

CAPITULO 5

ELECTROFORESIS CAPILAR

Pablo Quiroga

Introducción

La Electroforesis Capilar (EC), constituye una técnica de separación efectiva para un amplio espectro de analitos, desde pequeños iones inorgánicos hasta macromoléculas, permitiendo la separación tanto de moléculas cargadas como no cargadas. La misma provee datos confiables, requiere una preparación mínima de las muestras, ofrece un alto grado de automatización, presenta alta eficiencia en la separación, cortos tiempos de análisis, bajo volumen de inyección, permite la separación quiral sin la necesidad de columnas especiales, es de fácil operación y permite una variedad de sistemas de detección.

Principios básicos y fundamentos

La Electroforesis Capilar (EC) utiliza un campo eléctrico para separar los componentes de una mezcla, y se diferencia de otras formas de electroforesis en que la misma es llevada a cabo dentro de un capilar de diámetro estrecho. Fue desarrollada combinando propiedades o características de distintos métodos, los cuales incluyen, el principio de la electroforesis en gel, la Cromatografía Gaseosa en capilar de sílice fundido (GC) y la Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) con detectores altamente sensibles. Es altamente reconocido que las moléculas pueden estar cargadas eléctricamente ya sea de modo positivo o negativo; cuando el número de cargas positivas y

negativas es el mismo, las cargas se cancelan dando origen a una molécula neutra (sin carga). Si tenemos una mezcla constituida por sustancias iónicas disueltas en un solvente o medio adecuado (por ejemplo: agua), en ausencia de un campo eléctrico, el movimiento de los iones es esencialmente al azar ,pero, cuando un campo eléctrico es aplicado, las especies cargadas inician su movimiento y el mismo da como resultado una distribución de las partículas cargadas menos al azar, los cationes (iones cargados positivamente) se mueven hacia el cátodo (electrodo de carga negativa) y los aniones (iones cargados negativamente) se mueven hacia el ánodo (electrodo cargado positivamente) (ver figura 1).

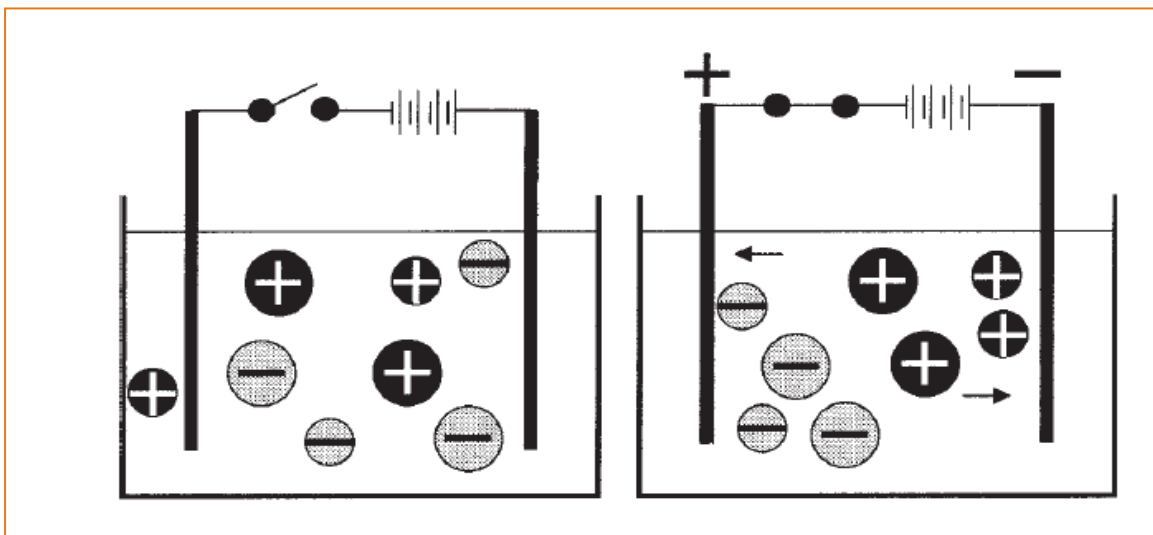


Figura 1. Principio básico de la electroforesis

La electroforesis en solución, se basa en la relación (carga / masa). En la Figura 1, podemos observar cuatro tipos de especies cargadas: partículas pequeñas y grandes cargadas positivamente y partículas pequeñas y grandes, cargadas negativamente, si cada partícula tiene una sola carga, el valor absoluto de la Fuerza (F) en cada una de ellas puede ser la misma y la aceleración creada por esta fuerza está dada por la siguiente ecuación:

$$F = \text{masa} \times \text{aceleración}$$

El principio básico de la EC se basa en la migración diferencial de iones o solutos bajo la influencia de un campo eléctrico, en la misma, el fenómeno de

electroforesis es llevado a cabo dentro de un capilar de diámetro estrecho, relleno con electrolitos. Una de las ventajas de que la electroforesis se realice en capilares de diámetro estrecho (20 μm a 100 μm) es que los mismos evitan la generación de gradientes de temperatura, los cuales generan ensanchamiento de los picos y pérdida de resolución. La movilidad de los analitos depende de su tamaño, carga, el grado de ionización, la viscosidad del medio, temperatura, voltaje y constante dieléctrica del electrolito soporte.

La separación por electroforesis como dijimos anteriormente, se basa en las diferentes velocidades de los solutos bajo la influencia de un campo eléctrico, la velocidad de un ion puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$v_{ef} = \mu_{ef} \times E \text{ (Ec. 1)}$$

Dónde: v_{ef} : velocidad del ion; μ_{ef} : movilidad electroforética y E : campo eléctrico aplicado. El campo eléctrico (E), es una función del voltaje aplicado (V) y la longitud total del capilar (L) (Volts/cm).

La movilidad, para un determinado ion y en un determinado medio, es una constante, la cual es característica de dicho ion, la misma es el resultado de dos factores: por un lado el ion es atraído hacia el electrodo de carga opuesta moviéndose través del medio y al mismo tiempo, fuerzas de fricción dificultan su movimiento. El balance de estas dos fuerzas determina su movilidad final:

$$\mu_{ef} \propto \frac{\text{Fuerza Eléctrica } (F_E)}{\text{Fuerza de Fricción } (F_F)} \text{ (Ec. 2)}$$

La Fuerza del campo eléctrico y la Fuerza de Fricción, pueden representarse por las siguientes ecuaciones:

$$F_E = q \times E \text{ (Ec. 3)}$$

$$F_F = -6\pi \eta r v \text{ (Ec. 4)}$$

Dónde: q : carga del ión; η : viscosidad de la solución; r : radio del ión; v : velocidad del ión.

Durante el estado estacionario en la electroforesis, definido por el balance de estas fuerzas, las mismas son iguales pero opuestas, igualando las ecuaciones 3 y 4 obtenemos:

$$q \times E = -6\pi \eta r v \text{ (Ec. 5)}$$

Si reemplazamos la velocidad en la ecuación 5, por la ecuación 1, resulta:

$$q \times E = -6\pi \eta r \mu_{ef} \times E \text{ (Ec. 6)}$$

$q = -6\pi \eta r \mu_{ef}$ – Despejando el término correspondiente a μ_{ef} , obtenemos la siguiente relación:

$$\mu_{ef} = q / 6\pi \eta r \text{ (Ec. 7)}$$

Por lo tanto un ion de pequeño tamaño, sufrirá menores fuerzas de fricción y por lo tanto se moverá en el medio con mayor velocidad que uno de mayor tamaño, similarmente un ion con cargas múltiples, experimentará una mayor atracción hacia el electrodo moviéndose en el medio también más rápidamente. Esta diferencia de velocidades es el fundamento del efecto de separación en la electroforesis.

Flujo Electroosmótico

Cuando se aplica un campo eléctrico a través del capilar relleno con solución amortiguadora, se genera un flujo de disolvente dentro del capilar que se denomina Flujo Electroosmótico (*EOF*), el mismo es un fenómeno que existe en un sistema electroforético, el mismo se genera, debido a que los capilares utilizados están constituidos por sílice fundida (cuarzo), por lo tanto la superficie interna del capilar está constituida por grupos silanoles (Si-OH), los cuales pueden presentar múltiples grados de ionización ($pI = 3.0$), por lo tanto, a todo $pH > 3.0$ los grupos silanoles se ionizan o hidrolizan en un buffer electrolito acuoso, generando u originando como resultado una superficie interna del capilar negativa. Las cargas negativas de la pared interna del capilar, atraen los cationes de la solución del electrolito, los cuales están hidratados, creando una diferencia de potencial (potencial zeta) y generando una doble capa eléctrica. Cuando un voltaje es aplicado a través del capilar, los cationes que forman la doble capa difusa, son atraídos hacia el cátodo, y como los mismos están solvatados / hidratados, generan un movimiento de fluido hacia el cátodo, dando origen al *EOF*. La velocidad del *EOF*, depende de la movilidad electroosmótica (μ_{eof}) que a su vez depende de la densidad de la carga en la pared interna del capilar y de las características de la solución amortiguadora.

La velocidad electroosmótica (v_{eof}) a través del capilar, está definida por la ecuación de Smoluchowski:

$$v_{eof} = -(\varepsilon\zeta/4\pi\eta) E \text{ (Ec.8)}$$

Dónde ε es la constante dieléctrica del electrolito, ζ es el potencial zeta (Volts), η es la viscosidad (Poise) y E es el potencial aplicado (Volts/cm). Controlando la magnitud del *EOF*, se puede influenciar de manera significativa la eficiencia y selectividad de la separación, debido a que el *EOF* es la principal fuerza que dirige la EC produciendo la migración de los analitos a través del mismo. Los factores que afectan el *EOF* incluyen, el campo eléctrico, pH, la concentración iónica del buffer electrolito soporte o solución amortiguadora, la adición de aditivos, temperatura y recubrimiento capilar.

Una característica importante del *EOF*, es el perfil de flujo plano, lo que indica que las fuerzas impulsoras del flujo están uniformemente distribuidas a lo largo del capilar. Este flujo plano es beneficioso para la separación, debido a que el mismo no contribuye a la dispersión de la zona de los solutos. Bajo condiciones normales (superficie del capilar cargada negativamente), el *EOF* tiene la dirección ánodo-cátodo, por lo tanto La movilidad electroforética del analito y la movilidad del *EOF*, pueden actuar en la misma dirección o en direcciones opuestas, dependiendo de la carga del soluto. En la electroforesis capilar normal, los aniones migrarán en la dirección opuesta al flujo electroosmótico y sus velocidades serán menores que la velocidad electroosmótica. Los cationes migrarán en la misma dirección del flujo electroosmótico y sus velocidades serán mayores que la velocidad electroosmótica. Bajo condiciones en las cuales hay una velocidad electroosmótica rápida con respecto a la velocidad electroforética de los solutos, tanto los cationes como los aniones se pueden separar en la misma corrida. Las movilidades electroforéticas y electroosmótica del analito pueden tener el mismo sentido o sentido opuesto, según la carga (positiva o negativa) del soluto, resultando la velocidad del soluto (v) la siguiente:

$$v = v_{ef} \pm v_{eof} \text{ (Ec.9)}$$

Se utiliza la suma o la diferencia entre las dos velocidades (v_{ef} y v_{eof}) dependiendo de si las movilidades tienen el mismo sentido o sentido opuesto,

por lo tanto lo que medimos en presencia del *EOF*, es la llamada movilidad o velocidad aparente y no intrínseca de cada analito.

El tiempo que tarda en migrar la distancia (*l*) desde el extremo de inyección del capilar al punto de detección (longitud efectiva del capilar) es el siguiente:

$$t = l / (v_{ef} + v_{eof}) \text{ (Ec. 10)}$$

Descripción y tipo de instrumental

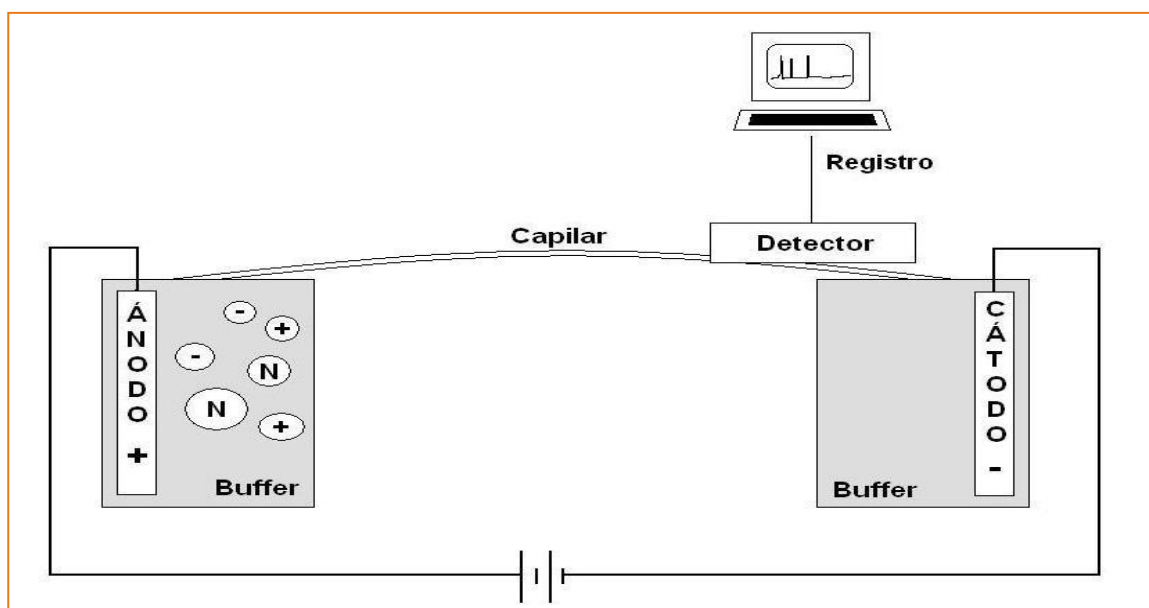


Figura 2. Esquema equipo básico de electroforesis capilar

Un equipo de Electroforesis capilar (ver Figura 2), está compuesto básicamente por una fuente de alimentación de alto voltaje controlable, dos reservorios para las soluciones amortiguadoras, que se mantienen en el mismo nivel y que contienen las soluciones anódicas y catódicas, dos electrodos (ánodo y cátodo) sumergidos en los reservorios de las soluciones amortiguadoras y conectados a la fuente de alimentación, un capilar, generalmente de sílice fundida (cuarzo), donde se lleva a cabo la separación, cuyos extremos se encuentran ubicados en los recipientes de las soluciones amortiguadoras. El material del capilar debe ser química y eléctricamente inerte, transparente al UV-Visible, flexible y robusto; la sílice fundida (cuarzo), reúne la mayoría de estos requerimientos, y es por esta razón que el mismo es primariamente el material

empleado hoy en día. Para facilitar el manejo del capilar, el mismo está recubierto por una capa protectora de poliimida, la cual le confiere alta flexibilidad, la desventaja que presenta este recubrimiento, es que el mismo es opaco a la luz UV, por lo tanto el mismo debe ser removido con el objetivo de generar una ventana o celda de detección sobre el capilar, esta ventana de visualización óptica, está alineada con el detector y permite la denominada detección “en línea”, es decir los analitos son detectados a medida que migran por el capilar. Un aspecto crítico del capilar lo representa el espesor de la pared del mismo, debido a la generación de calor, el cual es producido cuando una corriente eléctrica pasa a través de un electrolito, este calor debe ser removido para evitar la generación de gradientes de temperatura y esto se logra reduciendo el espesor de la pared del capilar (25-75 μm), permitiendo de esta manera una disipación uniforme del mismo.

Otro componente fundamental de un equipo de EC, es el sistema de introducción cuantitativa (debido a que el volumen de muestra no es medido sino calculado mediante ecuaciones) de la muestra al capilar, la misma puede ser realizada por numerosos métodos, los dos más comúnmente utilizados son: inyección electrocinética o hidrodinámica. La inyección hidrodinámica (ver figura 3), se basa en las diferencias de presión entre el inicio y el final del capilar, la cual puede ser llevada a cabo mediante la aplicación de presión en el vial de entrada de la muestra, aplicación de vacío en el extremo final del capilar o por elevación del vial de ingreso de la muestra respecto del reservorio de salida de la muestra (efecto sifón). Con este tipo de inyección, la cantidad de muestra cargada dentro del capilar, es independiente de la matriz de la muestra. En la inyección electrocinética, el reservorio inicial es reemplazado por el vial conteniendo la muestra, un bajo voltaje (ej. 5-10 KV) es aplicado durante la inyección, este voltaje de inyección es generalmente 3 a 5 veces menor que el utilizado para llevar a cabo la separación de los componentes de la muestra. Durante este tipo de inyección los analitos ingresan al capilar tanto por migración como por acción de bombeo del *EOF*. Una propiedad única de este tipo de inyección es que la cantidad ingresada o cargada en el capilar es dependiente de las movilidades electroforéticas de los solutos individuales,

introduciendo un posible sesgo en los resultados. La inyección electrocinética es muy simple y ventajosa cuando son empleados medios viscosos o geles en el capilar y cuando la inyección hidrodinámica no es efectiva.

Sistemas de detección: la separación en EC, puede ser detectada por diversos sistemas de detección, los cuales incluyen, UV, UV-Visible, fluorescencia inducida por láser, espectrometría de masas, fluorescencia, quimioluminiscencia, amperometría, NMR, etc. La detección UV indirecta es ampliamente utilizada para la detección de solutos que no contienen grupos cromóforos en su estructura, tales como, iones metálicos, o aniones inorgánicos. En el caso de la detección UV indirecta, es necesario la adición de una sustancia cromófora a la solución amortiguadora.

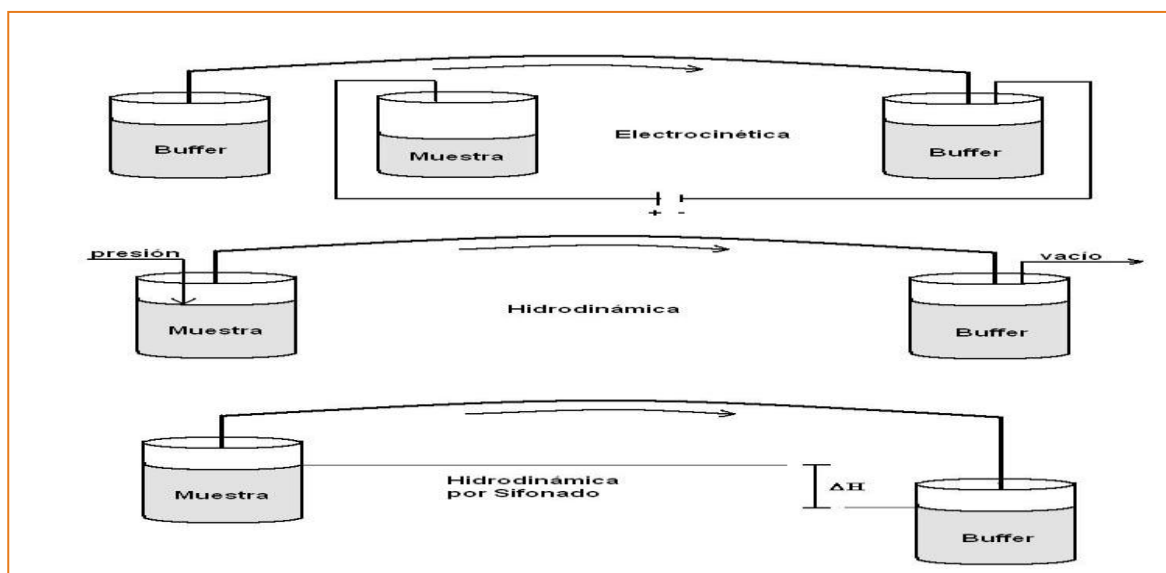


Figura. 3. Diagrama de los métodos de introducción de la muestra al capilar

Modos de separación en electroforesis capilar

El proceso de electroforesis capilar, es actualmente un término genérico y dependiendo del tipo de capilar y el electrólito utilizado, la tecnología de EC puede ser dividida en diferentes técnicas o modos de separación:

Electroforesis Capilar en Solución Libre (ECSL), Electroforesis Capilar en Gel, Cromatografía Electrocinética Capilar, Cromatografía Electrocinética Micelar

(CECM), *Isoelectroenfoque Capilar*, *Electroforesis Capilar Quiral (ECQ)*, entre otras. A continuación, se describen los modos de separación de mayor aplicación en el análisis farmacéutico de pequeñas moléculas:

Electroforesis Capilar en Solución Libre (ECSL): en esta técnica de EC, los analitos se separan en un capilar que contiene únicamente una solución amortiguadora sin ningún medio anticonvectivo. La separación ocurre debido a que los distintos componentes de la muestra migran como bandas discretas con velocidades diferentes. La velocidad de cada banda depende de la movilidad electroforética (relación carga/masa) del soluto y del flujo electroosmótico en el capilar. Es el modo más comúnmente utilizado en EC. El orden de migración en esta técnica, será el siguiente: los cationes con grandes relaciones carga/masa, migrarán primero, seguido por los cationes con relación carga/masa menor, los solutos neutros, aniones con menor relación carga/masa, y finalmente los aniones con mayor relación carga/masa.

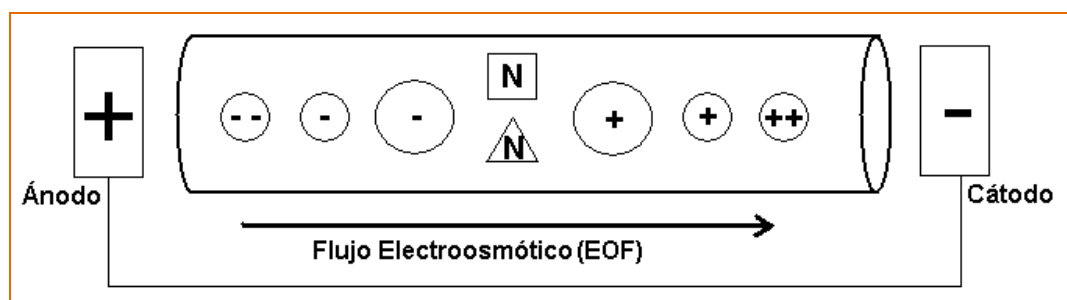


Figura. 4. Orden de migración en electroforesis capilar en solución libre

Esta técnica permite separar tanto aniones como cationes en la misma corrida bajo condiciones de alto EOF. Este método de EC es apropiado para el análisis de moléculas pequeñas ($PM < 2000$) y grandes ($2000 < PM < 10000$). Debido a la alta eficiencia lograda, se pueden separar moléculas que presenten diferencias pequeñas en su relación carga/masa. Este método también permite la separación de compuestos quirales al agregar selectores quirales a la solución amortiguadora de separación.

Para lograr una óptima separación, hay que tener en cuenta diferentes parámetros que se describen a continuación:

Voltaje: el tiempo de separación es inversamente proporcional al voltaje aplicado, sin embargo, un aumento en el voltaje aplicado, puede producir la generación de un calor excesivo, aumentando de esta manera los gradientes de temperatura y viscosidad en la solución amortiguadora dentro del capilar, cuya consecuencia es el ensanchamiento del pico o banda de cada soluto con la consecuente disminución de la resolución.

Temperatura: el principal efecto de la misma es sobre la viscosidad y la conductividad eléctrica de la solución amortiguadora, afectando la velocidad de migración.

Capilar: el largo y diámetro interno del capilar afectan el tiempo de análisis y la eficiencia de las separaciones. El aumento tanto del largo efectivo, como del largo total, permiten disminuir los campos eléctricos a un voltaje constante, lo cual aumenta el tiempo de migración. Para una solución amortiguadora y un campo eléctrico determinado, la disipación del calor (ensanchamiento del pico o banda de cada soluto) depende del diámetro interno del capilar, como hemos descrito anteriormente. Es importante destacar que el diámetro del capilar puede afectar el límite de detección, dependiendo del volumen de muestra inyectado en el mismo y el sistema de detección utilizado.

Cromatografía Electrocinética Micelar (CECM):

En esta técnica, la separación ocurre en una solución electrolítica que contiene un agente tensioactivo, generalmente iónico (el más comúnmente utilizado es el Dodecilsulfato de sodio), en una concentración por encima de la concentración micelar crítica. El principio de la separación, está basado en la partición diferencial de las moléculas de soluto entre la solución amortiguadora acuosa y la pseudo fase estacionaria compuesta por las micelas según el coeficiente de partición del soluto. Esta técnica puede ser considerada un híbrido entre la electroforesis y la cromatografía. Presenta gran utilidad para la separación de mezclas que contienen, tanto especies iónicas como neutras y compuesto farmacéuticos muy hidrofóbicas y sus correspondientes metabolitos polares. En la CECM, las moléculas hidrofóbicas permanecerán la mayoría del tiempo en la micela, mientras que las moléculas hidrofílicas migrarán rápidamente a través del solvente.

A pH neutro y alcalino, se genera un flujo electroosmótico fuerte que arrastra los iones de la solución amortiguadora de separación hacia el cátodo. Si se utiliza dodecilsulfato de sodio como tensioactivo, la migración electroforética de la micela aniónica se produce en sentido opuesto. Como resultado, la velocidad general de migración de las micelas disminuye en comparación con el *EOF*. En el caso de solutos neutros, como el mismo puede repartirse entre la micela y la solución amortiguadora acuosa y no tiene movilidad electroforética, la velocidad de migración del analito dependerá únicamente del coeficiente de partición entre la micela y la solución amortiguadora. En el electroferograma, el pico correspondiente a cada soluto sin carga, siempre se encuentra entre el del marcador del flujo electroosmótico y el de la micela; y el tiempo transcurrido entre estos dos picos se denomina *ventana de separación*. Para los solutos con carga eléctrica, la velocidad de migración depende del coeficiente de partición del soluto entre la micela y la solución amortiguadora acuosa y de la movilidad electroforética del soluto en ausencia de micelas.

El mecanismo de separación es esencialmente cromatográfico y la migración del soluto y la resolución se pueden expresar en función del factor de capacidad del soluto (K''), que es la relación entre el número total de moles de soluto en la micela y los moles en la fase móvil. Si consideramos un compuesto neutro, K'' está dado por la siguiente ecuación:

$$K'' = (t_r - t_0) / t_0 (1 - t_r / t_m) = K [V_S / V_M] \text{ (Ec. 11)}$$

t_r , es el tiempo de migración del soluto; T_0 es el tiempo de análisis del soluto no retenido obtenido al inyectar un marcador de flujo electroosmótico que no ingresa ni interactúa con la micela (ej. Metanol); t_m es el tiempo de migración de la micela medido al inyectar un marcador de micela, (Ej. Sudam III) el cual migra asociado de manera continua con la micela; K es el coeficiente de partición del soluto; V_S es el volumen de la fase de las micelas; y V_M es el volumen de la fase móvil.

Para lograr una óptima separación hay que tener en cuenta diferentes parámetros que se describen a continuación:

Voltaje: el tiempo de separación es inversamente proporcional al voltaje aplicado, sin embargo, un aumento en el voltaje aplicado, puede producir la

generación de un calor excesivo, aumentando de esta manera los gradientes de temperatura y viscosidad en la solución amortiguadora en la sección transversal del capilar, este efecto puede ser significativo con amortiguadores de pH de alta conductividad, como por ejemplo aquellos que contienen micelas. La disipación insuficiente del calor ensancha el pico o banda y disminuye la resolución.

Temperatura: las variaciones en la temperatura del capilar afectan el coeficiente de partición del soluto entre la solución amortiguadora y la micela, la concentración micelar crítica, y la viscosidad de la solución amortiguadora, todos estos parámetros afectan el tiempo de migración de los solutos.

Capilar: el largo y el diámetro interno contribuyen al tiempo de análisis y a la eficiencia de las separaciones. El aumento del largo efectivo y del largo total puede disminuir los campos eléctricos, trabajando a un voltaje constante, aumenta el tiempo de migración y mejora la eficiencia de la separación.

Tipo de agente tensioactivo y concentración: el tipo de agente tensioactivo, al igual que la fase estacionaria en cromatografía, afecta la resolución ya que modifica la selectividad de la separación. El logaritmo de K' de un compuesto neutro aumenta linealmente con la concentración de detergente en la fase móvil. Cuando K' se acerca al valor de $(t_m / t_0)^{1/2}$ la resolución de la CECM alcanza su máximo. La modificación de la concentración del agente tensioactivo cambia la resolución.

pH: si bien el pH no modifica el coeficiente de partición de solutos no ionizados, puede modificar el EOF en capilares sin recubrimiento. Si se disminuye el pH de la solución amortiguadora, disminuye el EOF, aumenta la resolución de los solutos neutros y aumenta el tiempo de análisis.

Disolventes orgánicos: la adición de solventes orgánicos a la solución amortiguadora (ej. Metanol, acetonitrilo, propanol, etc) disminuye el tiempo de migración, también afecta la formación de las micelas por lo cual estos modificadores orgánicos pueden utilizarse hasta una concentración determinada para un agente tensioactivo específico, de manera de evitar la eliminación o alteración del equilibrio de micelación. Si desaparecen las micelas, desaparece el mecanismo de partición de la CECM.

Electroforesis Capilar Quiral: la separación quiral, constituye una herramienta muy importante para la separación de drogas quirales, porque numerosas moléculas farmacéuticas son quirales y cada enantiómero expresa una actividad farmacológica y toxicológica diferente, por ejemplo: AINES, y drogas antihipertensivas. La separación quiral es necesaria en el análisis farmacéutico para la obtención del enantiómero seguro y efectivo. La *ECQ*, puede ser llevada a cabo por métodos directos o indirectos. En los métodos indirectos, la mezcla racémica interacciona con un reactivo quiral originando diastereoisómeros con propiedades físicas y químicas diferentes, permitiendo separar ambos diastereoisómeros. En los métodos directos, los selectores quirales son adicionados a la solución amortiguadora para interactuar de manera estereoselectiva con cada enantiómero. El método directo, es más favorable que el método indirecto, debido a que es más simple y se cuenta con una amplia disponibilidad de selectores quirales. Las ciclodextrinas son los selectores quirales más utilizados en la separación quiral de drogas y forman complejos de inclusión con los enantiómeros. La separación quiral puede ser realizada mediante la aplicación de la *CECM*, en la cual se adicionan selectores quirales en el sistema micelar unido al agente tensioactivo por enlace covalente o agregando directamente al electrolito de separación micelar. Las micelas que tienen un grupo con propiedades de discriminación quiral incluyen sales, N-dodecanoil-L-aminoácidos, sales biliares, etc.

Análisis cuantitativo en electroforesis capilar

Las áreas de los picos se dividen por el tiempo de migración correspondiente con el objetivo de obtener el área corregida a fin de compensar el cambio en el tiempo de migración de corrida a corrida, reduciendo la variabilidad de la respuesta. Dividiendo las áreas de los picos por el tiempo de migración, se compensan las distintas respuestas de los constituyentes de la muestra que tienen diferentes tiempos de migración. Cuando se utiliza un estándar interno,

hay que verificar que no enmascare ninguno de los picos de la muestra a analizar.

Aplicaciones de la Electroforesis Capilar al análisis farmacéutico

La EC es una poderosa herramienta analítica, la cual ha incrementado su utilidad en el análisis farmacéutico en los últimos tiempos. Es utilizada como una técnica alternativa al HPLC, debido a su alta eficiencia, velocidad de análisis, reducción en el consumo de solventes y muestra, y bajo costo de operación comparada con la metodología por HPLC. Es utilizada en el control de calidad de rutina, en la valoración de ingredientes farmacéuticos activos en las distintas formas farmacéuticas, evaluación de impurezas en productos farmacéuticos, separación y cuantificación de moléculas quirales, cuantificación de principios activos y/o metabolitos en fluidos biológicos, estudios de estabilidad y es altamente utilizada en la industria farmacéutica biotecnológica.

Preguntas Orientadoras

1. Describa el fundamento de la Electroforesis Capilar.
2. A que se denomina ventana de separación y como procedería para evaluar la misma?
3. Que técnica de electroforesis capilar utilizaría para la separación de compuestos neutros? Justifique.
4. Describa el Flujo electroosmótico.
5. Que parámetro utiliza en la cuantificación de un analito en EC y que precauciones debe seguir con el mismo.? Justifique

Test de Autoevaluación

1. El calor generado durante una separación por EC
 - (a) Aumenta la resolución.
 - (b) Disminuye el ancho de las bandas o picos
 - (c) Aumenta el ancho de las bandas o picos y disminuye la resolución
 - (d) Aumenta la eficiencia

2. La separación y cuantificación de compuestos quirales puede llevarse a cabo utilizando:
 - (a) Electroforesis capilar en Solución Libre
 - (b) Cromatografía Electrocinética Micelar
 - (c) Cromatografía Electrocinética Micelar con selectores quirales
 - (d) Electroforesis capilar en Solución Libre con la adición de selectores quirales

3. La modificación de la Temperatura en la EC:
 - (a) Afecta la conductividad eléctrica
 - (b) Afecta la viscosidad de la solución amortiguadora
 - (c) Afecta el tiempo de migración
 - (d) Todas son correctas

4. El Flujo Electroosmótico es mayor a:
 - (a) pH ácidos
 - (b) pH neutro
 - (c) pH alcalino

Bibliografía

1. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 34) (2011)
Rockville
2. Farmacopea Europea (Ph. Eur. 7.0) (2011).
3. Bhupinder, S, S. (2011). *An Overview of Capillary Electrophoresis: Pharmaceutical, Biopharmaceutical and Biotechnology Applications*. J. Pharm. Educ. Res. Vol.2. pp 2-21
4. Suntornsuk, L. (2007). *Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis: A Survey on Recent Applications*. Journal of Chromatographic Science. Vol. 45. pp 559.
5. Petersen, J.R. and Mohammad A. A. (2001). *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*. Humana Press.Inc, Totowa, NJ
6. Heiger,D. (1992). *High Performance Capillary Electrophoresis- An Introduction*. Hewlett – Packard Company. “2nd Edition.