquímicas en muestras de suero y orina

## **Determinación de citrato de sildenafil y su metabolito**

El estudio que propone este capítulo se ha realizado con la finalidad de establecer métodos electroquímicos, que permitan la determinación cuantitativa total de citrato de sildenafil y su principal metabolito (UK-103,320) en fluidos biológicos por técnicas electroquímicas, tales como:

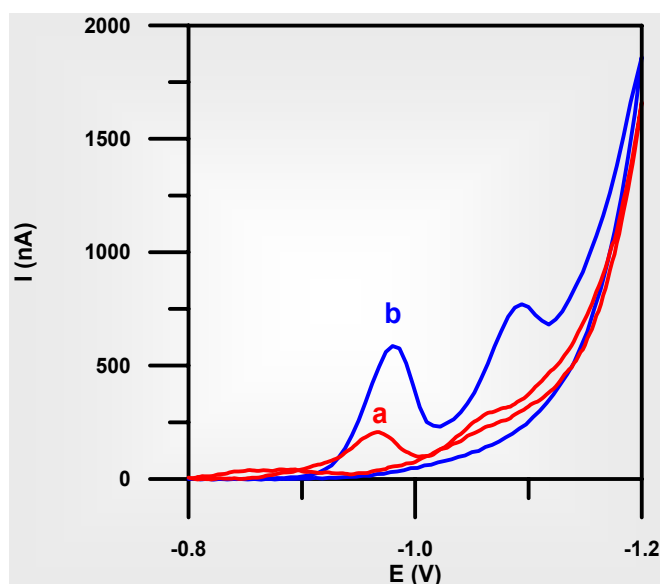
- Voltamperometría cíclica
- Voltamperometría de redisolución por diferencial de pulso
- Voltamperometría de redisolución por onda cuadrada

El planteamiento experimental de este capítulo se ha organizado de la siguiente manera: en primer lugar se realizaron estudios preliminares para seleccionar la técnica electroquímica más adecuada para el estudio. A continuación se estudiaron tanto los parámetros químicos como instrumentales propios de la técnica seleccionada, finalizando con la aplicación del método propuesto a la determinación conjunta de citrato de sildenafil y su principal metabolito (UK-103,320) en fluidos biológicos, tales como el suero y la orina.

### ***7.1. Estudio de UK-103,320 por voltamperometría cíclica.***

Con objeto de estudiar la reversibilidad del proceso electroquímico se aplicó la técnica de voltamperometría cíclica, la cual nos permite conocer la naturaleza de los procesos de oxido-reducción de UK-103,320 (UK). Para ello se preparó una muestra de concentración  $5.70 \times 10^{-6}$  M de UK en  $\text{HClO}_4$  0.010 M registrándose los ciclovoltamperogramas a una velocidad de barrido de 60 mV/s después de desairear la muestra pasando  $\text{N}_2$  de alta pureza durante 10 minutos. La fisonomía del ciclovoltamperograma obtenido se muestra en la figura 7.1, donde se puede observar un único pico de reducción a  $-0.940$  V frente al electrodo de referencia Ag/AgCl que se utilizará en todo momento, cuando el tiempo de acumulación utilizado fue de 0 s. Sin embargo, cuando ese tiempo de acumulación se aumentó a 10 s, se observaron dos picos de reducción a los potenciales de  $-0.940$  y  $-1.032$  V. Se puede apreciar asimismo, que este proceso catódico no se corresponde con ningún proceso de oxidación cuando se realiza el barrido inverso hacia potenciales positivos, lo que indica su irreversibilidad.

Con el fin de comprobar si el proceso estaba controlado por adsorción o difusión se llevaron a cabo las experiencias que se muestran a continuación.



**Figura 7.1.** Ciclovoltamperogramas de  $5.70 \times 10^{-6}$  M de UK en  $\text{HClO}_4$ . Tiempos de acumulación: (a) 0 s; (b) 10s.

• **Variación de la intensidad de pico con la velocidad de barrido**

En este estudio se preparó una muestra de 10 mL de una disolución de  $5.70 \times 10^{-6}$  M de UK en  $\text{HClO}_4$  0.010 M registrándose los ciclovoltamperogramas entre -0.80 y -1.25 V a las velocidades de barrido comprendidas entre 5 y 200 mV/s, después de desairear la muestra haciendo burbujear durante 10 minutos  $\text{N}_2$  de alta pureza.

En la tabla 7.1 se muestran los valores de intensidad de pico ( $I_p$ ) para las distintas velocidades de barrido ( $V_b$ ) a las que se registraron los ciclovoltamperogramas. En la figura 7.2 se observa la representación gráfica de  $I_p$  frente a  $V_b$  para el pico de reducción correspondiente al potencial de  $-0.940$  V.

**Tabla 7.1.** Variación de  $I_p$  con la velocidad de barrido

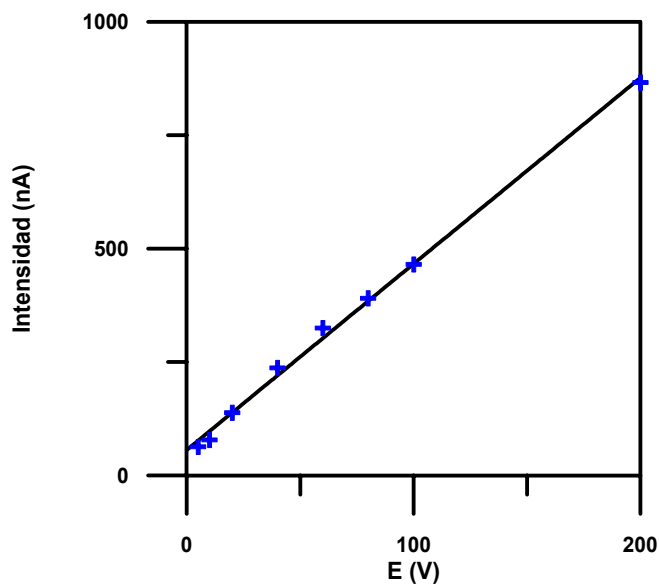
$V_b$ (mV/s)	$I_p$ (nA)
5	63.07
10	77.91
20	138.1
40	236.7
60	340.1
80	390.7
100	431.2
200	816.5

Como se puede observar en la figura 7.2 existe una relación lineal entre la  $I_p$  y  $V_b$  en todo el intervalo estudiado, lo cual nos indica que el proceso está controlado por la adsorción, siendo la ecuación que relaciona la intensidad de



pico con la velocidad de barrido de UK sobre el electrodo de trabajo la siguiente:

$$I_p = (50.01 \pm 0.07) + (3.91 \pm 24.59) V_b \quad r^2 = 0.997 \quad (n=8)$$



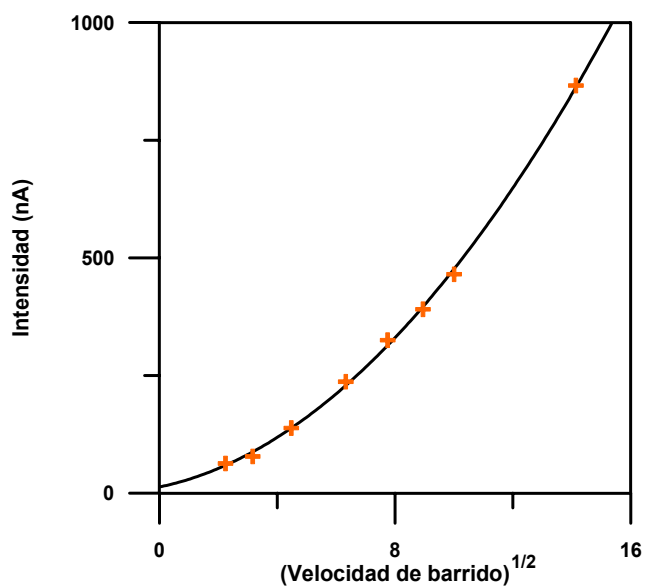
**Figura 7.2.** Representación  $I_p$  frente a la velocidad de barrido para el proceso de reducción de UK.

➤ **Variación de la intensidad de pico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido**

Dicha relación ( $I_P$  frente  $V_b^{1/2}$ ) se llevó a cabo a partir de los datos obtenidos en el apartado anterior. En la tabla 7.2 se muestran los valores correspondientes a la intensidad de pico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para esos mismos datos.

*Tabla 7.2. Variación de  $I_P$  con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido*

$V_b^{1/2}$ (mV/s) <sup>1/2</sup>	$I_P$ (nA)
2.24	63.07
3.16	77.91
4.47	138.1
6.32	236.7
7.75	340.1
8.94	390.7
10.00	431.2
14.14	816.5



**Figura 7.3.** Representación gráfica de intensidad de pico frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Como se puede apreciar en la figura 7.3 no existe linealidad entre  $I_p$  y  $V_b^{1/2}$ , lo que indica que el proceso no está controlado exclusivamente por la difusión del compuesto UK a la superficie electródica, existiendo una componente de adsorción considerable en el mecanismo de transporte y reducción de dicho compuesto.

## ***7.2. Estudios preliminares. Selección de la técnica instrumental.***

El objetivo de estos estudios es encontrar aquella técnica analítica que asegure una elevada sensibilidad en las determinaciones de los compuestos en estudio, ya que nuestro objetivo último es la aplicación de su análisis en muestras biológicas.

En primer lugar se procedió al estudio del comportamiento electroquímico del metabolito UK-103,320 (UK) sobre el electrodo estacionario de mercurio (HMDE) utilizando como técnica electroquímica, como en el capítulo anterior, la voltamperometría de redisolución por diferencial de pulso (DPS).

Para realizar este estudio se preparó una muestra de 10 mL de una disolución de  $2.10 \times 10^{-7}$  M de UK en  $\text{HClO}_4$  0.010 M registrándose su voltamperograma entre  $-0.80$  y  $-1.25$  V a una velocidad de barrido de 10 mV/s y aplicando un pulso de 40 mV, después de desairear la muestra pasando  $\text{N}_2$  de alta pureza durante 10 minutos. En la figura 7.4, se muestra el voltamperograma obtenido, en el cual se puede apreciar un pico de reducción a un potencial de  $-0.840$  V. Se realizó un segundo voltamperograma pero en este caso utilizando 10 s de acumulación, para comprobar la naturaleza acumulativa del proceso de reducción de dicho compuesto. El voltamperograma se muestra en la figura 7.4, donde se puede observar que en estas condiciones aparecen dos picos de reducción a los potenciales de  $-0.840$  y  $-0.912$  V, respectivamente. En la tabla 7.3, se puede apreciar como esas intensidades de pico aumentan con el tiempo de acumulación.

Con el fin de comparar esta técnica con la voltamperometría de redisolución por onda cuadrada (SWS), se preparó una muestra en las mismas condiciones que la anterior, registrándose, su voltamperograma entre  $-0.80$  y  $-1.25$  V a una velocidad de barrido de  $1200$  mV/s (frecuencia  $120$  Hz e incremento de scan  $10$  mV) y un tiempo de acumulación de  $0$  segundos. También se realizó un segundo voltamperograma utilizando  $10$  segundos de acumulación. Los voltamperogramas se muestran en la figura 7.4, en la que se puede observar un único pico de reducción, tanto para  $0$  s como para  $10$  s de acumulación, a un potencial de  $-0.950$  V. En la tabla 7.3, se puede apreciar como la intensidad de pico aumenta nuevamente con el tiempo de acumulación.

Por tanto, este estudio pone de manifiesto el comportamiento electroquímico del metabolito UK sobre el HMDE además de la naturaleza acumulativa del proceso de reducción del compuesto. También se comprobó que, de entre las técnicas acumulativas ensayadas, DPS y SWS, fue esta última la considerada como más adecuada para proponer la determinación del compuesto, ya que era la que proporcionaba mayor sensibilidad al aplicar tiempos de acumulación semejantes, hecho que nos ofrecía la posibilidad de cuantificar pequeñas cantidades de este compuesto.

Tabla 7.3. Técnicas electroquímicas. Variación de la intensidad

TÉCNICA	$I_p$ (nA)	
	$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 10 s
DPS	13	60
SWS	316	943

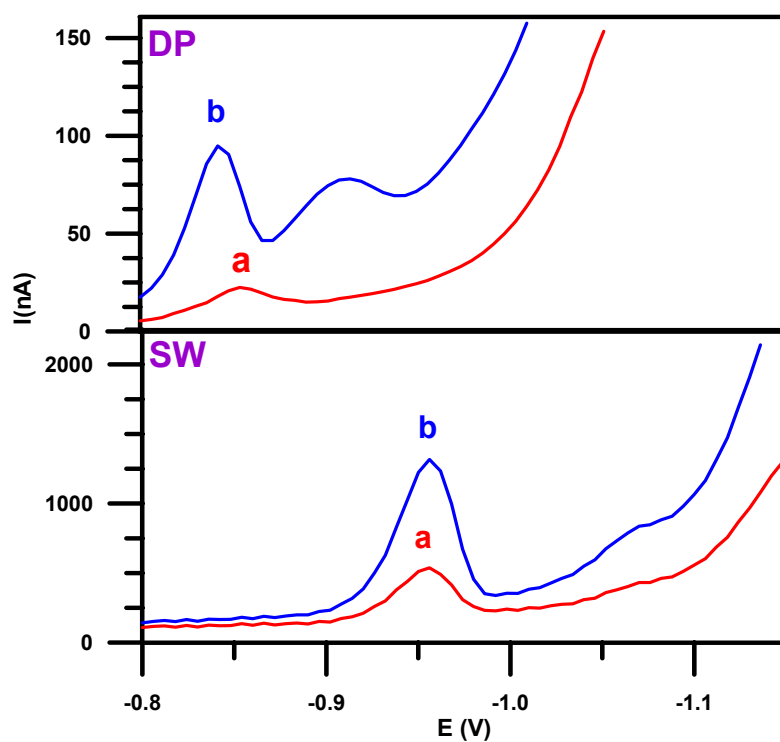


Figura 7.4. Voltamperogramas de reducción por DP y SW a diferentes tiempos de acumulación. (a) 0 s; (b) 10 s.

### ***7.3. Optimización del proceso redox mediante voltamperometría de redisolución adsortiva por onda cuadrada.***

Una vez seleccionada la técnica de voltamperometría de redisolución adsortiva por onda cuadrada, se procedió a desarrollar inicialmente un estudio sobre la influencia del pH y posteriormente la optimización de los parámetros instrumentales propios de la técnica a aplicar, como son, tiempo de acumulación, potencial de acumulación, frecuencia, etc.

#### ***7.3.1. Influencia del pH***

En este apartado estudiaremos la influencia del pH sobre los voltamperogramas realizados sobre una disolución de  $5.0 \times 10^{-8}$  M de UK a la que se le fue variado el pH en el rango comprendido entre 1.0 y 5.0. Para esta experiencia se utilizaron, como en el capítulo anterior,  $\text{HClO}_4$ , para pH 1.0 y 2.0 y el tampón  $\text{HAc}/\text{NaAc}$  para el resto.

La experiencia fue realizada a temperatura ambiente y se registró un voltamperograma por cada unidad de pH. Los voltamperogramas fueron registrados entre  $-0.80$  y  $-1.25$  V. En la tabla 7.4 se resumen los valores de  $I_P$  y  $E_P$  obtenidos en cada voltamperograma al llevar a cabo el estudio de la influencia del pH.

*Tabla 7.4. Variación de la  $I_p$  con el pH.*

pH	E (V)	$I_p$ (nA)	
		$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 10 s
1.0	- 0.930	40.2	110
2.0	- 0.950	40.0	121
3.0	- 0.960	32.0	97.9
4.0	- 0.975	20.2	95.4
5.0	- 0.985	19.8	89.7

Como se puede observar en la tabla 7.4 la intensidad de pico disminuye al aumentar el valor de pH, además el potencial de reducción se desplaza ligeramente hacia potenciales más negativos. Este hecho puede poner de manifiesto que un aumento en la concentración de los protones en el medio favorece o bien el proceso de reducción del grupo sulfónico del anillo de piperazina a grupo sulfóxido (Figura 7.5) o bien la reducción del grupo carbonilo a grupo alcohol (Figura 7.6).

Se seleccionó como valor óptimo un pH de 2.0 para llevar a cabo el estudio de la reducción de este compuesto.



## Determinación de citrato de sildenafilo y su metabolito

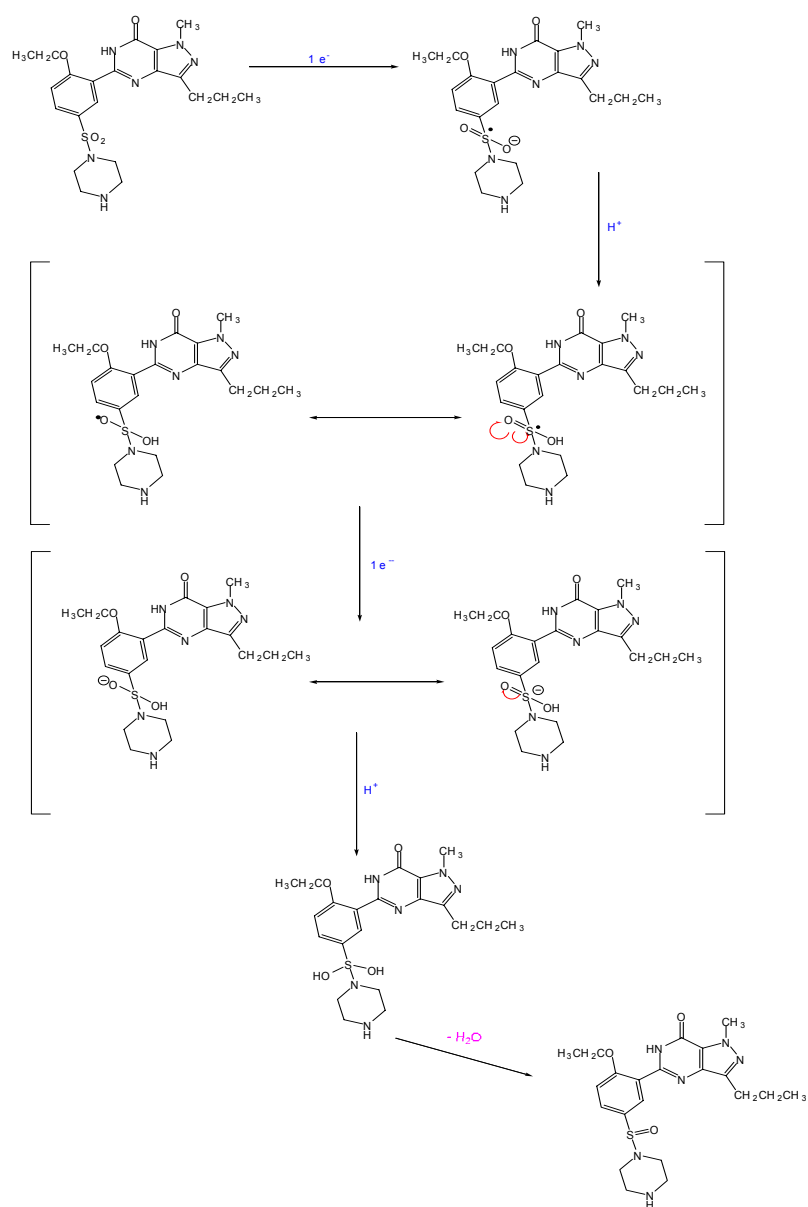


Figura 7.5. Mecanismo de reducción de UK-103,320.

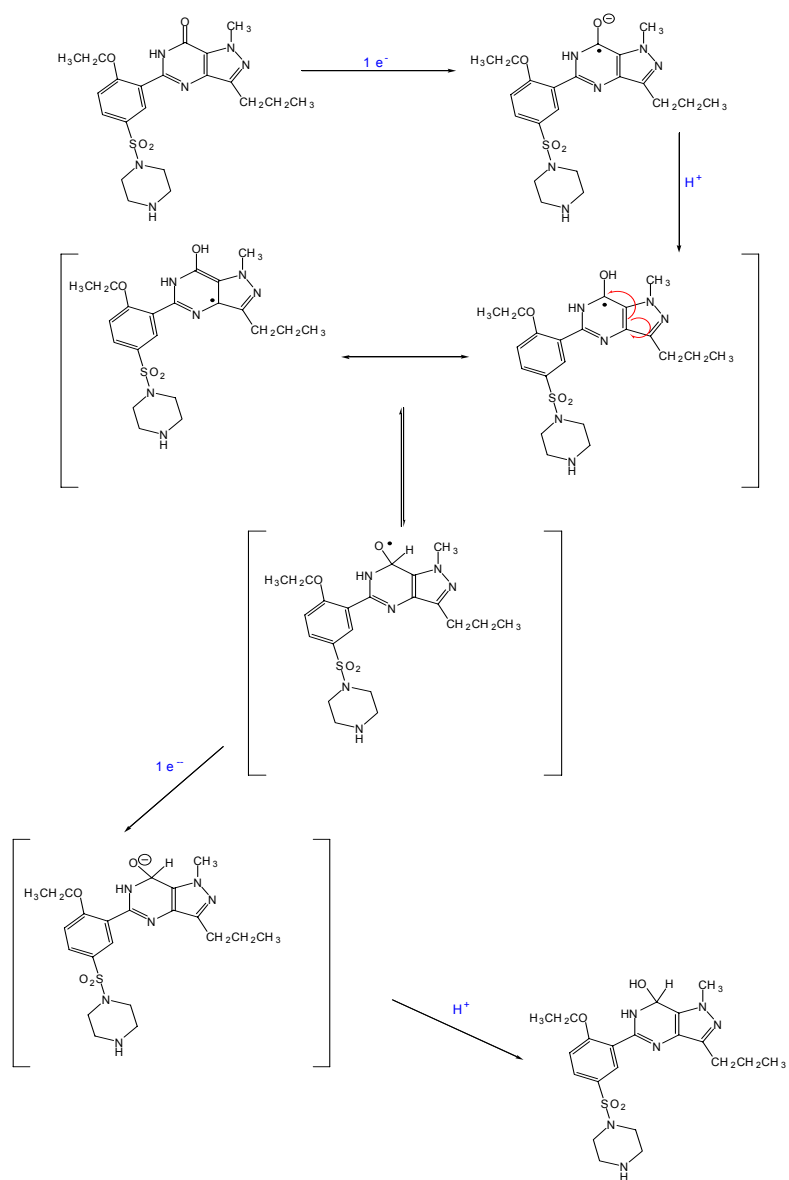


Figura 7.6. Mecanismo de reducción de UK-103,320.

### 7.3.2. Influencia de la fuerza iónica.

La fuerza iónica de la disolución condiciona la respuesta del proceso de reducción, debido a ello se realizó la siguiente experiencia.

El estudio se realizó sobre una disolución de  $5.0 \times 10^{-8}$  M de UK. En estas condiciones se fue variando la fuerza iónica del medio mediante la adición de pequeñas cantidades de  $\text{NaClO}_4$  de concentraciones variables, de tal manera que el error por dilución resultara despreciable. Los voltamperogramas fueron registrados entre  $-0.80$  y  $-1.25$  V. En la tabla 7.5 se resumen los valores de  $I_P$  y  $E_P$  obtenidos en cada voltamperograma al llevar a cabo el estudio de la influencia de la fuerza iónica.

Tabla 7.5. Variación de la  $I_P$  con la fuerza iónica

NaClO <sub>4</sub> (mM)	Concentración total (mM)*	E (V)	I <sub>P</sub> (nA)	
			t <sub>ac</sub> 0 s	t <sub>ac</sub> 10 s
0	10	- 0.950	40.5	109.5
20	30	- 0.950	36.2	98.4
30	40	- 0.950	34.8	92.3
40	50	- 0.950	33.1	90.4
50	60	- 0.950	31.5	89.4

(\*) Suma de la concentración del HClO<sub>4</sub> y NaClO<sub>4</sub>

El aumento de la concentración de  $\text{NaClO}_4$  produjo, tal y como se observa en la tabla 7.5, una disminución de  $I_p$ , debido a que el proceso de adsorción del compuesto y su desplazamiento al electrodo se hace menos efectivo. Debido a este comportamiento no se adicionó  $\text{NaClO}_4$  como electrolito de fondo para los posteriores estudios.

### ***7.3.3. Optimización de los parámetros instrumentales***

Una vez establecidas las condiciones químicas para llevar a cabo el estudio electroquímico de este compuesto se procedió a estudiar la influencia de los parámetros instrumentales propios de la técnica empleada sobre los voltamperogramas de UK-103,320.

#### ***a. Influencia del tiempo de acumulación.***

Para la realización de este estudio se preparó 10 mL de una disolución de UK de concentración  $1.0 \times 10^{-7}$  M, 0.010 M de  $\text{HClO}_4$  (pH 2.0), en las condiciones inertes mencionadas anteriormente, y se registraron los voltamperogramas entre  $-0.80$  y  $-1.25$  V, utilizando para ello las siguientes condiciones: potencial de acumulación ( $E_{ac}$ )  $-0.80$  V, incremento de scan ( $\Delta s$ ) 6 mV, frecuencia 120 Hz,

### **Determinación de citrato de sildenafil y su metabolito**

---

área del electrodo grande ( $0.025 \text{ cm}^2$ ) y tiempos de acumulación comprendidos entre 0 y 120 segundos.

En la tabla 7.6 se resumen los valores de  $I_p$  y de  $E_p$  para el proceso de reducción de UK. La figura 7.7 muestra la representación gráfica de  $I_p$  frente al tiempo de acumulación, en la cual se puede apreciar que existe una relación lineal hasta 75 segundos de acumulación, debido que a tiempos superiores se produce una saturación del área del electrodo por las moléculas de nuestro analito.

Se seleccionó 10 segundos de acumulación para llevar a cabo todas las experiencias posteriores con el objeto de proponer un método de suficiente rapidez y una sensibilidad aceptable, ya que la señal de respuesta es más de dos veces mayor con respecto 0 segundos de acumulación.

*Tabla 7.6. Variación de la  $I_P$  con el tiempo de acumulación*

$t_{ac}$ (s)	E (V)	$I_P$ (nA)
0	-0.950	149
5	-0.950	261
10	-0.950	394
15	-0.950	551
20	-0.950	644
25	-0.950	751
30	-0.950	846
40	-0.950	1073
50	-0.950	1405
60	-0.950	1529
75	-0.950	1971
90	-0.950	2131
120	-0.950	2723

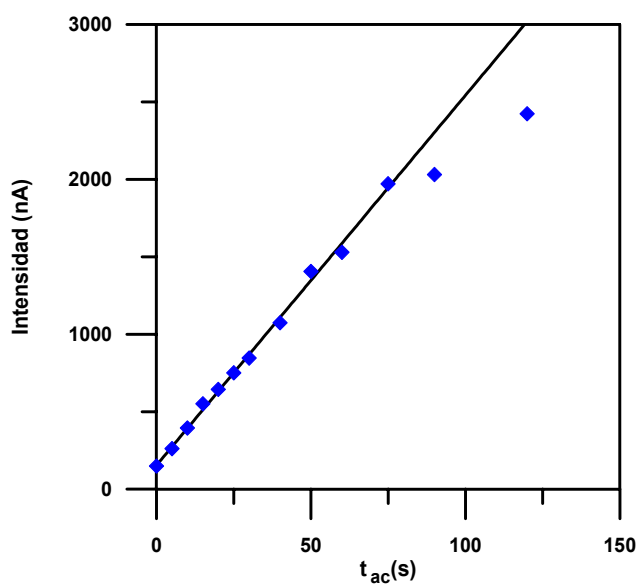


Figura 7.7. Representación gráfica de la  $I_p$  frente al  $t_{ac}$ .

### b. Influencia del potencial de acumulación

Se prepararon 10 mL de una disolución de  $1.0 \times 10^{-7}$  M de UK, 0.010 M  $\text{HClO}_4$ , (pH 2.0) en las condiciones inertes mencionadas y se registraron los voltamperogramas variando el potencial entre  $-0.30$  y  $-0.90$  V, utilizando las mismas condiciones instrumentales expuestas en el apartado anterior y con un  $t_{ac}$  de 0 y 10 s.

En la tabla 7.7 se muestran los valores de las intensidades y los potenciales de pico para los distintos valores del potencial de acumulación. Como se puede

observar hay un ligero aumento de la intensidad de la señal al variar el potencial de acumulación. Se tomó como valor óptimo un potencial de acumulación de  $-0.80$  V que se mantendrá fijo para el resto de las experiencias.

**Tabla 7.7.** Variación de  $I_p$  con el  $E_{ac}$

$E_{ac}$ (V)	$E_p$ (V)	$I_p$ (nA)	
		$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 10 s
- 0.30	- 0.950	96	333
- 0.40	- 0.950	110	345
- 0.50	- 0.950	116	359
- 0.60	- 0.950	125	368
- 0.70	- 0.950	138	375
- 0.80	- 0.950	150	395
- 0.90	- 0.950	147	390

**c. Influencia de la frecuencia**

Sobre una muestra de las características ya mencionadas, se registraron los voltamperogramas entre  $-0.80$  y  $-1.25$  V en las condiciones instrumentales expuestas en los apartados anteriores y variando la frecuencia entre 25 y 120 Hz.



### Determinación de citrato de sildenafil y su metabolito

El análisis de los voltamperogramas obtenidos nos llevó a elaborar la tabla 7.8 donde se aprecia la variación de  $I_p$  con la frecuencia aplicada para el proceso de reducción.

Las ecuaciones siguientes muestran la relación lineal que existe entre la intensidad de pico y la frecuencia:

$$t_{ac} = 0 \text{ s}$$

$$I_p = (-21.99 \pm 14.49) + (1.53 \pm 0.18) f \quad r^2 = 0.9959$$

$$t_{ac} = 10 \text{ s}$$

$$I_p = (-53.16 \pm 46.08) + (3.92 \pm 0.56) f \quad r^2 = 0.9938$$

**Tabla 7.8.** Variación de  $I_p$  con la frecuencia

Frecuencia (Hz)	$V_b$ (mV/s)	$E_p$ (V)	$I_p$ (nA)	
			$t_{ac} 0 \text{ s}$	$t_{ac} 10 \text{ s}$
25	150	-0.970	20	53
50	300	-0.960	49	129
75	450	-0.960	92	238
100	600	-0.950	134	354
120	720	-0.950	161	410

Como se puede apreciar en la tabla 7.8, la  $I_p$  aumenta de forma proporcional con la frecuencia, debido a que se produce un aumento de la velocidad de barrido. Por tanto, se seleccionó como óptimo un valor de frecuencia de 120 Hz ya que producía la máxima sensibilidad y además en un tiempo muy corto de barrido.

### ***d. Influencia del incremento de scan***

Se preparó una muestra de las características ya mencionadas y se registraron los voltamperogramas entre  $-0.80$  y  $-1.25$  V en las condiciones instrumentales expuestas anteriormente variando los valores de incremento de scan ( $\Delta s$ ) entre 2 y 10 mV.

En la tabla 7.9 se muestran los valores de intensidad y potencial de pico del proceso de reducción al variar el valor de  $\Delta s$ , como se puede observar hay un aumento de la intensidad de la señal al aumentar el valor  $\Delta s$  desde 2 a 6 mV, mientras que para valores superiores se produce incluso una disminución de la intensidad. Esto es debido a que el  $\Delta s$  influye en la velocidad de barrido y a su vez condiciona al número de puntos con los que se define el pico de reducción, por eso, en este caso un elevado  $\Delta s$  proporciona una mala definición del pico produciéndose una disminución en la intensidad de pico. Por tanto, se seleccionó como valor óptimo 6 mV, el cual se mantuvo fijo para el resto de las experiencias, ya que proporcionaba una sensibilidad adecuada.

**Tabla 7.9. Variación de  $I_p$  con el  $\Delta s$**

$\Delta s$ (mV)	$V_b$ (mV/s)	$E_p$ (V)	$I_p$ (nA)	
			$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 10 s
<b>2</b>	300	-0.970	108	365
<b>4</b>	480	-0.960	125	392
<b>6</b>	720	-0.960	158	408
<b>8</b>	960	-0.950	145	400
<b>10</b>	1200	-0.950	137	388

***e. Influencia de la magnitud del pulso aplicado***

La magnitud del pulso aplicado está relacionado con la resolución de pico, de ahí que debamos realizar un estudio de la influencia de este parámetro.

Para esta experiencia se preparó nuevamente una muestra de las características mencionadas anteriormente. Los voltamperogramas de esta experiencia fueron obtenidos por registros sucesivos en las condiciones instrumentales ya especificadas y con valores de pulso aplicado ( $\Delta E$ ) comprendidos entre 10 y 60 mV.

El análisis de los voltamperogramas obtenidos nos condujo a elaborar la tabla 7.10 donde aparecen los valores de  $I_p$  y  $E_p$  para esta experiencia con

respecto a la variación del parámetro en estudio. Como se puede observar hay una pequeña variación de  $E_p$ , según aumenta el pulso aplicado, hacia potenciales más negativos, produciéndose al mismo tiempo un aumento de la intensidad de la señal al aumentar el pulso desde 10 a 40 mV. Se tomó como valor óptimo un valor de 40 mV para llevar a cabo el estudio, debido a que para valores superiores se produce un disminución de la señal además de un ensanchamiento del pico de reducción.

**Tabla 7.10.** Variación de  $I_p$  con el  $\Delta E$

$\Delta E$ (mV)	$E_p$ (V)	$I_p$ (nA)	
		$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 10 s
10	-0.950	104	324
20	-0.950	122	350
30	-0.950	134	387
40	-0.950	155	402
50	-0.960	143	400
60	-0.975	140	394

**f. Influencia del área del electrodo de trabajo.**

Con el fin de optimizar este último parámetro se preparó una disolución de UK de las características mencionadas anteriormente. Los voltamperogramas correspondientes a esta experiencia se registraron entre  $-0.80$  y  $-1.25$  V en las condiciones instrumentales optimizadas y tomando el tamaño de área del electrodo los siguientes valores: pequeño, medio y grande.

En la tabla 7.11 se muestran los valores de  $I_P$  y  $E_P$  procedentes del análisis de los voltamperogramas obtenidos en esta experiencia, en dicha tabla se puede observar como la máxima  $I_P$  se consigue mediante la utilización del tamaño grande del área del electrodo, escogiéndose por tanto el mismo como óptimo.

**Tabla 7.11.** Variación de  $I_P$  y  $E_P$  con el tamaño del área del electrodo

Tamaño Área(cm <sup>2</sup> )	$E_P$ (V)	$I_P$ (nA)	
		$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 10 s
Pequeño (0.010)	- 0.950	86	218
Mediano (0.016)	- 0.950	123	329
Grande (0.025)	- 0.950	156	410

***g. Condiciones químicas e instrumentales finales***

La realización de los estudios anteriores condujo al establecimiento de unas condiciones experimentales (tabla 7.12) que son las encontradas como óptimas para realizar la determinación de este compuesto.

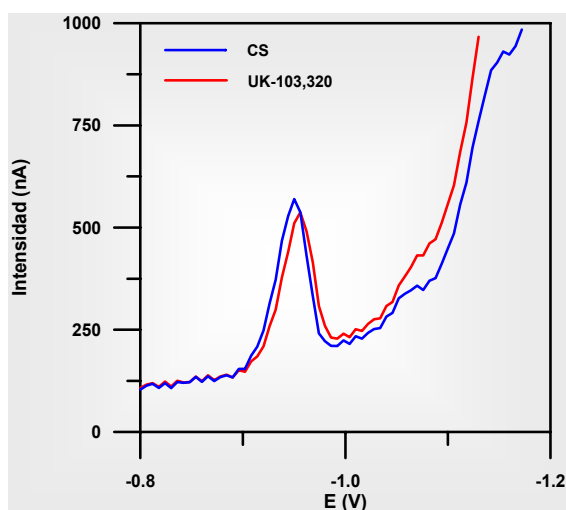
***Tabla 7.12. Condiciones finales***

<b>pH del medio</b>	2.0
<b>Fuerza iónica</b>	0.010 mM, HClO <sub>4</sub>
<b><math>t_{ac}</math></b>	0 y 10 s
<b><math>E_{ac}</math></b>	-0.80 V
<b><math>\Delta s</math></b>	6 mV
<b><math>\Delta E</math></b>	40 mV
<b>Frecuencia</b>	120 Hz
<b>Tamaño del área</b>	Grande (0.025 cm <sup>2</sup> )

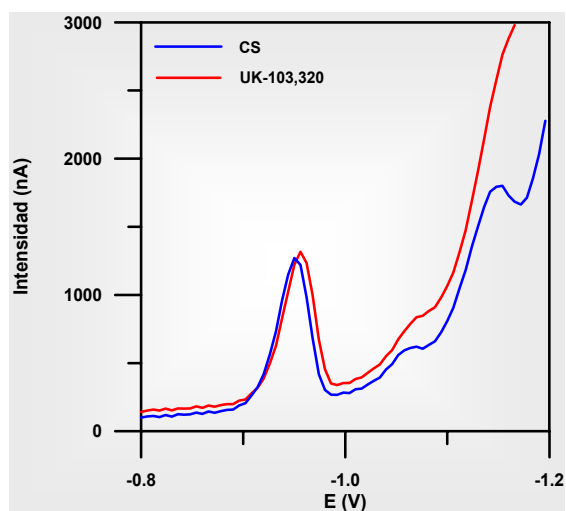
***7.3.4. Determinación de Citrato de Sildenafil y UK-103,320 en suero humano***

El estudio realizado por Berzas y col. puso de manifiesto el comportamiento electroquímico del CS utilizando las técnicas de voltamperometría diferencial de pulso, voltamperometría de onda cuadrada y ciclo voltamperometría (29). En este trabajo, se propusieron técnicas voltamperométricas por onda cuadrada para la determinación de CS en productos farmacéuticos.

El principal metabolito de citrato de sildenafil (CS), UK-103,320 (UK), difiere solo estructuralmente en la pérdida de un metilo en el anillo de piperazina con respecto al compuesto del que procede. Debido a esto pudimos comprobar que estos dos compuestos presentaban el mismo proceso de reducción en las condiciones químicas e instrumentales seleccionadas anteriormente, como se puede apreciar en las figuras 7.8 y 7.9.



**Figura 7.8.** Voltamperogramas de citrato de sildenafil y UK-103,320 de concentraciones  $2.2 \times 10^{-7}$  y  $2.1 \times 10^{-7}$  M, respectivamente, para tiempo de acumulación 0 s.



**Figura 7.9.** Voltamperogramas de citrato de sildenafil y UK-103,320 de concentraciones  $2.2 \times 10^{-7}$  y  $2.1 \times 10^{-7}$  M, respectivamente, para tiempo de acumulación 10 s.



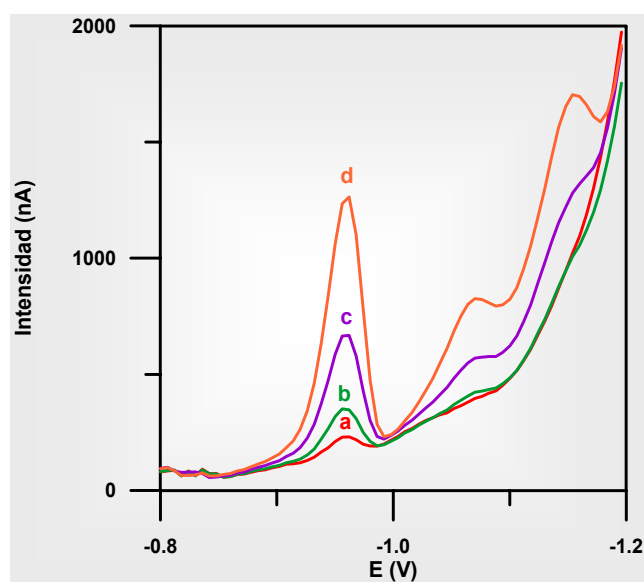
Uno de los objetivos de este trabajo es determinar de forma conjunta CS y UK en muestras de suero humano. Inicialmente pudimos comprobar que la determinación directa de estos dos compuestos en el suero (sin haber realizado un tratamiento de la muestra) no originaba resultados satisfactorios. Por tanto, como en los capítulos 5 y 6, se realizó una extracción en fase sólida (EFS) del suero humano, con el fin de obtener un extracto más limpio y poder realizar la determinación de CS y UK.

Para llevar a cabo la EFS del suero se utilizó un cartucho tC<sub>18</sub> en fase reversa, el procedimiento fue el siguiente:

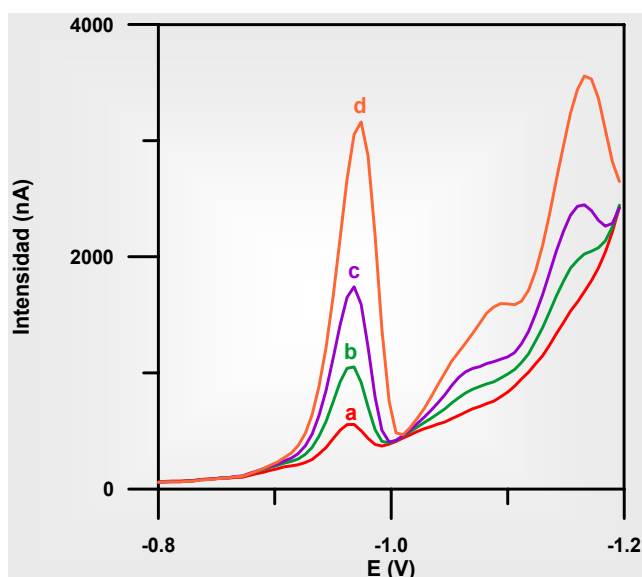
- Activación del cartucho: 5 mL de metanol y 5 mL de tampón fosfato de pH 7.0, 10 mM.
- Introducción de 1 mL de una muestra de suero.
- Lavado con 8 mL de fosfato (pH 7.0, 10 mM).
- Elución con 1.5 mL de metanol: *obtención del extracto de suero.*

En primer lugar, se procedió al establecimiento de las rectas de calibrado del metabolito UK en extracto de suero humano en las condiciones químicas e instrumentales seleccionadas (tabla 7.13, rectas **[1]** y **[2]**). Para ello, se preparó 10 mL de una disolución 0.010 M de HClO<sub>4</sub> (pH 2.0), sobre la cual directamente en la celda voltamperométrica se adicionó en primer lugar 200 µL de extracto de suero y a continuación se fueron adicionando diferentes cantidades del compuesto UK, variando así su concentración. Se fueron registrando los voltamperogramas en las condiciones seleccionadas y siendo necesario pasar N<sub>2</sub> de alta pureza sobre la muestra antes del registro de cada voltamperograma. En las figuras 7.10 y 7.11 se muestran los voltamperogramas correspondientes a

algunas de las concentraciones utilizadas en el calibrado de UK (extracto suero A).



**Figura 7.10.** Voltamperogramas de UK en un extracto de suero A de concentraciones (a)  $5.7 \times 10^{-8}$  M; (b)  $1.6 \times 10^{-7}$  M; (c)  $3.2 \times 10^{-7}$  M; (d)  $6.6 \times 10^{-7}$  M, para tiempo de acumulación 0 s.



**Figura 7.11.** Voltamperogramas de UK en un extracto de suero A de concentraciones (a)  $5.7 \times 10^{-8}$  M; (b)  $1.6 \times 10^{-7}$  M; (c)  $3.2 \times 10^{-7}$  M; (d)  $6.6 \times 10^{-7}$  M, para tiempo de acumulación 10 s.

En segundo lugar, se procedió al establecimiento de las rectas de calibrado pero esta vez con respecto a la cantidad total de CS-UK (tabla 7.13, rectas **[3]** y **[4]**), en las condiciones químicas e instrumentales seleccionadas y con la misma cantidad de extracto de suero A que la experiencia anterior. Para ello se preparó una disolución que contenía la mezcla de estos dos compuestos, la cual fue utilizada para preparar los calibrados. El objetivo fue comparar, utilizando el test ANOVA, estas rectas con las anteriores con el fin de comprobar si existían diferencias significativas entre una recta de calibrado de UK y una recta de calibrado CS-UK. En la tabla 7.14 se muestran los valores de F y t. Se

pudo comprobar que no existían diferencias significativas entre las pendientes de las rectas de calibrado ([1] y [3]) y ([2] y [4]), por tanto, podemos determinar la cantidad total de CS y UK en muestras de suero.

A continuación se realizaron diferentes calibrados en función de la cantidad de extracto de suero en la celda voltamperométrica (200 ó 600  $\mu\text{L}$ ) y si eran de diferentes personas (A o B). En la tabla 7.13 se muestran las ecuaciones de las rectas de calibrado así como los intervalos de linealidad para los tiempos de acumulación 0 y 10 segundos.

Se llevó a cabo el test ANOVA para comparar las diferentes rectas de calibrado que se habían realizado con el fin de comprobar si existían diferencias significativas entre ellas. En la tabla 7.14 se muestran los valores de F y t. Se puede apreciar que no se encontraron diferencias significativas a la hora de comparar las rectas de calibrado utilizando extractos de suero de diferentes personas (rectas [3] y [5]) y ([4] y [6]). Sin embargo, sí que se encontraron diferencias significativas cuando se utilizaron diferentes cantidades de suero en la celda voltamperométrica (rectas [3] y [7]) y ([4] y [8]). Este hecho podría deberse a un posible efecto matriz (fuerza iónica, proteínas del suero, etc).

**Determinación de citrato de sildenafil y su metabolito**

---

**Tabla 7.13. Rectas de calibrado**

<b>t<sub>ac</sub> (s)</b>	<b>Ecuación</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Rango Lineal</b>
<b>UK (200 µL extracto de suero A)</b>			
<b>0</b>	<b>[1]</b> I <sub>p</sub> = (-86.48±28.40) + (1.55×10 <sup>9</sup> ±5.67×10 <sup>7</sup> ) C	0.999	8.0×10 <sup>-8</sup> -9.5×10 <sup>-7</sup> M
<b>10</b>	<b>[2]</b> I <sub>p</sub> = (-78.68±80.02) + (4.49×10 <sup>9</sup> ±2.47×10 <sup>8</sup> ) C	0.999	4.0×10 <sup>-8</sup> -9.0×10 <sup>-7</sup> M
<b>CS-UK (200 µL extracto de suero A)</b>			
<b>0</b>	<b>[3]</b> I <sub>p</sub> = (-14.54±11.21) + (1.60×10 <sup>9</sup> ±2.46×10 <sup>7</sup> ) C	0.999	3.5×10 <sup>-8</sup> -9.7×10 <sup>-7</sup> M
<b>10</b>	<b>[4]</b> I <sub>p</sub> = (36.18±47.47) + (4.63×10 <sup>9</sup> ±1.04×10 <sup>7</sup> ) C	0.998	3.4×10 <sup>-8</sup> -9.7×10 <sup>-7</sup> M
<b>CS-UK (200 µL extracto de suero B)</b>			
<b>0</b>	<b>[5]</b> I <sub>p</sub> = (5.97±61.55) + (1.44×10 <sup>9</sup> ±1.43×10 <sup>8</sup> ) C	0.993	1.1×10 <sup>-7</sup> -6.8×10 <sup>-7</sup> M
<b>10</b>	<b>[6]</b> I <sub>p</sub> = (125.46±96.13) + (4.05×10 <sup>9</sup> ±2.53×10 <sup>8</sup> ) C	0.996	4.2×10 <sup>-8</sup> -6.8×10 <sup>-7</sup> M
<b>CS-UK (600 µL extracto de suero A)</b>			
<b>0</b>	<b>[7]</b> I <sub>p</sub> = (-37.15±39.07) + (1.38×10 <sup>9</sup> ±8.29×10 <sup>7</sup> ) C	0.994	1.2×10 <sup>-7</sup> -9.1×10 <sup>-7</sup> M
<b>10</b>	<b>[8]</b> I <sub>p</sub> = (-48.64±21.77) + (1.01×10 <sup>9</sup> ±5.17×10 <sup>7</sup> ) C	0.997	1.2×10 <sup>-7</sup> -7.4×10 <sup>-7</sup> M

Donde I<sub>p</sub>: intensidad de pico (nA) C: concentración Molar.

*Tabla 7.14. Análisis de varianza*

<b>Rectas de calibrado</b>	<b>F<sub>exp</sub></b>	<b>F<sub>teor</sub></b>	<b>t<sub>exp</sub></b>	<b>t<sub>teor</sub></b>
<b>[1] y [3]</b>	0.180	3.730	1.998	2.315
<b>[3] y [5]</b>	0.100	3.970	2.430	2.564
<b>[3] y [7]</b>	10.560	3.680	5.975	2.273
<b>[2] y [4]</b>	5.220	4.390	0.604	2.554
<b>[4] y [6]</b>	0.280	4.880	1.541	2.180
<b>[4] y [8]</b>	0.114	4.390	37.447	2.566

Como conclusión del estudio realizado, podemos decir que la determinación total de CS y UK en suero no se podrá llevar a cabo por medida directa sino utilizando el método de las adiciones estándar para evitar la influencia del efecto matriz.

**a) Límites de detección y cuantificación**

Como comentamos en el capítulo 4, el procedimiento utilizado para establecer los límites de detección y de cuantificación se basa en los datos

## Determinación de citrato de sildenafil y su metabolito

obtenidos en la recta de calibrado. Para ello, se calcularon a partir de las rectas de calibrado de 200  $\mu\text{L}$  de extracto de suero A (rectas **[1]** y **[2]**, para tiempos de acumulación de 0 y 10 s, respectivamente). Los límites de detección y de cuantificación se muestran en la tabla 7.15.

**Tabla 7.15.** Límites de detección y cuantificación

$t_{ac}$ (s)	LD (M)	LC (M)
0	$1.96 \times 10^{-8}$	$5.87 \times 10^{-8}$
10	$1.02 \times 10^{-8}$	$3.06 \times 10^{-8}$

### b) Precisión

Para llevar a cabo este estudio, se preparó una muestra de la siguiente manera: se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de extracto de suero dopado con una cantidad de CS y UK para obtener una concentración final de  $3.2 \times 10^{-7}$  M en la celda voltamperométrica, sobre 10 mL de una disolución en  $\text{HClO}_4$  0.010 M, pH 2.0. A continuación, se registraron sucesivamente nueve voltamperogramas en las condiciones seleccionadas como óptimas.

Para evaluar la reproducibilidad entre días consecutivos, se preparó otra muestra igual que la anteriormente citada y se volvieron a registrar nueve voltamperogramas consecutivos en las mismas condiciones seleccionadas.

Se compararon las varianzas de las series según el test estadístico F de Snedecor para pruebas de dos colas. Se encontró que no existían diferencias significativas entre las series para un intervalo de confianza del 95%.

Los términos obtenidos, tales como medias, desviación estándar (DE) y porcentaje de desviación relativa (DER) se muestran en la tabla 7.16.

*Tabla 7.16. Valores medios, DE y DER*

	$t_{ac} 0 s$		$t_{ac} 10 s$	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
<b><math>I_p</math> media (nA)</b>	410	408	1360	1357
<b>DE</b>	3.26	6.24	11.89	10.18
<b>DER</b>	0.79	1.53	0.87	0.75
<b><math>F_{exp}</math></b>	0.27		1.36	
<b><math>F_{teor}</math></b>	4.43		4.43	



**c) Aplicaciones**

Para comprobar la validez del método propuesto se tomaron muestras de suero a las que se añadieron los dos compuestos, se realizó la extracción en fase sólida y, posteriormente, se procedió a la determinación cuantitativa total de CS y UK en las diferentes muestras. Para ello, fue necesario utilizar el método de las adiciones estándar. En todo momento los porcentajes de recuperación fueron calculados con respecto a la cantidad añadida. En la tabla 7.17 se recogen los valores de recuperación para las muestras preparadas en el laboratorio y en ella podemos observar que se obtuvieron aceptables valores de recuperación.

**Tabla 7.17.** Recuperaciones obtenidas en las muestras preparadas en el laboratorio

MUESTRA	$\mu\text{L}$ extracto de suero en celda	CS-UK (*)	Recuperación (%)	
			$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 10 s
<b>M 1</b>	200	$4.2 \times 10^{-8}$	102	105
<b>M 2</b>	200	$1.3 \times 10^{-7}$	101	111
<b>M 3</b>	100	$8.5 \times 10^{-8}$	99	100
<b>M 4</b>	200	$1.7 \times 10^{-7}$	101	99

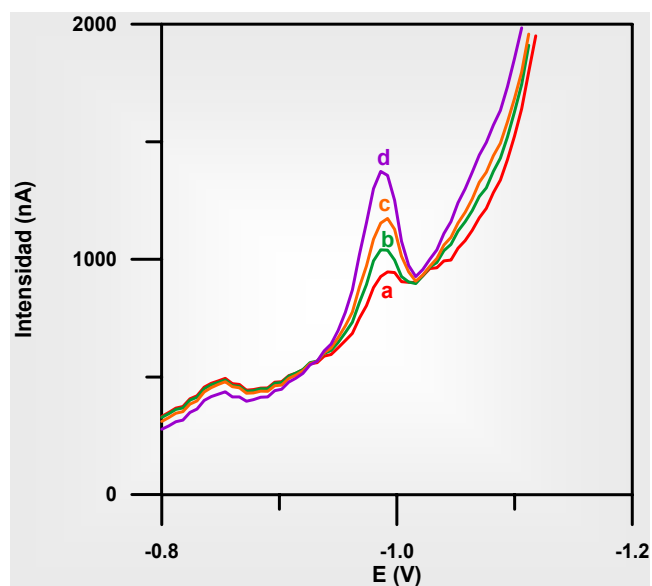
(\*) Concentración total de CS-UK en la celda voltamperométricas.

### ***7.3.5. Determinación de Citrato de Sildenafil y UK-103,320 en orina.***

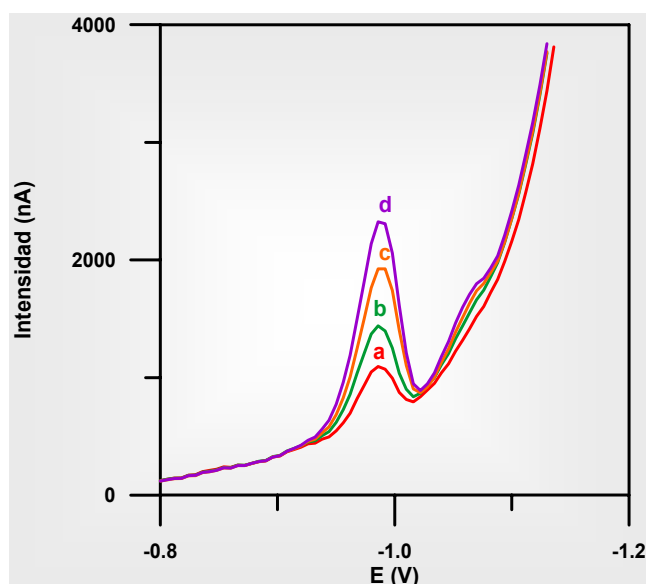
Después de la administración oral o intravenosa, el sildenafil se excreta predominantemente como metabolitos en las heces (aproximadamente el 80% de dosis oral administrada) y en menor cantidad en la orina (aproximadamente el 13% de la dosis oral administrada). Por ello, en este apartado propusimos la determinación de sildenafil y su principal metabolito (UK-103,320) en orina. Con este fin, se realizaron diferentes calibrados en función de la cantidad de orina en la celda voltamperométrica en las condiciones químicas e instrumentales seleccionadas y expuestas con anterioridad.

Esta experiencia se llevó a cabo de la siguiente manera: una cantidad de orina (50 ó 150  $\mu\text{L}$ ), sin necesidad de ningún tratamiento previo adicional, fue adicionada sobre 10 mL de disolución  $\text{HClO}_4$  0.010 M (pH 2.0), los cuales fueron antes desaireados mediante la utilización de  $\text{N}_2$  de alta pureza durante diez minutos. A continuación, se fueron adicionando volúmenes variables de una disolución que contenía los dos compuestos de interés directamente en la celda voltamperométrica y se registraron los voltamperogramas en las condiciones seleccionadas anteriormente. En cada uno de los casos, antes de registrar el voltamperograma la muestra fue desaireada haciendo burbujear  $\text{N}_2$  de alta pureza durante unos minutos. En la tabla 7.18 se encuentran las diferentes ecuaciones de las rectas de calibrado así como los intervalos de linealidad para los tiempos de acumulación 0 y 10 segundos. En las figuras 7.12 y 7.13 se muestran los voltamperogramas correspondientes a algunas de las

concentraciones utilizadas en el calibrado A (50  $\mu\text{L}$  de orina en la celda voltamperométrica).



**Figura 7.12.** Voltamperogramas en orina de CS-UK de concentraciones (a)  $9.1 \times 10^{-8}$  M; (b)  $1.5 \times 10^{-7}$  M; (c)  $2.4 \times 10^{-7}$  M; (d)  $3.2 \times 10^{-7}$  M, para tiempo de acumulación 0 s.



**Figura 7.13.** Voltamperogramas de CS-UK en orina de concentraciones (a)  $9.1 \times 10^{-8}$  M; (b)  $1.5 \times 10^{-7}$  M; (c)  $2.4 \times 10^{-7}$  M; (d)  $3.2 \times 10^{-7}$  M, para tiempo de acumulación 10 s.

En la tabla 7.19 se muestran los valores de F y *t* una vez realizado el test ANOVA, en ella podemos apreciar que se encontraron diferencias significativas a la hora de comparar las rectas de calibrado preparadas con diferente cantidad de orina (rectas ([9] y [11]) y ([10] y [12])). Este hecho podría deberse a los posibles cambios de fuerza iónica a la hora de utilizar diferentes cantidades de orina. Por tanto, podemos decir, como en los casos anteriores, que la determinación de estos dos compuestos en orina no se podrá llevar a cabo por

**Determinación de citrato de sildenafil y su metabolito**

medida directa sino utilizando el método de las adiciones estándar porque depende de la cantidad de orina que utilizemos para la determinación.

*Tabla 7.18. Rectas de calibrado*

$t_{ac}$ (s)	Ecuación	R <sup>2</sup>	Rango Lineal
<b>CS-UK (50 <math>\mu</math>L orina, calibrado A)</b>			
<b>0</b>	<b>[9]</b> $I_p = (-10.73 \pm 24.16) + (1.76 \times 10^9 \pm 3.24 \times 10^7) C$	0.999	$9.0 \times 10^{-8} - 1.8 \times 10^{-6} M$
<b>10</b>	<b>[10]</b> $I_p = (-14.20 \pm 35.36) + (4.97 \times 10^9 \pm 1.57 \times 10^8) C$	0.997	$4.5 \times 10^{-8} - 4.9 \times 10^{-7} M$
<b>CS-UK (150 <math>\mu</math>L orina, calibrado B)</b>			
<b>0</b>	<b>[11]</b> $I_p = (-5.34 \pm 29.59) + (1.58 \times 10^9 \pm 4.12 \times 10^7) C$	0.998	$8.8 \times 10^{-8} - 1.6 \times 10^{-7} M$
<b>10</b>	<b>[12]</b> $I_p = (23.91 \pm 87.74) + (3.97 \times 10^9 \pm 3.83 \times 10^8) C$	0.998	$4.4 \times 10^{-8} - 4.3 \times 10^{-7} M$

Donde  $I_p$ : intensidad de pico (nA) C: concentración Molar.

**Tabla 7.19. Análisis de varianza**

<b>Rectas de calibrado</b>	<b>F<sub>exp</sub></b>	<b>F<sub>teor</sub></b>	<b>t<sub>exp</sub></b>	<b>t<sub>teor</sub></b>
<b>[9] y [11]</b>	1.600	2.490	6.634	2.070
<b>[10] y [12]</b>	2.480	2.920	6.837	2.095

**a) Límites de detección y cuantificación**

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de las rectas de calibrado preparadas a partir de 50 µL de orina (rectas **[9]** y **[10]** para tiempos de acumulación 0 y 10 s, respectivamente), fueron los siguientes:

**Tabla 7.20. Límites de detección y cuantificación**

<b>t<sub>ac</sub> (s)</b>	<b>LD (M)</b>	<b>LC (M)</b>
<b>0</b>	2.70×10 <sup>-8</sup>	8.10×10 <sup>-8</sup>
<b>10</b>	1.32×10 <sup>-8</sup>	3.97×10 <sup>-8</sup>

**b) Precisión**

Para llevar a cabo el estudio de repetibilidad del método descrito se preparó una muestra de la siguiente manera: se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de orina dopada con una cantidad de CS y UK para obtener una concentración final de  $2.0 \times 10^{-8}$  M, sin necesidad de ningún tratamiento previo, sobre 10 mL en  $\text{HClO}_4$  0.010 M, pH 2.0. A continuación, se registraron sucesivamente nueve voltamperogramas en las condiciones seleccionadas como óptimas.

Para evaluar la reproducibilidad entre días consecutivos, se preparó otra muestra igual que la anteriormente citada y se volvieron a registrar nueve voltamperogramas consecutivos en las mismas condiciones.

Se compararon las varianzas de las series según el test estadístico F de Snedecor para pruebas de dos colas. Se encontró que no existían diferencias significativas entre las series para un intervalo de confianza del 95%. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.21.

**Tabla 7.21. Valores medios, DE y DER**

	$t_{ac}$ 0 s		$t_{ac}$ 10 s	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
<b><math>I_p</math> media (nA)</b>	344	342	986	978
<b>DE</b>	10.47	9.04	11.09	12.47
<b>DER</b>	3.04	2.64	1.12	1.27
<b><math>F_{exp}</math></b>	1.34		0.79	
<b><math>F_{teor}</math></b>	4.43		4.43	

**c) Aplicaciones**

Para comprobar la validez del método propuesto se tomaron muestras de orina a las que se añadieron los dos compuestos y, posteriormente, se procedió a la determinación cuantitativa total de CS y UK en las diferentes muestras. Para ello, fue necesario utilizar el método de las adiciones estándar. En todo momento los porcentajes de recuperación fueron calculados con respecto a la cantidad añadida. En la tabla 7.22 se recogen los valores de recuperación para las muestras preparadas en el laboratorio y en ella podemos observar que se obtuvieron mejores valores de recuperación cuando se llevó a cabo la



### Determinación de citrato de sildenafil y su metabolito

determinación utilizando 10 segundos de acumulación. Los resultados obtenidos para tiempo de acumulación 0 s muestran nuevamente la posible interferencia de un compuesto de la orina que se reduce a potenciales anteriores al de citrato de sildenafil y que condiciona, por lo tanto, su reducción.

*Tabla 7.22. Recuperaciones obtenidas en las muestras preparadas en el laboratorio*

MUESTRA	$\mu\text{L}$ de orina en celda	CS-UK (*)	Recuperación (%)	
			$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 10 s
M 1	150	$1.9 \times 10^{-8}$	91	96
M 2	150	$3.7 \times 10^{-8}$	66	101
M 3	50	$1.5 \times 10^{-8}$	65	99
M 4	50	$1.6 \times 10^{-8}$	96	89

(\*) Concentración total de CS-UK en la celda voltamperométrica.

De todo lo anteriormente expuesto, podemos concluir que la voltamperometría de redisolución adsorbtiva es una técnica factible para la cuantificación total de CS y UK en fluidos biológicos (suero y orina), siendo además extremadamente sensible su análisis y sin necesidad de volúmenes grandes de muestra (200  $\mu\text{L}$  de extracto de suero ó 50  $\mu\text{L}$  de orina).

*Determinación de mifepristone*

8. Determinación de mifepristone  
mediante técnicas electroquímicas  
en muestras de orina

El estudio que se describe en este capítulo se ha realizado con la finalidad de establecer métodos electroquímicos que permitan la determinación cuantitativa de mifepristone en orina por técnicas electroquímicas tales como son:

- Voltamperometría cíclica
- Voltamperometría de redisolución por diferencial de pulso
- Voltamperometría de redisolución por onda cuadrada

En primer lugar se realizaron estudios preliminares para seleccionar la técnica electroquímica más adecuada para el estudio. A continuación se estudiaron tanto los parámetros químicos como instrumentales propios de la técnica seleccionada, finalizando con la aplicación del método propuesto a la determinación de mifepristone en orina.

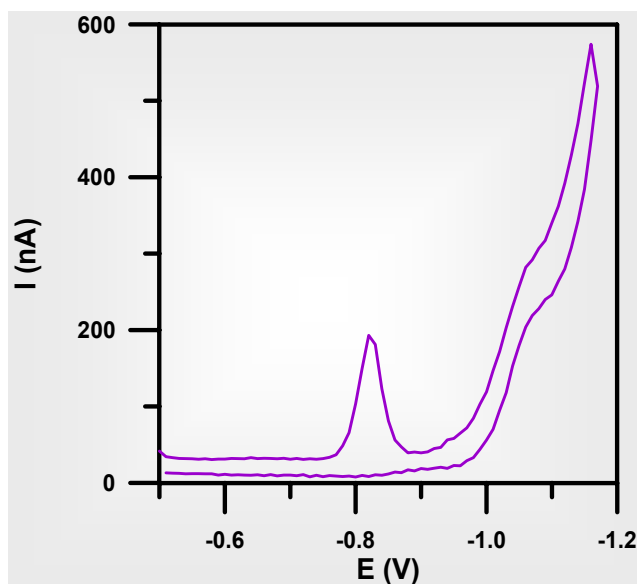
### ***8.1. Estudio de Mifepristone por voltamperometría cíclica***

Con objeto de conocer la naturaleza de los procesos de oxido-reducción de mifepristone se llevaron a cabo los estudios por voltamperometría cíclica.

Para ello se preparó una muestra de 10 mL de una disolución de  $5.04 \times 10^{-6}$  M de mifepristone en  $\text{HClO}_4$  0.010 M registrándose los ciclovoltamperogramas entre  $-0.5$  y  $-1.2$  V a una velocidad de barrido de 100 mV/s después de desairear la muestra pasando  $\text{N}_2$  de alta pureza durante 10 minutos. La fisonomía del ciclovoltamperograma obtenido se muestra en la figura 8.1, donde se puede observar un único pico de reducción a  $-0.850$  V frente al electrodo de referencia Ag/AgCl que se utilizará en todo momento. Se puede apreciar, asimismo, que este proceso catódico no se corresponde con ningún proceso de oxidación cuando se realiza el barrido inverso hacia potenciales positivos, lo que indica su irreversibilidad.

La fisonomía del ciclovoltamperograma muestra con su forma triangular y estrecha la posible acumulación del mifepristone sobre el electrodo estacionario de mercurio.

Con el fin de comprobar si el proceso estaba controlado por adsorción o difusión se llevaron a cabo las siguientes experiencias:



*Figura 8.1. Ciclovoltamperograma de  $5.04 \times 10^{-6}$  M de Mifepristone en  $\text{HClO}_4$  0.010 M.*

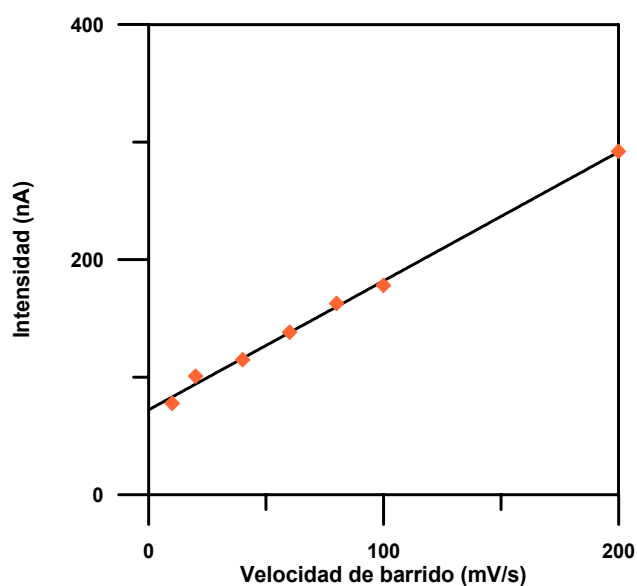
• **Variación de la intensidad de pico con la velocidad de barrido**

En este estudio se preparó una muestra de 10 mL de una disolución de  $5.04 \times 10^{-6}$  M de mifepristone en  $\text{HClO}_4$  0.010 M, y se registraron sus ciclovoltamperogramas entre los potenciales  $-0.5$  y  $-1.2$  V a las velocidades de barrido comprendidas entre 10 y 200 mV/s, después de desairear la muestra haciendo burbujear durante 10 minutos  $\text{N}_2$  de alta pureza.

En la tabla 8.1 se muestran los valores de  $I_p$  (intensidad de pico) para las distintas velocidades de barrido ( $V_b$ ) a las que se registraron los ciclovoltamperogramas. En la figura 8.2 se observa la representación gráfica de  $I_p$  frente a la velocidad de barrido para el único pico catódico existente.

**Tabla 8.1.** Variación de  $I_p$  con la velocidad de barrido

$V_b$ (mV/s)	$I_p$ (nA)
10	77.65
20	100.80
40	114.70
60	138.16
80	162.64
100	178.81
200	292.01



**Figura 8.2.** Representación  $I_p$  frente a la velocidad de barrido para el proceso de reducción de Mifepristone

Como se puede observar en la figura 8.2 existe una relación lineal entre la intensidad de pico y la velocidad de barrido, lo cual nos indica que el proceso está controlado por la adsorción, siendo la ecuación de la recta que relaciona la intensidad de pico con la velocidad de barrido de mifepristone sobre el electrodo de trabajo la siguiente:

$$I_p = (72.11 \pm 6.63) + (1.10 \pm 0.07) V_b \quad r^2 = 0.9970 \quad (n=7)$$

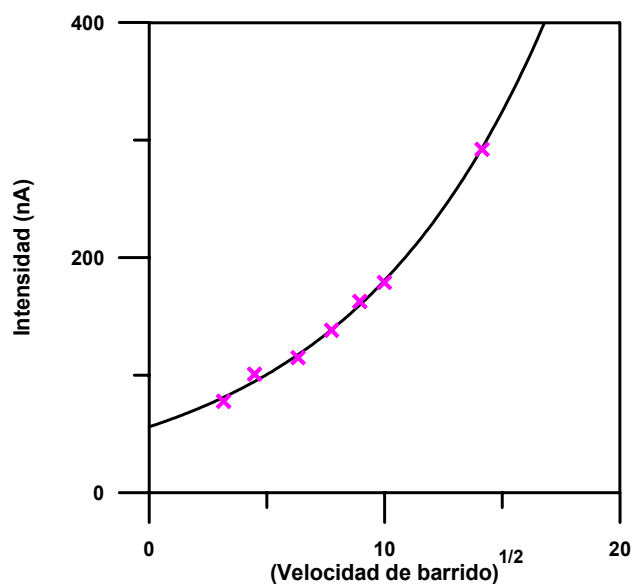


• **Variación de la intensidad de pico con la raíz cuadrada velocidad de barrido**

Dicha relación ( $I_p$  frente  $V_b^{1/2}$ ) se llevó a cabo a partir de los datos obtenidos en el apartado anterior. En la tabla 8.2 se muestran los valores correspondientes a la intensidad de pico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para esos mismos datos.

**Tabla 8.2.** Variación de  $I_p$  con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido

$V_b^{1/2}$ (mV/s) <sup>1/2</sup>	$I_p$ (nA)
3.16	77.65
4.47	100.80
6.32	114.70
7.74	138.16
8.94	162.64
10.00	178.81
14.14	292.01



**Figura 8.3.** Representación gráfica de intensidad de pico frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Como se puede apreciar en la figura 8.3 no existe linealidad entre  $I_p$  y  $V_b^{1/2}$ , lo que indica que el proceso no está controlado exclusivamente por la difusión del compuesto mifepristone a la superficie electródica, existiendo una componente de adsorción considerable en el mecanismo de transporte y reducción de dicho compuesto.

Además, los procesos controlados por adsorción presentan ondas en las que la disminución de la intensidad de corriente alcanza rápidamente, después

del máximo, un valor de corriente próximo al de la corriente residual, dando curvas en forma de campana, o lo que es lo mismo, simétricas entorno a  $I_p$  (Figura 8.1).

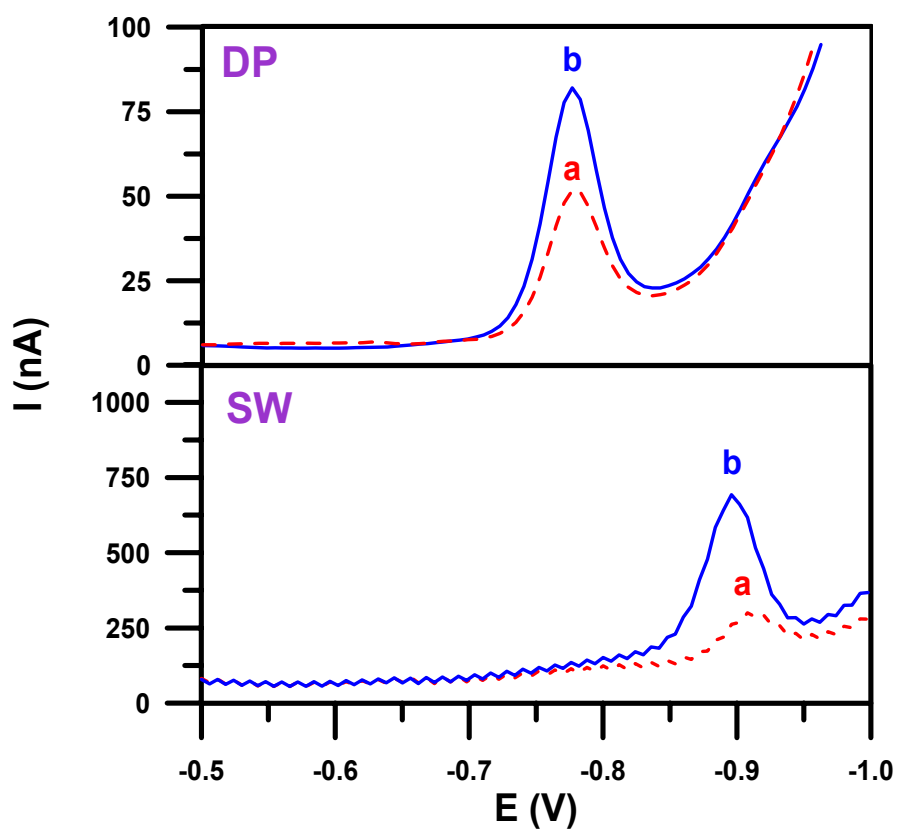
### ***8.2. Estudios preliminares. Selección de la técnica instrumental.***

Se procedió primeramente al estudio del comportamiento electroquímico de mifepristone sobre el electrodo estacionario de mercurio (HMDE) utilizando como técnica electroquímica la voltamperometría de redisolución por diferencial de pulso (DPS).

Con objeto de llevar a cabo este estudio se preparó una muestra de 10 mL de una disolución de  $2.0 \times 10^{-7}$  M de mifepristone en  $\text{HClO}_4$  0.010 M registrándose su voltamperograma entre  $-0.5$  y  $-1.2$  V a una velocidad de barrido de 10 mV/s y un pulso de 40 mV, después de desairear la muestra pasando  $\text{N}_2$  de alta pureza durante 10 minutos. Además se realizó un segundo voltamperograma, en las mismas condiciones químicas e instrumentales, pero en este caso se utilizó 10 s, como tiempo de acumulación. Los voltamperogramas se muestran en la figura 8.4, donde se puede observar que en estas condiciones aparece un pico de reducción a un potencial de  $-0.776$  V. En la tabla 8.3, se puede apreciar como esas intensidades de pico aumentan con el tiempo de acumulación.

Así mismo, con el fin de comparar esta técnica con la voltamperometría de redisolución por onda cuadrada (SWS), se preparó una muestra en las mismas condiciones que la anterior, registrándose su voltamperograma entre  $-0.5$  y  $-1.2$  V a una velocidad de barrido de  $1000$  mV/s (frecuencia  $100$  Hz e incremento de scan  $10$  mV). También se registró un segundo voltamperograma tras una etapa de acumulación de  $10$  s. Los voltamperogramas se muestran en la figura 8.4. En éstos se muestra como el pico de reducción está desplazado a un potencial de  $-0.896$  V debido a la elevada velocidad de barrido utilizada en esta técnica, además de la irreversibilidad del proceso de reducción del mifepristone. En la tabla 8.3, también se puede apreciar como su intensidad aumenta algo más de tres veces con el tiempo de acumulación, lo que originaría una alta sensibilidad analítica.

Por tanto, este estudio pone de manifiesto el comportamiento del compuesto sobre el HMDE además de la naturaleza acumulativa del proceso de reducción de mifepristone. También, se pudo comprobar que la técnica SWS fue la más adecuada para proponer la determinación del compuesto, ya que era la que proporcionaba mayor sensibilidad al aplicar tiempos de acumulación semejantes, hecho que nos ofrecía la posibilidad de cuantificar pequeñas cantidades de mifepristone, facilitando así su medida en orina, objetivo último de este capítulo. Otra de las características que debemos tener en cuenta es la alta velocidad de barrido, la cual nos permite obtener un voltamperograma en menos de un segundo.



*Figura 8.4.* Voltamperogramas de reducción por DPS y SWS a diferentes tiempos de acumulación. (a) 0 s; (b) 10 s

*Tabla 8.3. Técnicas electroquímicas. Variación de la Intensidad*

TÉCNICA	$I_P$ (nA)	
	$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 10 s
DPS	37	66
SWS	126	479

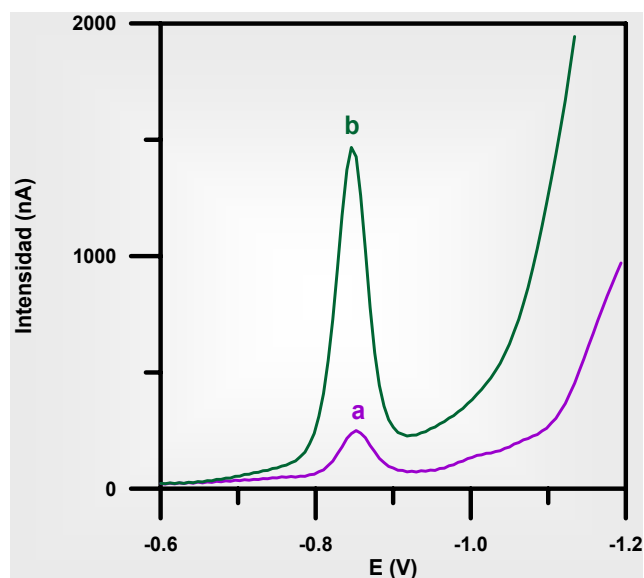
***8.3. Optimización del proceso redox mediante voltamperometría de redisolución adsorptiva por onda cuadrada.***

Este método se llevó a cabo, como ya se ha dicho con anterioridad, con el fin de proponer métodos más sensibles para la determinación cuantitativa de mifepristone debido a que el proceso de reducción estaba controlado por adsorción. Por este motivo se procedió a estudiar los parámetros químicos e instrumentales propios de la técnica.

### 8.3.1. Influencia del pH

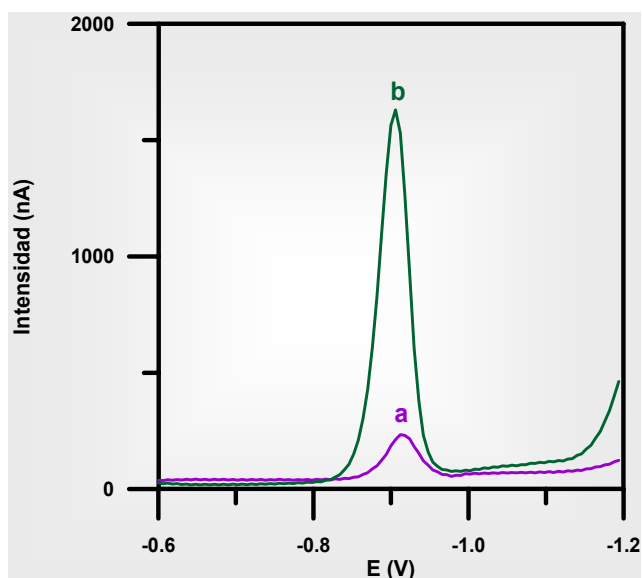
Para llevar a cabo este estudio se realizaron las siguientes pruebas:

- Se preparó una muestra de  $5.0 \times 10^{-7}$  M en 10 mL de  $\text{HClO}_4$  0.100 M (pH 1.0), cuyos voltamperogramas, en las condiciones inertes mencionadas anteriormente, se registraron entre  $-0.6$  y  $-1.2$  V para dos tiempos de acumulación, 0 y 30 s (figura 8.5). En estas condiciones se observó un pico de reducción a  $-0.852$  V. Además se pudo comprobar que en estas condiciones la disolución era estable durante al menos una hora, es decir, el valor de la intensidad de pico no variaba con el tiempo.



**Figura 8.5.** Voltamperogramas de Mifepristone en medio fuertemente ácido (pH 1.0). Tiempos de acumulación: (a) 0 s y (b) 30 s.

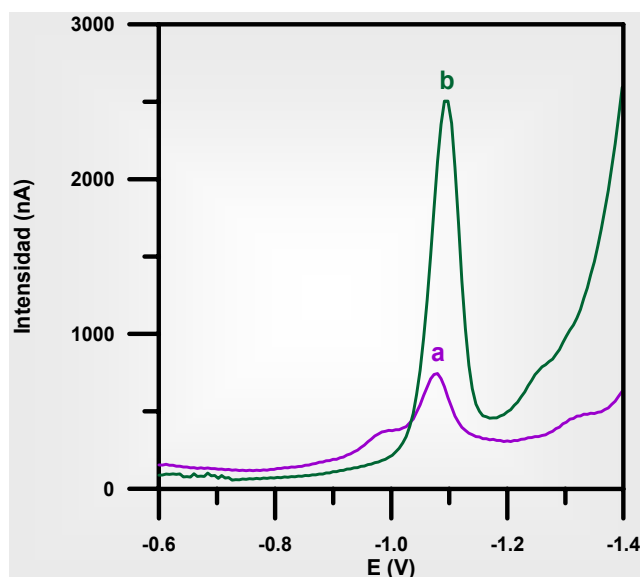
- En otra nueva experiencia se preparó una muestra de  $5.0 \times 10^{-7}$  M en 10 mL de  $\text{HClO}_4$  0.010 M (pH 2.0), registrándose sus voltamperogramas entre  $-0.6$  y  $-1.2$  V para dos tiempos de acumulación, 0 y 30 s (figura 8.6). El pico de reducción para este compuesto se encontraba a  $-0.900$  V. Igual que en el caso anterior la disolución era estable al menos una hora.



**Figura 8.6.** Voltamperogramas de Mifepristone en medio fuertemente ácido (pH 2.0).  
Tiempos de acumulación: (a) 0 s y (b) 30 s.

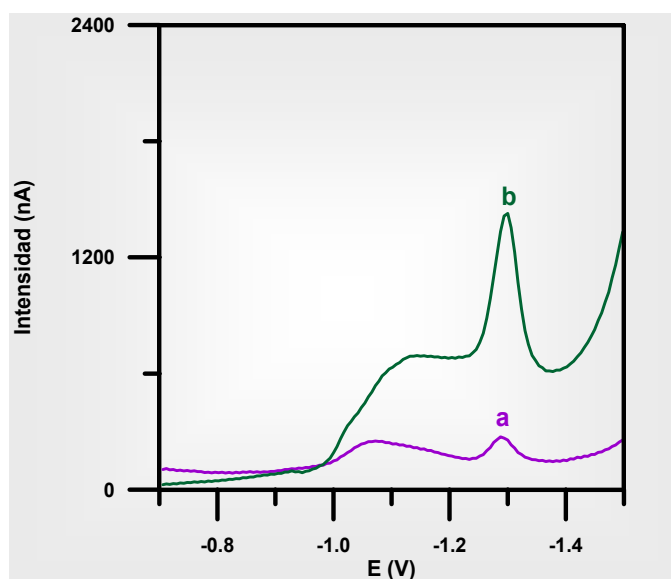


- En una tercera experiencia se registró entre  $-0.6$  y  $-1.4$  V una muestra de  $5.0 \times 10^{-7}$  M de mifepristone en 10 mL de tampón HAc/ NaAc (pH 4.5), ajustando su fuerza iónica a 0.010 M, para tiempos de acumulación de 0 y 30 s. En la figura 8.7 se observa un pico de reducción a  $-1.085$  V para los dos tiempos de acumulación. Además, se puede apreciar una preonda a un potencial de  $-0.965$  V para un tiempo de acumulación de 0 s, sin embargo, para 30 s de acumulación esta preonda no se observa. Esto se puede explicar en base a la posible reorganización de las moléculas sobre la superficie de la gota de mercurio. En estas condiciones la disolución no era estable en el tiempo, es decir el valor de intensidad de pico disminuía con el tiempo.



**Figura 8.7.** Voltamperogramas de Mifepristone en medio débilmente ácido (pH 4.5).  
Tiempos de acumulación: (a) 0 s y (b) 30 s.

- Finalmente, en una cuarta experiencia se procedió a registrar los voltamperogramas de una muestra que contenía  $5.0 \times 10^{-7}$  M de mifepristone en 10 mL de tampón  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$  (pH 7.2), ajustando su fuerza iónica a 0.010 M, entre  $-0.7$  y  $-1.5$  V, para tiempos de acumulación de 0 y 30 s. En la figura 8.8 se puede observar que el pico de reducción del compuesto está desplazado a  $-1.290$  V. Al igual que en el caso anterior la muestra no mostraba estabilidad con el tiempo.



**Figura 8.8.** Voltamperogramas de Mifepristone en medio neutro (pH 7.2). Tiempos de acumulación: (a) 0 s y (b) 30 s.

En la tabla 8.4 se muestran los valores de  $I_P$  para los distintos valores de pH estudiados. Como se puede observar la  $I_P$  aumenta hasta un valor de pH 4.5 para los dos tiempos de acumulación, 0 y 30 s, sin embargo para el valor de pH 4.5 la  $I_P$  disminuía con el tiempo. Además, se puede apreciar en la figura 8.9 que el valor de  $E_P$  se desplaza hacia valores más negativos a medida que aumenta el pH, lo que indica la participación de los protones en el proceso de reducción. Por otro lado, teniendo en cuenta la pendiente de este gráfico (71 mV por unidad de pH) y la irreversibilidad del proceso (mostrado en los estudios previos por voltamperometría cíclica), podemos proponer la intervención de 2 protones y de 2 electrones en el proceso de reducción.

**Tabla 8.4.** Variación de la  $I_P$  con el pH

pH	$E_P$ (V)	$I_P$ (nA)	
		$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 30 s
1.0	-0.852	200	1300
2.0	-0.900	220	1600
4.5	-1.085	750	2269
7.2	-1.290	120	780

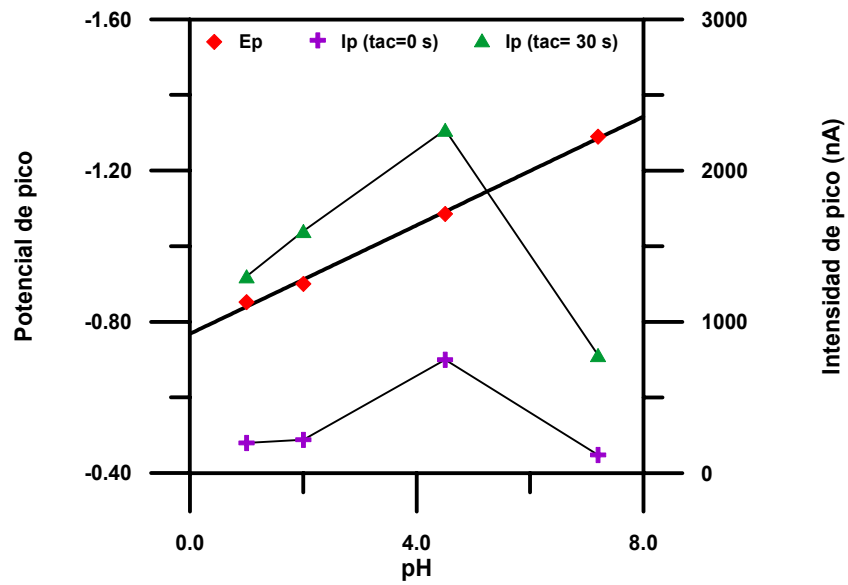


Figura 8.9. Influencia del pH con el potencial y la intensidad de pico.

Como consecuencia de este estudio podemos proponer el siguiente mecanismo de reducción:

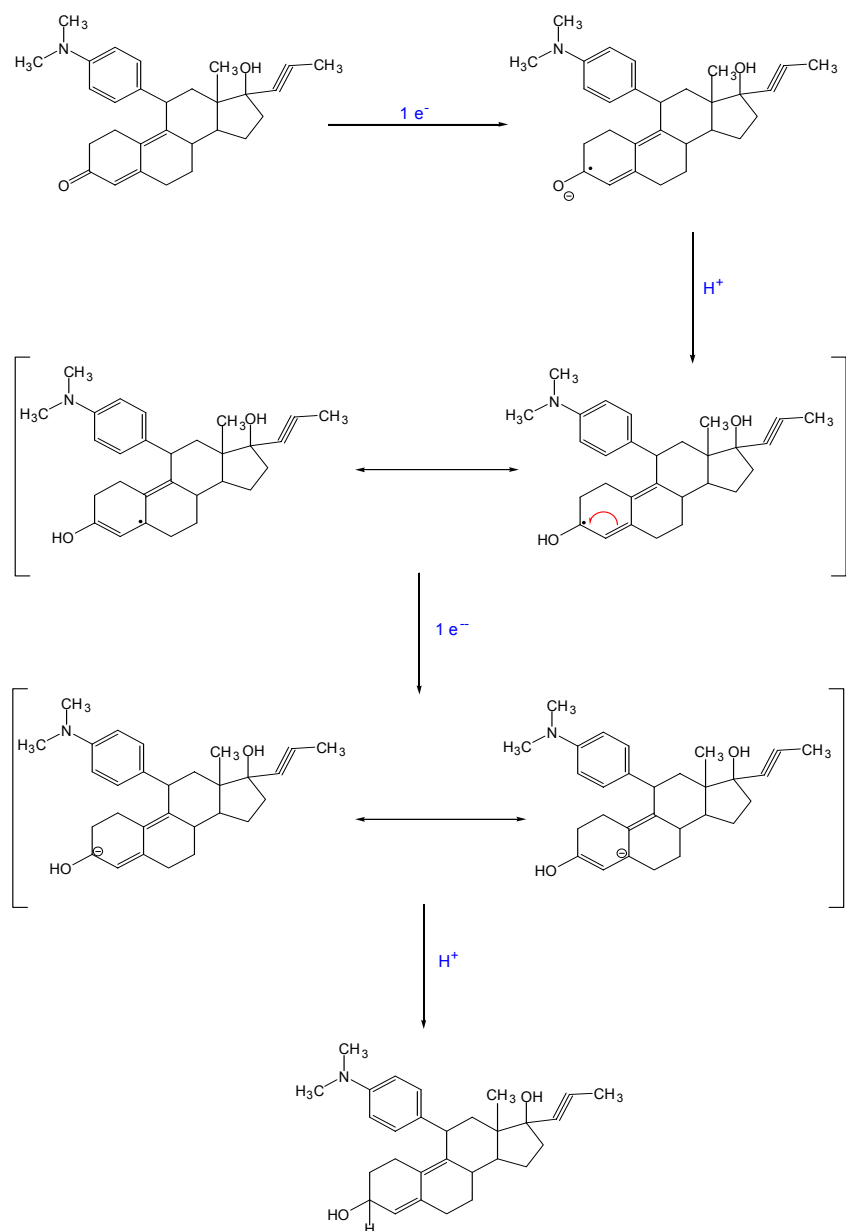


Figura 8.10. Mecanismo de reducción de Mifepristone.

Por tanto, se eligió como pH de trabajo para el estudio de mifepristone un medio fuertemente ácido (pH 2.0) porque además de proporcionar una buena definición del pico de reducción, el valor de  $I_p$  es constante con el tiempo.

### ***8.3.2. Influencia de la fuerza iónica.***

Debido a que la fuerza iónica de la disolución modifica el entorno iónico de la misma en este apartado estudiaremos la influencia de este parámetro químico en la zona de pH seleccionada sobre una disolución de  $2.0 \times 10^{-7}$  M de mifepristone. En estas condiciones se prepararon disoluciones con una concentración de  $\text{NaClO}_4$  comprendidas entre 0 y 130 mM y se registraron sus voltamperogramas entre  $-0.6$  y  $-1.2$  V. En la tabla 8.5 se resumen los valores de  $I_p$  y  $E_p$  obtenidos en cada voltamperograma al llevar a cabo el estudio de la influencia de la fuerza iónica.

*Tabla 8.5. Variación de  $I_p$  y  $E_p$  para Mifepristone con la concentración  $\text{NaClO}_4$*

$\text{NaClO}_4$ (mM)	Concentración total (mM)*	$E_p$ (V)	$I_p$ (nA)
0	10	-0.896	65
10	20	-0.896	60
30	40	-0.896	52
70	80	-0.896	41
130	140	-0.896	34

(\*) Suma de la concentración de  $\text{HClO}_4$  y  $\text{NaClO}_4$ .

Como se puede observar en la tabla 8.5, la intensidad de pico disminuye al aumentar la concentración de  $\text{NaClO}_4$  porque el proceso de adsorción del compuesto y su desplazamiento al electrodo se hace menos efectivo a medida que aumenta la fuerza iónica. Por tanto, en este estudio no aumentaremos la fuerza iónica de la disolución.

### ***8.3.3. Optimización de los parámetros instrumentales.***

Una vez establecidas las condiciones químicas para llevar a cabo el estudio electroquímico de este compuesto y conocida la estabilidad

electroquímica de las disoluciones del mismo en dichas condiciones, se procedió a estudiar la influencia de los parámetros instrumentales propios de la técnica empleada sobre los voltamperogramas de mifepristone. La concentración de mifepristone elegida para llevar a cabo estas optimizaciones fue de  $2.0 \times 10^{-7}$  M para así conseguir unas buenas condiciones de acumulación y evitar en lo posible la saturación del electrodo por dicho compuesto.

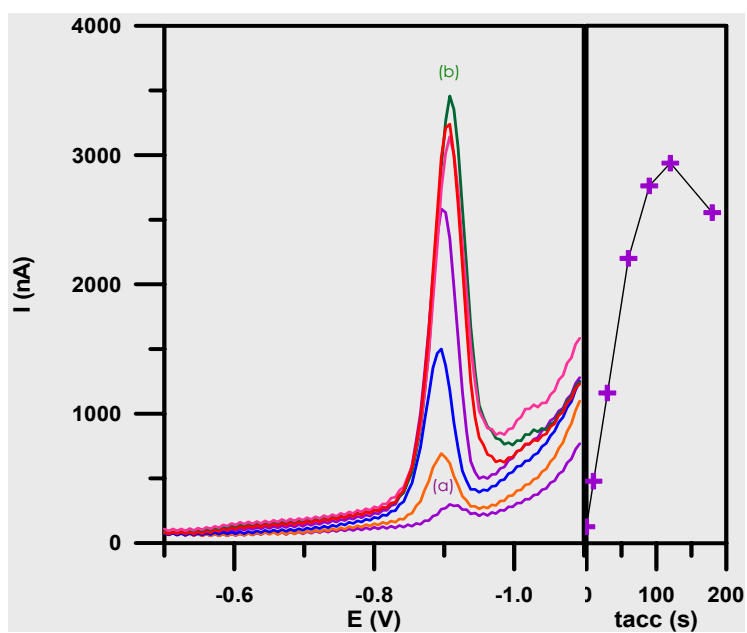
***a. Influencia del tiempo de acumulación.***

Se prepararon 10 mL de una disolución de  $2.0 \times 10^{-7}$  M de mifepristone, 0.01 M HClO<sub>4</sub>, cuyo pH fue 2.0, desaireándose la muestra en las condiciones inertes mencionadas y registrándose los voltamperogramas entre -0.6 y -1.2 V, utilizando las siguientes condiciones: potencial de acumulación ( $E_{ac}$ ) -0.6 V, incremento de scan ( $\Delta s$ ) 10 mV, frecuencia 100 Hz, área del electrodo grande (0.025 cm<sup>2</sup>) y tiempos de acumulación ( $t_{ac}$ ) 0, 10, 30, 60, 90, 120 y 180 segundos.

En la figura 8.11 podemos observar la representación gráfica de la  $I_p$  frente al tiempo de acumulación, así como los voltamperogramas a los diferentes tiempos de acumulación. En esta figura podemos apreciar la existencia de una zona de aumento lineal de la  $I_p$  con el tiempo de acumulación entre 0 y 90 s, observándose a partir de ese valor una pérdida progresiva de la linealidad de la señal. Esto es debido a que se produce una saturación de las moléculas del analito en el electrodo, lo cual origina una disminución de la respuesta.



Se eligió como óptimo un tiempo de acumulación de 30 segundos, fijándose este valor para llevar a cabo el resto de las experiencias, ya que nos proporcionaba la suficiente sensibilidad para la determinación de mifepristone en muestras biológicas, como es el caso de la orina, objeto último de este capítulo.



**Figura 8.11.** Influencia del tiempo de acumulación para el proceso de reducción de Mifepristone. (a) 0 s; (b) 180 s.

***b. Influencia del potencial de acumulación.***

La intensidad de pico depende del potencial de acumulación debido a que cuanto más próximo se encuentre éste del potencial de pico menor será el valor de  $I_P$ .

Para realizar este estudio se prepararon 10 mL de una disolución  $2.0 \times 10^{-7}$  M de mifepristone, 0.010 M  $\text{HClO}_4$ , cuyo pH fue 2.0, en las condiciones inertes mencionadas. Se registraron los voltamperogramas variando el potencial entre  $-0.5$  y  $-0.8$  V, utilizando las mismas condiciones instrumentales expuestas en el apartado anterior y con un  $t_{ac}$  de 30 s.

El análisis de los voltamperogramas obtenidos nos llevó a elaborar la tabla 8.6 donde se aprecia la variación de  $I_P$  y  $E_P$  con el potencial de acumulación para el proceso de reducción de mifepristone.

**Tabla 8.6.** Variación de  $I_P$  y  $E_P$  con el  $E_{ac}$ .

$E_{ac}$ (V)	$E_P$ (V)	$I_P$ (nA)	
		$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 30 s
- 0.5	- 0.930	66.1	574.4
- 0.6	- 0.940	65.6	572.4
- 0.7	- 0.940	62.6	558.6
- 0.8	- 0.940	61.1	524.6

Como se puede apreciar, la variación del  $E_{ac}$  no produce prácticamente modificaciones sobre el  $E_P$  pero sí en la  $I_P$ , la cual va disminuyendo a medida que el potencial de acumulación es menor. Esto es debido a que el valor de  $E_{ac}$  se aproxima al valor de  $E_P$ , por lo que seleccionamos como potencial de acumulación  $-0.5$  V para llevar a cabo el estudio.

**c. Influencia de la frecuencia.**

La velocidad de barrido ( $V_b$ ) viene definida como el producto de la frecuencia por el incremento de scan. En voltamperometría de onda cuadrada la intensidad de pico aumenta a medida que lo hace  $V_b$ .

Sobre una muestra de las características ya mencionadas, se registraron los voltamperogramas entre  $-0.5$  y  $-1.2$  V en las condiciones seleccionadas en apartados anteriores y tomando como valores de frecuencia 10, 25, 50, 75, 100 y 120 Hz, en los sucesivos registros.

Los resultados obtenidos en esta experiencia quedan reflejados en la tabla 8.7, donde aparecen los valores de  $I_P$  y  $E_P$  junto a sus correspondientes datos de frecuencia.

**Tabla 8.7.** Variación de  $I_P$  y  $E_P$  con la frecuencia para Mifepristone

Frecuencia (Hz)	$V_b$ (mV/s)	$E_P$ (V)	$I_P$ (nA)	
			$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 30 s
10	100	-0.900	12.25	89.1
25	250	-0.920	25.51	190.6
50	500	-0.930	42.00	326.1
75	750	-0.940	55.69	450.2
100	1000	-0.940	67.97	566.6
120	1200	-0.940	78.59	683.0

Las ecuaciones siguientes muestran la relación lineal que existe entre la intensidad de pico y la frecuencia:

**$t_{ac} = 0 \text{ s}$**

$$I_p = (9.73 \pm 5.64) + (0.59 \pm 0.07) f \quad r^2 = 0.9978 \quad (n=6)$$

**$t_{ac} = 30 \text{ s}$**

$$I_p = (51.01 \pm 25.35) + (5.26 \pm 0.34) f \quad r^2 = 0.9978 \quad (n=6)$$

Como se observa en la tabla 8.7 el aumento de la frecuencia produce un desplazamiento de los potenciales de pico hacia valores más negativos, debido a la alta velocidad de barrido utilizada, así como un aumento proporcional del valor de la intensidad de pico. Se eligió como valor óptimo una frecuencia de 120 Hz, la cual producía un aumento en la sensibilidad y originaba un voltamperograma con una gran rapidez, siendo el tiempo estimado de 0.58 segundos.

### ***d. Influencia del incremento de scan.***

Como se ha comentado anteriormente el incremento de scan influye en la velocidad de barrido y ésta a su vez en la intensidad del pico de reducción del compuesto de interés.

Con intención de optimizar este parámetro se preparó una disolución igual que en los casos anteriores. Los voltamperogramas fueron registrados entre -0.5 y -1.2 V en las condiciones seleccionadas y variando los valores de  $\Delta s$  entre 2 y 10 mV.

En la tabla 8.8 se recogen los resultados obtenidos en esta experiencia. De este estudio podemos concluir que conforme aumenta el valor de  $\Delta s$  aumenta la magnitud de la señal medida, para ambos casos. Se seleccionó como óptimo un  $\Delta s$  de 10 mV para un tiempo de acumulación de 0 s y 6 mV para 30 s porque nos permitía conseguir una sensibilidad elevada así como una definición aceptable del pico de reducción. En los dos casos se obtiene el voltamperograma con gran rapidez, en menos de un segundo.

*Tabla 8.8. Variación de  $I_p$  y  $E_p$  con el  $\Delta s$  para Mifepristone.*

$\Delta s$ (mV)	$V_b$ (mV/s)	$E_p$ (V)	$I_p$ (nA)	
			$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 30 s
2	240	- 0.930	28.8	208.7
4	480	- 0.940	48.9	419.4
6	720	- 0.940	70.4	603.2
8	960	- 0.940	90.17	759.1
10	1200	- 0.940	112.3	888.4

***e. Influencia de la magnitud del pulso aplicado.***

Este parámetro instrumental también influye en la intensidad del pico de reducción del compuesto, de manera que disminuye al aumentar el pulso aplicado.

Para ello se preparó una disolución de 10 mL de  $2.0 \times 10^{-7}$  M de mifepristone, 0.010 M HClO<sub>4</sub>, cuyo pH fue 2.0 y fue tratada en las condiciones inertes ya mencionadas, registrándose a continuación los voltamperogramas en las condiciones instrumentales seleccionadas en apartados anteriores y tomando

el incremento de pulso ( $\Delta E$ ) los valores comprendidos entre 5 y 80 mV en los sucesivos registros consecutivos.

En la tabla 8.9 se muestran los valores de  $I_P$  y de  $E_P$  obtenidos al realizar esta experiencia para los valores dados de  $\Delta E$ . Podemos observar como a medida que aumenta la magnitud del pulso aplicado se produce un aumento de la señal hasta 40 mV, disminuyendo para valores superiores. Elegimos como valor óptimo de este parámetro aquel que proporcionase la mayor señal, 40 mV, sin producir, por otra parte, ensanchamientos del pico de reducción.

**Tabla 8.9.** Variación de  $I_P$  y  $E_P$  con el  $\Delta E$  para Mifepristone.

$\Delta E$ (mV)	$E_P$ (V)	$I_P$ (nA)	
		$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 30 s
5	-0.920	24.7	185.5
10	-0.930	45.3	463.7
20	-0.930	57.5	649.2
40	-0.940	110.0	834.7
80	-0.940	85.4	742.3



**f. Influencia del área del electrodo de trabajo.**

La intensidad de pico aumenta con el área del electrodo debido a que existe una proporcionalidad entre estos dos conceptos.

Con intención de optimizar este parámetro se preparó una muestra de 10 mL de  $2.0 \times 10^{-7}$  M de mifepristone, 0.010 M HClO<sub>4</sub>, cuyo pH fue 2.0 y en las condiciones inertes mencionadas. Los voltamperogramas correspondientes a este experimento se registraron en las condiciones instrumentales ya optimizadas y utilizando como valores de tamaño de área: pequeño, mediano y grande en los sucesivos registros llevados a cabo en esta experiencia. En la tabla 8.10 se muestran los valores de  $I_p$  y  $E_p$  obtenidos.

**Tabla 8.10.** Variación de  $I_p$  y  $E_p$  con tamaño del área.

Tamaño Área (cm <sup>2</sup> )	$E_p$ (V)	$I_p$ (nA)	
		$t_{ac}$ 0 s	$t_{ac}$ 30 s
<b>Pequeño (0.010)</b>	- 0.940	23.7	198.3
<b>Medio (0.016)</b>	- 0.940	42.0	358.2
<b>Grande (0.025)</b>	- 0.940	73.0	602.0

En la tabla expuesta se aprecia como el valor de  $E_p$  no se ve afectado por el tamaño del área, mientras que la intensidad de la señal aumenta proporcionalmente con el tamaño de la gota. Elegimos como resultado de este experimento el tamaño del área grande para llevar a cabo la determinación de mifepristone, ya que era el que proporcionaba la mayor sensibilidad.

***g. Condiciones químicas e instrumentales finales***

El estudio precedente permitió establecer las condiciones químicas e instrumentales óptimas a partir de las cuales se procedió a obtener las rectas de calibrado para la cuantificación de mifepristone. Las condiciones finales se resumen en la tabla 8.11.

*Tabla 8.11. Condiciones finales*

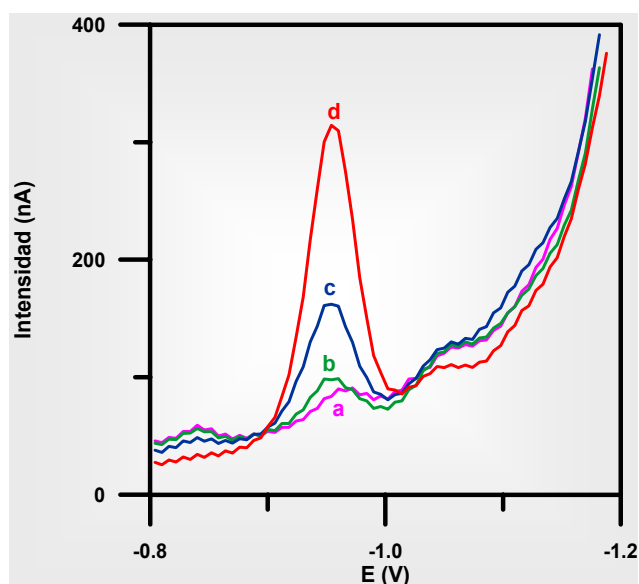
<b>pH del medio</b>	2.0
<b>Fuerza iónica</b>	0.010 M, HClO <sub>4</sub>
<b>t<sub>ac</sub></b>	0 y 30
<b>E<sub>ac</sub></b>	-0.5 V
<b>Δs</b>	10 mV, t <sub>ac</sub> = 0 s
	6 mV, t <sub>ac</sub> = 30 s
<b>ΔE</b>	40 mV
<b>Frecuencia</b>	120 Hz
<b>Tamaño del área</b>	Grande (0.025 cm <sup>2</sup> )

#### **8.3.4. Calibrado y estudio estadístico**

Una vez optimizados los parámetros instrumentales propios de la técnica utilizada se procedió al establecimiento de rectas de calibrado en las condiciones químicas e instrumentales seleccionadas. Para ello se prepararon 10 mL de una disolución 0.010 M de HClO<sub>4</sub>, sobre la cual directamente en la celda voltamperométrica se fue adicionando el compuesto mifepristone variando así

su concentración (las concentraciones fueron recalculadas teniendo en cuenta el volumen de disolución añadido). Los voltamperogramas se registraron en las condiciones seleccionadas. En cada uno de los casos, antes del registro del voltamperograma la muestra fue previamente desaireada haciendo burbujear N<sub>2</sub> de alta pureza durante unos minutos.

En las figuras 8.12 y 8.13 se reflejan los voltamperogramas correspondientes a algunas de las concentraciones utilizadas en el calibrado de mifepristone para tiempos de acumulación 0 y 30 s, respectivamente. En estas figuras podemos observar como aumenta la señal de medida con la concentración de mifepristone empleada permaneciendo relativamente constante el potencial del pico de reducción observado. En la tabla 8.12 quedan reflejadas las ecuaciones de las rectas de calibrado ( $\alpha = 0.05$ ), así como los intervalos de linealidad. En esta tabla se puede apreciar que las dos rectas de calibrado para los dos tiempos de acumulación tienen una ordenada en el origen despreciable y coeficientes de correlación próximos a la unidad.

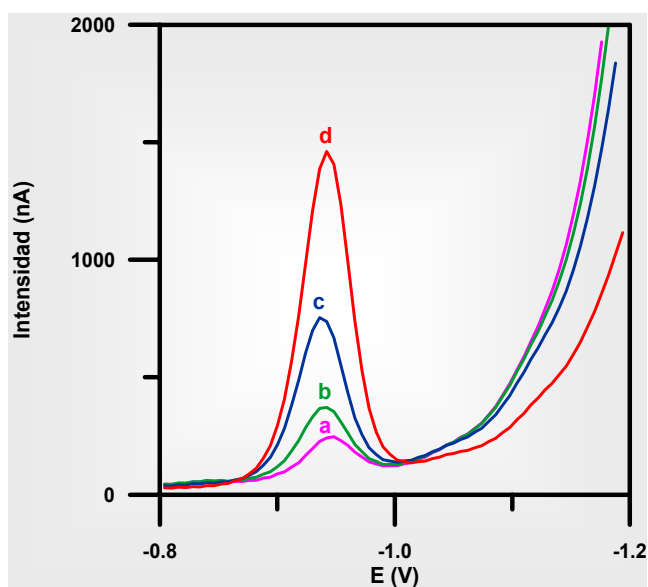


**Figura 8.12.** Voltamperogramas de Mifepristone de concentraciones (a)  $4.4 \times 10^{-8}$  M; (b)  $7.7 \times 10^{-8}$  M; (c)  $1.9 \times 10^{-7}$  M; (d)  $5.4 \times 10^{-7}$  M, para tiempo de acumulación 0 s.

**Tabla 8.12.** Rectas de calibrado

$t_{ac}$ (s)	Ecuación	$R^2$	Rango lineal
0	$I_p = (15.25 \pm 19.65) + (6.51 \times 10^8 \pm 3.67 \times 10^7) C$	0.997	$2.4 \times 10^{-8} - 5.4 \times 10^{-7} M$
30	$I_p = (13.67 \pm 63.29) + (3.15 \times 10^9 \pm 2.48 \times 10^8) C$	0.998	$2.4 \times 10^{-8} - 5.4 \times 10^{-7} M$

Donde  $I_p$  es la intensidad de pico (nA) y C es la concentración de mifepristone expresada en términos de Molaridad.



**Figura 8.13.** Voltamperogramas de Mifepristone de concentraciones (a)  $4.4 \times 10^{-8}$  M; (b)  $7.7 \times 10^{-8}$  M; (c)  $1.9 \times 10^{-7}$  M; (d)  $5.4 \times 10^{-7}$  M, para tiempo de acumulación 30 s.

La precisión dentro de un mismo día se evaluó en base a 10 mL de una disolución de  $2.0 \times 10^{-7}$  M de mifepristone en  $\text{HClO}_4$  0.010 M (pH 2.0) en las condiciones inertes mencionadas, registrándose a continuación 10 voltamperogramas entre  $-0.5$  y  $-1.2$  V en las condiciones optimizadas. La tabla

8.13 muestra los valores medios y la desviación estándar relativa dentro de un mismo día.

*Tabla 8.13. Valores medios, DE y DER*

$t_{ac}$ (s)	$I_p$ media (nA)	DE	DER
0	103.0	1.21	1.17
30	635.7	12.84	2.02

### ***8.3.5. Determinación de Mifepristone en orina***

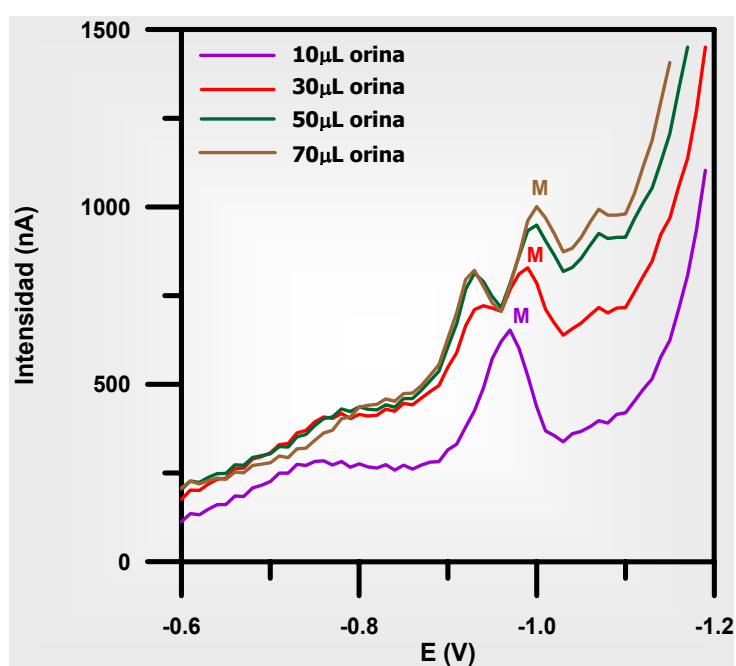
La determinación de este compuesto se llevó a cabo en orina mediante la técnica propuesta. En un primer estudio se vio la influencia de la cantidad de orina en la celda voltamperométrica con respecto a la señal de medida y la definición del pico de reducción de mifepristone. Para ello, se adicionó a la celda que contenía la disolución de  $HClO_4$  0.010 M (pH 2.0) una cantidad constante de mifepristone equivalente a  $4.6 \times 10^{-7}$  M. A continuación se fueron adicionando cantidades variables y crecientes de orina (10-70  $\mu$ L) registrándose los voltamperogramas en cada adición en las condiciones instrumentales

seleccionadas anteriormente. Las figuras 8.14 y 8.15 muestran como influye la cantidad de orina en la celda voltamperométrica en la definición de los voltamperogramas.

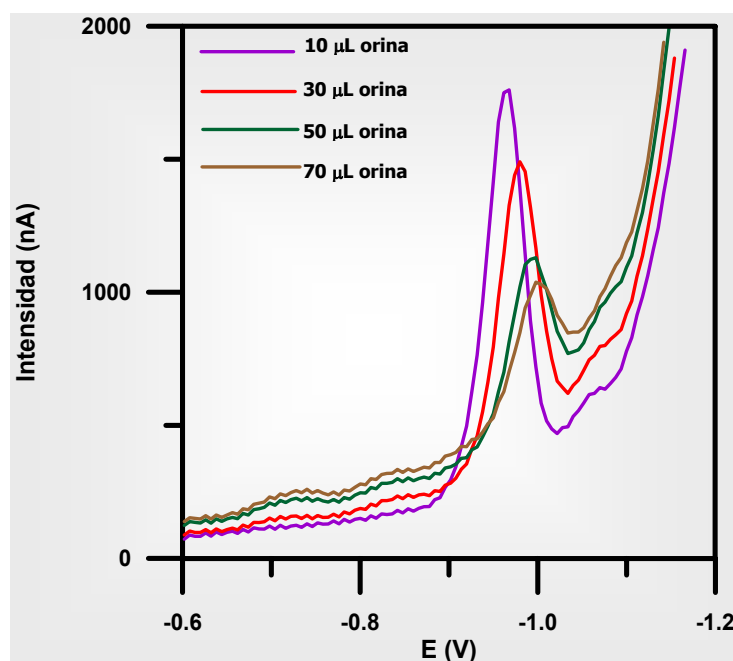
Para un tiempo de acumulación 0 s (figura 8.14), se puede observar que a medida que aumenta la cantidad de orina en la celda voltamperométrica aparece un nuevo proceso de reducción debido a algún componente de la orina que difundía hacia el electrodo reduciéndose a potenciales muy próximos al de mifepristone. Sin embargo, para un tiempo de acumulación de 30 s (figura 8.15) la intensidad de pico de mifepristone disminuía a medida que aumentaba la cantidad de orina debido a un aumento de la fuerza iónica en el medio y por lo tanto a una menor velocidad de llegada de mifepristone al electrodo de trabajo. Además, se puede observar que los componentes de la orina, que muestran un proceso de reducción próximo al mifepristone, no manifiestan la etapa de acumulación con lo que se ven discriminados en el proceso de preconcentración, no interfiriendo de esta forma en la modalidad de voltamperometría de redisolución adsortiva.

Por tanto, de este estudio podemos concluir que la cantidad de orina en la celda voltamperométrica es importante a la hora de determinar Mifepristone, porque de ella depende la fuerza iónica del medio y la cantidad de componentes de la orina que puedan interferir en la medida. Para aplicaciones sucesivas en orina, un volumen de 50  $\mu\text{L}$  fue seleccionado como volumen óptimo de trabajo.





*Figura 8.14. Influencia de la cantidad de orina en la celda voltamperométrica para una muestra de  $4.6 \times 10^{-7}$  M de Mifepristone. Tiempo de acumulación 0 s.*



**Figura 8.15.** Influencia de la cantidad de orina en la celda voltamperométrica para una muestra de  $4.6 \times 10^{-7}$  M de Mifepristone. Tiempo de acumulación 30 s.

Posteriormente, se realizaron calibrados de mifepristone en diferentes orinas, para ello se eligieron mujeres con diferentes niveles hormonales (mujer A no embarazada, mujer B de 18 semanas de gestación y mujer C de 20 semanas de gestación). Esta experiencia se llevó a cabo de la siguiente manera: 50 µL de orina, sin necesidad de ningún tratamiento previo adicional, fueron adicionados sobre 10 mL de disolución de  $\text{HClO}_4$  0.010 M (pH 2.0), los cuales fueron antes desaireados mediante la utilización de  $\text{N}_2$  de alta pureza durante diez minutos. A

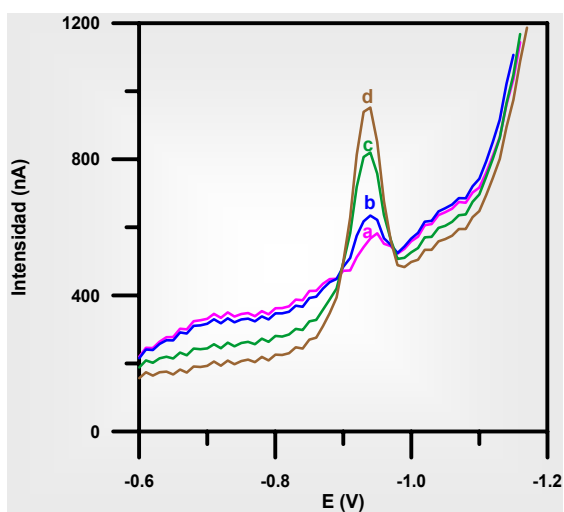
continuación, se fue adicionando el compuesto mifepristone, directamente en la celda voltamperométrica, variando así su concentración y registrándose los voltamperogramas en las condiciones instrumentales seleccionadas anteriormente. En cada uno de los casos, antes del registro del voltamperograma la muestra fue previamente desaireada haciendo burbujear  $N_2$  de alta pureza durante unos minutos.

En la tabla 8.14 quedan reflejadas las diferentes rectas de calibrado obtenidas según el tipo de orina utilizado para los tiempos de acumulación 0 y 30 segundos. En las figuras 8.16 y 8.17 se muestran los voltamperogramas correspondientes a algunas de las concentraciones utilizadas en el calibrado de mifepristone en orina de mujer A.

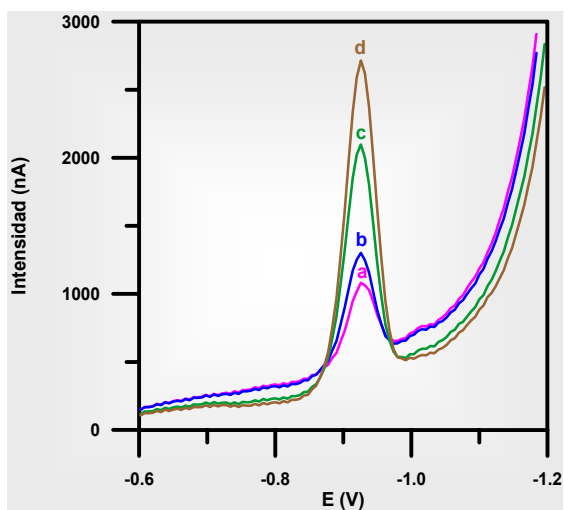
*Tabla 8.14. Rectas de calibrado*

$t_{ac}$ (s)	Ecuación	R <sup>2</sup>	Rango Lineal
<b>Mujer A</b>			
0	[1] $I_p = (-46.46 \pm 11.51) + (9.27 \times 10^8 \pm 3.11 \times 10^7) C$	0.999	$1.44 \times 10^{-7} - 6.46 \times 10^{-7} M$
30	[2] $I_p = (-22.98 \pm 31.78) + (3.58 \times 10^9 \pm 1.09 \times 10^8) C$	0.998	$6.22 \times 10^{-8} - 3.13 \times 10^{-7} M$
<b>Mujer B (embarazada 18 semanas)</b>			
0	[3] $I_p = (-137.60 \pm 35.56) + (1.15 \times 10^9 \pm 6.19 \times 10^7) C$	0.996	$2.45 \times 10^{-7} - 6.83 \times 10^{-7} M$
30	[4] $I_p = (-26.14 \pm 25.03) + (2.88 \times 10^9 \pm 1.30 \times 10^8) C$	0.996	$6.22 \times 10^{-8} - 3.27 \times 10^{-7} M$
<b>Mujer C (embarazada 20 semanas)</b>			
0	[5] $I_p = (-98.20 \pm 72.44) + (1.10 \times 10^9 \pm 1.55 \times 10^8) C$	0.994	$2.45 \times 10^{-7} - 6.75 \times 10^{-7} M$
30	[6] $I_p = (-16.97 \pm 58.02) + (2.25 \times 10^9 \pm 2.77 \times 10^8) C$	0.995	$6.24 \times 10^{-8} - 3.24 \times 10^{-7} M$

Donde  $I_p$  es la intensidad de pico (nA) y C es la concentración de mifepristone expresada en términos de Molaridad.



**Figura 8.16.** Voltamperogramas de Mifepristone en orina de mujer A de concentraciones (a)  $1.44 \times 10^{-7}$  M; (b)  $2.15 \times 10^{-7}$  M; (c)  $4.59 \times 10^{-7}$  M; (d)  $6.46 \times 10^{-7}$  M, para tiempo de acumulación 0 s.



**Figura 8.17.** Voltamperogramas de Mifepristone en orina de mujer A de concentraciones (a)  $1.44 \times 10^{-7}$  M; (b)  $2.15 \times 10^{-7}$  M; (c)  $4.59 \times 10^{-7}$  M; (d)  $6.46 \times 10^{-7}$  M, para tiempo de acumulación 30 s.

Se llevó a cabo el análisis de varianza (test ANOVA) para comparar las diferentes rectas de calibrado que se habían realizado, con el fin de comprobar si existían diferencias significativas entre ellas. Si el valor de F experimental ( $F_{exp}$ ) es menor que el valor de F teórico ( $F_{teor}$ ) no hay diferencias significativas entre las varianzas, sin embargo si  $F_{exp}$  es mayor que  $F_{teor}$  si habrá diferencias significativas. El test estadístico  $t$  se lleva a cabo para comparar las diferentes pendientes de las rectas de calibrado. Si el valor experimental  $t$  ( $t_{exp}$ ) es menor que el teórico ( $t_{teor}$ ) no habrá diferencias significativas entre las pendientes de las rectas de calibrado. En la tabla 8.15 se muestran los valores de F y  $t$ .

**Tabla 8.15. Análisis de varianza**

<b>Rectas de calibrado</b>	<b><math>F_{exp}</math></b>	<b><math>F_{teor}</math></b>	<b><math>t_{exp}</math></b>	<b><math>t_{teor}</math></b>
<b>[1] y [3]</b>	10.650	6.260	6.797	2.586
<b>[2] y [4]</b>	3.648	3.370	5.212	2.420
<b>[3] y [5]</b>	1.080	5.410	1.697	2.310
<b>[4] y [6]</b>	1.350	3.860	6.434	2.180

Se pudo comprobar que existían diferencias significativas entre las rectas de calibrado (([1] y [3]) y ([2] y [4])) correspondientes a Mujer A (no embarazada) y Mujer B (embarazada de 18 semanas) para los dos tiempos de acumulación y entre las rectas de calibrado ([4] y [6]) correspondientes a Mujer B y Mujer C (embarazada de 20 semanas) utilizando en este caso 30 s de acumulación. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las rectas obtenidas a partir de orina de Mujer B y Mujer C ([3] y [5]) utilizando 0 s de acumulación. Este hecho podría deberse a los posibles cambios de fuerza iónica de las diferentes orinas utilizadas en el estudio.

Como conclusión de este estudio, podemos decir que la determinación de mifepristone en orina no se podrá llevar a cabo por medida directa sino utilizando el método de las adiciones estándar porque depende de la orina que estemos utilizando. De nuevo, los métodos electroquímicos necesitan utilizar esta metodología para evitar los diferentes efectos de la matriz biológica (fuerza iónica, metabolitos biológicos, farmacología del embarazo, creatinina, diferentes ureas, etc).

### ***a) Límites de detección y cuantificación***

Como en el capítulo anterior, el procedimiento utilizado para establecer los límites de detección y de cuantificación se basa en los datos obtenidos en la recta de calibrado. Para ello, se calcularon a partir de las rectas de calibrado de

50  $\mu$ L de orina mujer A (rectas [1] y [2], para tiempos de acumulación de 0 y 30 s, respectivamente). Los límites de detección y de cuantificación se muestran en la tabla 8.16.

*Tabla 8.16. Límites de detección y cuantificación*

$t_{ac}$ (s)	LD (M)	LC (M)
0	$3.50 \times 10^{-8}$	$1.05 \times 10^{-7}$
30	$1.91 \times 10^{-8}$	$5.74 \times 10^{-8}$

### ***b) Precisión***

Para llevar a cabo este estudio se preparó una muestra de la siguiente manera: se adicionaron 50  $\mu$ L de orina dopada con una cantidad de mifepristone para obtener una concentración final de  $2.3 \times 10^{-7}$  M en la celda voltamperométrica, sin necesidad de ningún tratamiento previo, sobre 10 mL de una disolución de HClO<sub>4</sub> 0.010 M, pH 2.0. A continuación, se registraron sucesivamente nueve voltamperogramas en las condiciones seleccionadas como óptimas.



Para evaluar la reproducibilidad entre días consecutivos, se preparó otra muestra igual que la anteriormente citada y se volvieron a registrar nueve voltamperogramas consecutivos en las mismas condiciones seleccionadas.

Se compararon las varianzas de las series según el test estadístico F de Snedecor para pruebas de dos colas. De esta manera, se encontró que no existían diferencias significativas entre las series para un intervalo de confianza del 95%.

Los resultados obtenidos, en términos de medias, desviación estándar (DE) y porcentaje de desviación estándar relativa (DER) se muestran en la tabla 8.17.

**Tabla 8.17.** Valores medios, DE y DER

	$t_{ac}$ 0 s		$t_{ac}$ 30 s	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
<b><math>I_p</math> media (nA)</b>	158	155	745	739
<b>DE</b>	2.88	3.15	5.15	7.63
<b>DER</b>	1.82	2.03	0.69	1.03
<b><math>F_{exp}</math></b>	0.84		0.45	
<b><math>F_{teor}</math></b>	4.43		4.43	

***c) Aplicaciones***

Para comprobar la validez del método propuesto se prepararon cuatro orinas diferentes a las que se adicionaron cantidades variables de mifepristone, analizándose cada una de ellas por triplicado mediante voltamperometría de onda cuadrada con tiempos de acumulación de 0 y 30 s. El procedimiento operatorio fue el siguiente: sobre una disolución de 10 mL de HClO<sub>4</sub> 0.010 M, previamente purgada con N<sub>2</sub> de alta pureza durante 10 minutos, se adicionó un volumen de 50 µL de muestra problema, los cuales no necesitaron ningún tratamiento previo. En todos los casos se utilizó el método de las adiciones estándar para realizar la determinación de este compuesto. Los voltamperogramas fueron registrados en las condiciones ya establecidas para la técnica propuesta.

En la tabla 8.18 se recogen los valores de recuperación para las diferentes muestras preparadas en el laboratorio. Como se puede observar en la tabla se obtuvieron mejores valores de recuperación cuando se utilizó 30 s como tiempo de acumulación. Los malos resultados obtenidos para un tiempo de acumulación de 0 s puede ser debido a la presencia de interferentes presentes de forma natural en la orina, que mostraban posibles reducciones a un potencial próximo al de mifepristone y que ya se manifestaron en el estudio indicado anteriormente sobre la influencia de la cantidad de orina en la celda voltamperométrica (figura 8.14).

*Tabla 8.18. Recuperaciones obtenidas en las muestras preparadas en el laboratorio*

MUESTRA	Mifepristone (*)	Recuperación (%)	
		t <sub>ac</sub> 0 s	t <sub>ac</sub> 30 s
M 1	1.25×10 <sup>-7</sup>	92	88
M 2	1.84×10 <sup>-7</sup>	76	108
M 3	2.15×10 <sup>-7</sup>	46	96
M 4	3.04×10 <sup>-7</sup>	57	107

(\*) Concentración molar de mifepristone en la celda voltamperométrica.

Por tanto, la metodología electroquímica propuesta permite el análisis de mifepristone en orina a pesar de ser tan baja su excreción en dicho fluido biológico (solo el 10% con respecto a la posología del fármaco) y poder controlar así la evolución en el proceso de aborto inducido farmacológicamente con su administración hospitalaria.

Conclusiones



✓ La electroforesis capilar en zona permite la separación y determinación de imatinib y su metabolito en menos de 5 minutos en muestras de orina, las cuales no necesitarían ningún tratamiento previo. Además, una de las ventajas de este método propuesto es la inyección por el lado corto del capilar, lo que supone una gran discriminación del tiempo de análisis.

✓ Las técnicas electroquímicas de redisolución adsortiva mediante barrido por onda cuadrada permiten cuantificar globalmente el contenido de imatinib y su metabolito en orina humana, sin tratamiento previo de la muestra, siendo necesario un volumen total de orina de 25  $\mu\text{L}$  y necesitándose menos de un segundo en el barrido voltamperométrico.

✓ Se proponen dos métodos analíticos, sencillos, rápidos y reproducibles, para la determinación, por electroforesis capilar, de citrato de sildenafil y su metabolito principal (UK-103,320) en suero humano utilizando una etapa previa de extracción en fase sólida.

✓ Se constata la utilidad de la electroforesis capilar electrocinética micelar en la separación y determinación del citrato de sildenafil y su metabolito principal UK-103,320 que permite proponer esta técnica como alternativa en laboratorios farmacéuticos de control de calidad.

✓ La utilización de capilares con una celda de detección en forma de burbuja permite disminuir sensiblemente los límites de detección de citrato de sildenafil y su principal metabolito, sin pérdida significativa de resolución.

✓ Las técnicas electroquímicas de redisolución adsortiva mediante barrido por onda cuadrada permiten cuantificar globalmente citrato de sildenafil y su principal metabolito en suero (previa extracción en fase sólida) y

## **Conclusiones**

---

en orina (sin tratamiento previo), necesitándose menos de un segundo en el barrido voltamperométrico.

✓ Se establecen las condiciones químicas más adecuadas y los parámetros instrumentales necesarios para obtener los voltamperogramas, mediante voltamperometría de redisolución adsorbtiva por onda cuadrada, que permiten determinar cuantitativamente mifepristone en muestras de orina (sin tratamiento previo de las mismas), alcanzándose como es usual en las técnicas electroquímicas, una alta sensibilidad en el análisis.

## Bibliografía





1. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. *Nat. Med.* **1996**, 2, 561.
2. Deininger MWN, Goldman JM, Lydon N, et al. *Blood.* **1997**, 90, 3691.
3. Gambacorti-Passerini C, le Coutre P, Mologni L, et al. *Blood Cells Mol Dis*, **1997**, 23, 380.
4. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, et al. *J Pharmacol Exp Ther.* **2000**, 295, 139.
5. Glivec Summary of Product Characteristic. Basel, Switzerland: Novartis Pharma AG; 2001.
6. Sawyers CL, *N Engl J Med.* **1999**, 340, 1330.
7. Sacchi S, Kantarjian HM, O'Brien S, Cortrs J, Rios MB, Giles FJ, et al. *Cancer*, **1999**, 86, 2632.
8. Kantarjian HM, Giles FJ, O'Brien SM, et al. *Hematol Oncol Clin North Am.*, **1998**, 12, 31.
9. Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M. *Oncology*, **1999**, 13, 169.
10. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, et al. *Ann Intern Med.*, **1999**, 131, 207.
11. Hill JM, Meehan KR. *Postgrad Med.*, **1999**, 106, 149.
12. Cortes JE, Talpaz M, Kantarjian H. *Am J Med.*, **1996**, 100, 555.
13. Rowley JD. *Nature*, **1973**, 243, 290.
14. Nowell PC, Hungerford DA. *Science*, **1960**, 132, 1497.
15. NoWell PC, Hungerford DA. *J Natl Cancer Inst.*, **1961**, 27, 1013.
16. Pasternak G, Hochhaus A, Schultheis B, et al. *J Cancer Res Clin Oncol.*, **1998**, 124, 643.

## Bibliografía

---

17. Faderl S, Talpaz M, Estrv Z, et al. *N Engl J Med.*, **1999**, 341, 164.
18. Enright H, McGlave P. *Hematology*, **2000**, 3, 1155.
19. Gleevec. Ficha Técnica de la especialidad. The European Agency for Evaluation of Medicinal Products (EMA). Committee for Proprietary Medical Products (CPMP). European Public Assessment Report (EPAR): Gleevec. <http://www.eudra.org/emea.html>.
20. Savage DG, Antman KB. Imatinib mesylate – A new oral targeted therapy. *N Engl J Med.*, **2002**, 346, 683.
21. Data on File. Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland, 2001
22. Bakhtiar R, Khemani L, Hayes M, Bedman T, Tse F. *J Pharm Biomed Anal*, **2002**, 28(6), 1183.
23. Bakhtiar R, Lohne J, Ramos L, Khemani L, Hayes M, Tse F. *J Chromatogr B*, **2002**, 768(2), 325.
24. Parise RA, Ramanathan RK, Hayes MJ, Egorin MJ, *J Chromatogr B*, **2003**, 791(1-2), 39.
25. G. Brock, *Nature*, **1994**, 372, 1.
26. AL. Burnett, *J. Urol.*, **1997**, 157, 320.
27. T. Lue, Physiology of erection and pathophysiology of impotence. *Campbell's Urology*. 7<sup>th</sup>. Edition., **1998**, Chapter 16.
28. J.A Lugg, NF González-Cadavid, J. Rajfer. *J. Androl.*, **1995**, 16, 2.
29. J.J. Berzas; J. Rodríguez; G. Castañeda; M.J. Villaseñor. *Anal. Chim. Acta.*, **2000**, 417(2), 143.

30. Y.M. Liu; H.C. Yang; J.R. Miao. *Yaowu. Fenix. Zazhi.*, **2000**, 20(1), 61.
31. G. Altiokka; Z. Atkosar; E. Sener; M. Tuncel., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2001**, 25(2), 339.
32. M.N. Reddy; T.K. Murthy; Y.S. Rao; K. Sushma, D.G. Sankar., *Indian. Drugs.*, **2002**, 39(2), 106.
33. M.C. Tseng; J.H. Lin., *Yaowu. Shinpin. Fenxi.*, **2002**, 10(2), 112.
34. J.J. Berzas; J. Rodríguez; M.J. Villaseñor; A.M. Contento; M.P. Cabello., *Chromatogr.*, **2002**, 55(9-10), 601.
35. N.D. Dinesh; B.K. Vishukumar; P. Nagaraja; M.N. Made-Gowda; K.S. Rangappa., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**, 29(4), 743.
36. N. Daraghme; M. Al-Omari; A.A. Badwan; A.M.Y. Jaber., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2001**, 25(3-4), 483.
37. I.C. Bhoir; S.I. Bhoir; V.R. Bari; A.M. Bhagwat; M. Sundaresan., *Indian. Drugs.*, **2000**, 37(7), 319.
38. J.K. Lalla; P.D. Hamrapukar; M.U. Shah; P.M. Vyas., *Indian. Drugs.*, **2001**, 38(6), 327.
39. A. Tarcqui; B. Ludes; *J. Anl. Toxicol.*, **2003**, 27(2), 88.
40. J.D.H. Cooper; D.C. Muirhead; J.E. Taylor; P.R. Baker., *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, **1997**, 701(1), 87.
41. C.K. Jeong; H.Y. Lee; M.S. Jang; W.B. Kim; H.S. Lee., *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.*, **2001**, 752(1), 141.

## Bibliografía

---

42. K. Saisho; K.S. Scott; S. Morimoto; Y. Nakahara., *Biol. Pharm. Bull.*, **2001**, 24(12), 1384.
43. A. Eerkes; T. Addison; N.D. Weng., *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life. Sci.*, **2002**, 768(2), 277.
44. J. Kim; H. Ji; S.J. Kim; S.S. Lee; D.S. Kim; M. Yoo; W.B. Kim; H.S. Lee., *J.Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 32(2), 317.
45. Z. Ye; G. Zhang; X. Bai., *Sepu.*, **1987**, 5(3), 179.
46. X. Wu; Y. Song., *Yaowu. Fenxi. Zazhi.*, **1992**, 12(6), 347.
47. X. Wu; Y. Song., *Yaowu. Fenxi. Zazhi.*, **1992**, 12(1), 54.
48. G. Zhang; Z. Ye; Y. Shin; C. He; X. Bai; J. Xu., *Shengzhi. Yu. Biyun.*, **1991**, 11(1), 26.
49. Y.H. Zeng; G.R. Zhang., *Fenxi. Huaxue.*, **1997**, 25(11), 1278.
50. Y.H. Zeng; H.Y.Liu., *Fenxi. Huaxue.*, **1997**, 25(2), 181.
51. C. Gao; Z.G. Zhao; Y. Wang; S.P. Ren., *Yao. Fenxi. Zazhi.*, **2000**, 20(2), 119.
52. K. Gu; J.J. Zhu; Y.L. Zhu; J.Z. Xu; H.Y. Chen., *Fresenius. J. Anal. Chem.*, **2000**, 368(8), 832.
53. J.Z. Xu; J.J. Zhu; Y.L. Zhu; K. Gu; H.Y. Chen., *Anal. Lett.*, **2001**, 34(4), 503.
54. C.J. Zhao; L.P. Dai; Y.J. E., *Shenyang. Yaoke. Daxue. Xuebao.*, **2002**, 19(2), 87.
55. C. Stith; M.D. Hussain., *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life. Sci.*, **2003**, 794(1), 9.

56. R. Weinberger, *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press., INC., Londres, Gran Bretaña, **1993**.
57. S.F. Y. Li, *Capillary Electrophoresis, Principles, Practice and Applications*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Holanda, **1992**.
58. F. Kohlrausch, *Ann Phys. Chem*, **1987**, 62, 209.
59. A. Tiselius, *Trans. Faraday Soc.*, **1937**, 33, 524.
60. S. Hjertén, *Chromatogr.*, **1967**, 9, 122.
61. F.M. Everaerts, J. L. Beckers, Verheggen (eds.), Th. P.E.M., *Isotacophoresis, Theory, Instrumentation and Applications*, J. Chromatogr. Library, Elsevier, Amsterdam, Oxford, Nueva York (1976).
62. R. Virtanen, *Acta Polytechnica Scand.*, **1974**, 1, 123.
63. F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, Th.P.E.M. Verheggen, *J. Chromatogr.*, **1979**, 11, 169.
64. J. Jorgenson, K. Luckacs, *Anal. Chem.*, **1981**, 53, 1298.
65. J. Jorgenson, K. Luckacs, *Anal. Chem.*, **1981**, 218, 209.
66. C. Blanco, *Electroforesis Capilar*, Universidad de Almería, Servicio de Publicaciones, Almería, **1998**.
67. R. Weinberger, *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press Limited, United Kingdom Edition, **1993**.
68. B. Chankvetazde, *Capillary Electrophoresis in Chiral Analyses*, John Wiley & sons Editions, **1994**.

## Bibliografía

---

69. K. D. Altria, *Capillary Electrophoresis Guidebook, principle, operations and applications*, Humana Press, Vol. 2, **1996**.
70. H. Shintani, J. Polonsky, *Handbook of Capillary Electrophoresis applications*, Blackie academic & professional, **1997**.
71. W. Khur, *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 403R.
72. W. Khur, A. Monnig, *Anal Chem.*, **1992**, 64, 389.
73. A. Monning, R. Kennedy, *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 280.
74. R. Claire, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 569.
75. R. Khun, S. Hoffster Khun, *Capillary Electrophoresis. Principles and Practice*. Springer Laboratory.
76. D. R. Baker, *Capillary Electrophoresis*, Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., **1995**.
77. D. Heiger, *High Performance Capillary Electrophoresis*, Hewlett-Packard Company, Alemania, **1992**.
78. B. VanOrman,; G. Liversidge; G. Malnitre; T. Olefirowick; A. Ewing., *J. Microcol.*, **1991**, 2, 176.
79. C. Schwer; E. Kenndler, *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 1801.
80. H. Isaac; I. Atamna; G. Muschik; G. Janini, *Chromatographia*, **1991**, 23, 155.
81. K. D. Luckacs, J. W. Jorgerson, *J. High Res. Chromatog.*, **1985**, 8, 407.

82. L. Arce, A. Segura, A. Ríos, C. Cruces, A. Fernández, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 816, 243.
83. A. Vinther; H. Soeber, *J. Chromatogr.*, **1991**, 3, 559.
84. R. Khum, S. Hoffstetter Khun, *Capillary Electrophoresis. Principles and Practice*. Springer Laboratory.
85. D.R. Baker, *Capillary Electrophoresis*, Wiley-Interscience, John Wiley&Sons, Inc., **1995**.
86. D. N. Heiger, *High Performance Capillary Electrophoresis*, Hewlett-Packard Company, Alemania, **1992**.
87. X. Z. Wu, A. Hosaka, T. Hobo, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 2081.
88. R. Chien, D. S. Burgi, *Journal of Chromatography*, **1991**, 559, 141
89. R. Chien, D. S. Burgi, *Journal of Chromatography*, **1991**, 559, 153
90. R. L. Chien, D. S. Burgi, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 489A
91. J. Palmer, N. J. Muro, J. P. Landers, *Anal. Chem.*, **1999**, 71, 1679
92. X. Wu; A. Hosaka; T. Hobo., *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 2081
93. R. Chien; D. Burgi, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 1046.
94. T. Wang, J. H. Aiken, C. W. Huie, R. A. Hartwick, *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 1372
95. *Introduction to Capillary Electrophoresis*, Beckman Instruments, Inc. Fullerton, California, Volumen I, **1992**.
96. D. Heiger; P. Kaltenbach; H. Sievert, *Electrophoresis*, **1994**, 15, 1234
97. Y. Xue; E. Yeung, *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 3575



## Bibliografía

---

98. S. Terabe; K. Otsuka; A. Ichikuma; A. Tsuchiya; T. Ando, *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 111.
99. E. Pelizzetti, E. Pramauro, *Anal. Chim. Acta*, **1985**, 169, 1.
100. E. Pramauro, E. Pelizzetti, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol: XXXI, *Surfactants in Analytical Chemistry*, Nueva York **1992**.
101. J. K. Thomas, *Chem. Rev.*, **1980**, 80, 283.
102. K. Kawoka, A. U. Kahn, P. R. Kearns, *J. Chem. Phys.*, **1967**, 46, 1842.
103. W. L. Hinze, H. N. Singh, Y. Bara, N. G. Harvey, *Trends in Anal. Chem.*, **1984**, 3, 193.
104. A. T. Balchunas, M. J. Sepaniak, *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 617.
105. K. D. Altria, *Chromatographia*, **1993**, 35, 177.
106. S. Terabe; K. Otsuka; T. Ando, *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 834.
107. K. Otsuka; S. Terabe; T. Ando, *J. Chromatogr.*, **1986**, 63, 1820.
108. B. Widmon, P. Jackson, W. Jones, P. Alden, *J. Chromatogr.*, **1991**, 546, 459
109. B. Kenney, *J. Chromatogr.*, **1991**, 546, 423.
110. M. Ackermans, J. Beckers, F. Everaerts, H. Hoogland, H. Tomassen M., *J. Chromatogr.*, **1992**, 596, 101.
111. E. Jellun, A. Thorsrud, E. Time, *J. Chromatogr.*, **1992**, 559, 445.
112. J.J. Berzas, C. Guiberteau, A.M. Contento, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 378, 63.
113. J.J. Berzas, A.M. Contento, G. Castañeda, *Analyst*, **1999**, 124, 61.

114. W. Thormann, P. Meier, C. Maecolli, F. Binden, *J. Chromatogr.*, **1991**, 545, 449.
115. P. Pietta, P. Mauri, A. Rava, G. Sabbatini, *J. Chromatogr.*, **1991**, 549, 367.
116. C. Ong, C. Ng, N. Chong, H. Lee, S. Li, *J. Chromatogr.*, **1990**, 516, 263.
117. H. Nishi, M. Marsuo, *J. Liq. Chromatogr.*, **1991**, 14, 973.
118. G. Castañeda, E. Julien, H. Fabre, *Chromatographia*, **1996**, 42, 159.
119. K.D. Altria, *J. Chromatogr.*, **1993**, 646, 245.
120. P. Horvath, G. Balogh, J. Brlík, A. Csehi, F. Dravec, Z. Halmos, A. Lauko, M. Renyei, K. Varga, S. Gorog, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1997**, 15, 1343.
121. H. Fabre, G. Castañeda, *Journal of Liquid Chromatography*, **1995**, 18, 3877.
122. G. Castañeda, E. Julien, H. Fabre, *Chromatographia*, **1996**, 42, 159.
123. K.J. Potter, R.J.B. Allington, J. Algaier, *Journal of Chromatogr. A*, **1993**, 652, 427.
124. J. Heyrovsky, *Chem. Listy*, **1922**, 16, 256.
125. G.C. Barker; A.W. Gardner; *Anal. Chem.*, **1960**, 173, 179.
126. G.C. Barker; A.W. Gardner; *Anal. Chem.*, **1961**, 8, 4017.
127. E.P. Parry; R.A. Osteryoung; *Anal. Chem.*, **1965**, 37, 1634.
128. D.R. Ferrier; R.R. Schroeder; *J. Electroanal.*, **1973**, 45, 343.
129. R. Birke; M.H. Kin y M. Strassfeld; *Anal. Chem.*, **1981**, 53, 852.

## Bibliografía

---

130. J. B. Flato, *Anal. Chem.*, **1972**, *44*, 75<sup>a</sup>.
131. W.R. Heinman, P.T. Kissinger, *Amer. Lab.*, **1982**, *11*, 34.
132. L. Ramaley, M. S. Krause; *Anal. Chem.*, **1969**, *41*, 1362.
133. M S. Krause, L. Ramaley,; *Anal. Chem.* **1969**, *41*, 1365.
134. M.M. Correio; V. Familia; *Electroanalysis*, **2000**, *12(3)*, 216.
135. M.M. Correio; V. Familia; ***Anal. Bioanal. Chem.***, **2002**, *374(6)*, 1074.
136. M. Valcárcel, A. Ríos, *TRAC*, **1997**, *16*, 385.
137. M. Valcárcel, M. Luque de Castro, M. Tena, *Anal. Proc.*, **1993**, *30*, 276.
138. P. Meier; W. Thormann, *J. Chromatogr.*, **1991**, *559*, 505.
139. K. Yim, *J. Chromatogr.*, **1991**, *559*, 401.
140. J. Liu, Z. Hsieh, D. Wiesler, M. Novitny, *Anal. Chem.*, **1991**, *63*, 408.
141. A. Troun, T. Blanc, E. Leopold, *J. Chromatogr.*, **1990**, *516*, 241.
142. S. A. Schuete, R. G. Smith, I. R. Holden, J. A. Graham, *Anal. Chim. Acta*, **1990**, *236*, 141.
143. I. D. Wilson, E. D. Morgan, S. J. Murphy, *Anal. Chim. Acta*, **1990**, *236*, 145.
144. G. A. Junk, J. J. Richard, *Anal. Chem.*, **1988**, *60*, 451.
145. E. R. Brouwer, S. Kofman, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr.*, **1995**, *703*, 167.
146. D. Barcelo, M. C. Hennion, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, *318*, 1.
147. I. Liska, *J. Chromatogr.*, **1995**, *665*, 163.

148. M. C. Hennion, C. Picard, C. Combellas, M. Caude, R. Rosset, *J. Chromatogr.*, **1981**, 210, 211.
149. A. Di Corcia, M. Marchetti, *Environ. Sci. Technol.*, **1992**, 26, 66.
150. A. Di Corcia, S. Marchese, R. Samperi, *J. Chromatogr.*, **1993**, 642, 163.
151. S. Guene, M. C. Hennion, *J. Chromatogr.*, **1996**, 725, 57.
152. L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A.*, **1998**, 803, 249.
153. L. Arce, M. Tena, A. Ríos, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 359, 27.
154. P. Werly, W. Thormann, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 2155.
155. J. Waterval, H. Krabbe, J. Teeuwsen, A. Bult, H. Lingeman, W. Underberg, *Abstrac 23<sup>rd</sup> International Symposium of High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, HPLC, 1999*, 99, PA7/66.
156. P. D. Lark, B. R. Craven y R. C. L. Barworth, *The relationship between two variables-simple linear relationships*, in "The Handling of Chemical Data", Pergamon Press, 1968.
157. Beckman Instruments, *Inc. Spectroscopy*, **1987**, 2, 16.
158. A. Saporano, *Nuestra Salud*, Tomo II, Ed. De Vecchi S.A., Barcelona, **1972**.
159. K. D. Luckacs, J. W. Jorgenson, *J. High Res. Chromatog.*, **1985**, 8, 407.
160. S. F. Y. Li, *Capillary Electrophoresis, Principles, Practice and Applications*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Holanda, **1992**.
161. M.B. Harrold, M.J. Wajtusik, J. Riviello, P. Henson, *J. Chromatogr.*, **1993**, 640.

## Bibliografía

---

162. D.R. Baker, *Capillary Electrophoresis*, Wiley-Interscience, John Wiley&Sons, Inc., **1995**.
163. R. Khun, S. Hoffstetter Khum, *Capillary Electrophoresis, Principles and Practice*. Springer Laboratory.
164. "Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis, II", *Spectrochim. Acta*, **1978**, 33, 242.
165. "Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry (XX-A.C.S.)", *Anal. Chem.*, **1980**, 52, 2242.
166. H.H. Kaiser, *Anal. Chem.*, **1970**, 42, 26.
167. L.A. Currie, *Anal. Chem.*, **1986**, 40, 586.
168. J.D. Winefordner, G.L. Long, *Anal. Chem.*, **1983**, 55, 712.
169. C.A. Clayton, J.W. Hines, P.D. Elkins, *Anal. Chem.*, **1968**, 40, 587.
170. K.D. Altria, Y.L. Chanter, *J. Chromatogr.*, **1993**, 652, 459.
171. J. Wang, D.B. Luo, P.A.M. Farias, J.S. Magmound, *Anal. Chem.*, **1985**, 57(1), 158.
172. J. Rodríguez; L. Calvo, C. Marín, A. Sánchez, *Electroanal. Chem.*, **1987**, 237, 105.
173. J.J. Berzas, J. Rodríguez, G. Castañeda, F.J. Guzmán, *Analítica Letters*, **1997**, 30(12), 2221.
174. J.J. Berzas, J. Rodríguez, G. Castañeda., *Electroanalysis*, **1999**, 11(4), 268.

175. J.J. Berzas, J. Rodríguez, G. Castañeda, M.J. Villaseñor, *Analítica Chimica Acta*, **2000**, 417, 143.
176. P. Wernly, W Thormann, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 2155.
177. E. V. Dosc, G. Guiocho, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 123.
178. M. Valcárcel, M. Luque de Castro, M. Tena, *Anal. Proc.*, **1993**, 30, 276.
179. D.S. Burgi, R. L. Chien, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 1046.
180. D. R. Baker, *Capillary Electrophoresis*, Wiley-Interscience, John Wiley&Sons, Inc., **1995**.
181. M. B. Harrold, M. J. Wajtusik, J. Riviello, P. Henson, *J. Chromatog.*, **1993**, 640.

Publicaciones



Journal of Chromatography B, 2003, 794, 381-388

***Direct and fast capillary zone electrophoretic method for the determination of Gleevec and its main metabolite in human urine.***

J. Rodríguez Flores, J.J. Berzas, G. Castañeda, N. Rodríguez





Electroanalysis (enviada)

***Voltammetric behavior of Imatinib (Gleevec) and its main metabolite using square-wave and adsorptive stripping square-wave techniques. Direct and total determination in urine samples.***

J. Rodríguez Flores, J.J. Berzas, G. Castañeda, N. Rodríguez



Electrophoresis, 2001, 22, 2004-2009

***Micellar electrokinetic capillary chromatography for the determination of Viagra and its metabolite (UK-103,320) in human serum.***

J.J. Berzas, J. Rodríguez, G. Castañeda, N. Rodríguez



Journal of Chromatography A, 2002, 953,279-286

***Determination of sildenafil citrate and its main metabolite by sample stacking with polarity switching using micellar electrokinetic chromatography.***

J.J. Berzas, J. Rodríguez , G. Castañeda, N. Rodríguez



Talanta, 2004, 62, 427-432

***Determination of sildenafil citrate (Viagra) and its metabolite (UK-103,320) by square-wave and adsorptive stripping square-wave voltammetry. Total determination in biological samples.***

J. Rodríguez, J.J. Berzas, G. Castañeda, N. Rodríguez



Electroanalysis (aceptada)

***Voltammetric behaviour of Mifepristone using square-wave and adsorptive stripping square-wave techniques. Determination in urine samples.***

J. Rodríguez Flores, J.J. Berzas, G. Castañeda, N. Rodríguez