

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Analítica



MEMORIA DEL PERIODO DE INVESTIGACIÓN TUTELADA

Línea de investigación:

“DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE RESIDUOS DE FÁRMACOS
EN FLUIDOS BIOLÓGICOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA Y
ELECTROFORESIS CAPILAR”

**DETERMINACIÓN DE FENOTIAZINAS EN PREPARADOS
FARMACÉUTICOS Y MUESTRAS BIOLÓGICAS MEDIANTE
ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL CON DETECCIÓN
QUIMIOLUMINISCENTE BASADA EN LA REACCIÓN DEL
LUMINOL CON FERRICIANURO POTÁSICO**

Francisco J. Lara Vargas

Granada, 2005

ÍNDICE

Normativa sobre estudios de Tercer Ciclo	5
A) PERIODO DE DOCENCIA	
1. Introducción	9
2. Cursos realizados	10
B) PERIODO DE INVESTIGACIÓN	
1. Línea de investigación	23
2. Objeto de la memoria.....	25
3. Introducción	27
4. Reactivos, disoluciones y material.....	73
5. Desarrollo y optimización del sistema.....	79
6. Rectas de calibrado y parámetros de calidad	104
7. Aplicaciones analíticas.....	114
8. Conclusiones	121
9. Valoración de los conocimientos adquiridos	122

1. Normativa sobre Estudios de Tercer Ciclo.

El Real Decreto 778/1998 de 30 de abril, regula el Tercer Ciclo de estudios universitarios, la obtención y expedición del Título de Doctor y otros estudios de postgrado. Las Normas Reguladoras de los Estudios de Tercer Ciclo, del Título de Doctor de la Universidad de Granada, aprobadas en Junta de Gobierno del día 26 de abril de 1999, interpretan, desarrollan y adaptan la nueva legislación general a las situaciones particulares de esta Universidad. Las Normas de Régimen Interno aprobadas en Junta de Gobierno el día 29 de noviembre de 1999 constituyen la normativa sobre Estudios de Tercer Ciclo de la Universidad de Granada.

Según esta Normativa, los Programas de Doctorado incorporan dos periodos diferentes por sus objetivos formativos. Dichos periodos se denominan: Periodo de Docencia y Periodo de Investigación Tutelada. Una vez superados se realizará una valoración de los conocimientos adquiridos para aspirar a obtener el Diploma de Estudios Avanzados (Vicerrectorado de Ordenación Académica, Comisión de Doctorado. “Normativa sobre Estudios del Tercer Ciclo”. Universidad de Granada 2000).

A. PERIODO DE DOCENCIA

1. INTRODUCCIÓN

Para superar el periodo de docencia, según la Normativa anteriormente mencionada, se deberán superar un mínimo de 20 créditos de los que, al menos 15 corresponderán a cursos de tipo fundamental del programa de doctorado en el que se matricula, completando el resto con cursos de tipo fundamental, metodológico (del mismo programa de doctorado o de programas afines), o bien siendo convalidados por cursos complementarios.

Durante el curso académico 2003/2004, cursé y superé, tal y como se recoge en la tabla 1, 21 créditos, de los cuales, 15 correspondían a cursos de tipo fundamental todos ellos dentro del Programa de Doctorado “Química”. Los 6 créditos restantes fueron realizados mediante cursos de tipo fundamental del Programa de Doctorado “Desarrollo de medicamentos”.

Tabla 1. *Cursos desarrollados en el Periodo de Docencia.*

Tipo	Título del Curso	Créditos
Fundamental	Determinación de multicomponentes en espectrometría analítica.	3'0
Fundamental	Espectroscopía de luminiscencia molecular. Aplicaciones analíticas.	3'0
Fundamental	Introducción a la química orgánica ambiental.	3'0
Fundamental	Quimioluminiscencia y bioluminiscencia. Aplicaciones analíticas.	3'0
Fundamental	Sensores químicos.	3'0
Fundamental	Aplicaciones de los sensores químicos, cromatografía de gases con detección de masas y electroforesis capilar al control de medicamentos.	3'0
Fundamental	Aseguramiento de la calidad de los ensayos farmacéuticos.	3'0

2. CURSOS REALIZADOS

2.1. Determinación de multicomponentes en espectrometría analítica.

Este curso optativo de tipo fundamental fue impartido por D. Ignacio de Orbe Payá y Dña. Natalia Navas Iglesias, ambos Profesores Titulares del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada. La duración fue de 30 horas (3.0 créditos), constando de 20 horas teóricas y 10 horas prácticas.

Las 20 horas teóricas se estructuraron de la siguiente forma:

- **Introducción.** En este curso se estudiaron diferentes técnicas quimiométricas que permiten realizar determinaciones cuantitativas en muestras que presentan más de un componente. En una determinación cuantitativa es necesario realizar un proceso que consta de dos etapas: calibración y predicción. Además de las técnicas más tradicionales para resolver mezclas de analitos, como separaciones físicas (extracción, precipitación, etc.) o químicas (reacciones de enmascaramiento) o métodos instrumentales (cromatografía, electroforesis), también se encuentran diferentes técnicas quimiométricas que permiten alcanzar el mismo fin. Cuando decidimos emplear una de estas técnicas podemos trabajar con señales univariantes o con señales multivariantes.

- **Señales univariantes.** Se explicaron las diferentes metodologías existentes que se basan en el empleo de este tipo de señales. Estas son: sistema de n ecuaciones con n incógnitas, espectrometría de absorción UV-Vis de doble longitud de onda, y la señal derivada.

- **Señales multivariantes.** Se estudiaron las diversas opciones disponibles y se hizo énfasis en sus diferencias así como cuándo era más recomendable cada una ellas. Estas fueron: Regresión Lineal en Múltiples Longitudes de Onda (MLRA), derivada de cociente de espectros, Regresión Lineal Múltiple (Multiple Linear Regression, MLR), Regresión por Mínimos Cuadrados Clásicos (Classical Least-Squares, CLS), Regresión Inversa por Mínimos Cuadrados (Inverse Least-Squares, ILS), Regresión por Componentes Principales (Principal Component Regression, PCR), Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (Partial Least-Squares, PLS), Redes Neuronales Artificiales (Artificial Neural Networks, ANN) y Filtrado de Kalman.

En las 10 horas (1.0 créditos) de carácter práctico, se aplicó el método de Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis, PCA) para realizar un estudio sobre los distintos metales que se encuentran presentes en los distintos tejidos del corazón, venas y arterias (en total 13). Se nos presentó el software

empleado para ello y se hizo una búsqueda bibliográfica sobre el empleo de alguna de las metodologías descritas y que hubiera sido aplicada a la electroforesis capilar (CE). La calificación obtenida fue de sobresaliente.

2.2. Espectroscopía de luminiscencia molecular. Aplicaciones analíticas.

Este curso de carácter optativo y tipo fundamental, fue impartido por D. Manuel Román Ceba, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada y por D. Alberto Fernández Gutiérrez, Catedrático del mismo departamento. La duración fue de 30 horas teóricas (3.0 créditos).

- **Introducción.** Se describieron los distintos fenómenos de luminiscencia molecular y se localizaron dentro del conjunto de técnicas analíticas, además se estudiaron las transiciones electrónicas que los producen. Se realizó también un desarrollo de la evolución histórica de los procesos fotoluminiscentes y se explicó el diagrama de Jablonski y los procesos competitivos en la fotoluminiscencia.

- **Caracterización de la fluorescencia y la fosforescencia.** En este apartado se estudiaron: los espectros de excitación y emisión fluorescentes y fosforescentes, el salto de Stokes y la variación de Stokes, la no variación del espectro de emisión con la longitud de onda de excitación, la regla de la imagen especular, rendimientos cuánticos y tiempos de vida de fluorescencia y fosforescencia, y la polarización de la fluorescencia y la fosforescencia.

- **Fluorescencia retardada.** Se definieron los tipos de fluorescencia retardada y se estudiaron sus diferencias basándose en los mecanismos de emisión.

- **Fluorescencia sensibilizada.** Se analizó este tipo de fluorescencia y los fenómenos de transferencia intramolecular de energía implicados. Se explicó la cofluorescencia que es un tipo de fluorescencia sensibilizada. Se vieron diferentes aplicaciones de estas metodologías para determinar analitos de interés.

- **Fluoroimmunoensayos.** Se explicó el fundamento de esta técnica haciendo mención a los diferentes principios en los que se puede basar y se enumeraron las propiedades ideales de un marcador fluorescente. A continuación, se describió el fluoroimmunoensayo por polarización de la fluorescencia y el fluoroimmunoensayo de tiempo resuelto.

- **Efecto de la estructura molecular.** En este tema se analizó cómo depende la emisión luminiscente del tipo de transición electrónica y de la geometría. La primera está relacionada con los niveles electrónicos que posea una molécula y la segunda se

considera en términos de rigidez, conjugación y presencia de grupos sustituyentes en compuestos aromáticos o de átomos pesados intramoleculares. Además se estudió el efecto del medio ambiente: temperatura, disolvente, viscosidad, impurezas, presencia de sustancias paramagnéticas, de átomos pesados en el medio y del pH.

- **Reacciones en el estado excitado.** Se explicaron las reacciones ácido-base, los cambios que se producen en el estado excitado, los diferentes casos que nos podemos encontrar dependiendo de si tenemos grupos donores o aceptores de electrones. Además se vio como se puede emplear la fluorescencia para realizar determinaciones de pKa.

- **Utilización de medios organizados.** El desarrollo de este tema se centró en los medios micelares y de qué manera ayudan a mejorar la sensibilidad de la fluorescencia.

- **Determinación de sustancias inorgánicas por métodos fluorescentes.** Se explicaron las diferentes metodologías que se pueden emplear para determinar sustancias inorgánicas: por fluorescencia natural, mediante fluorescencia de cristalofósforos, con reacciones de formación de complejos metálicos y compuestos de asociación iónica, mediante métodos basados en reacciones de sustitución, reacciones redox, mediante derivatización, métodos cinéticos, métodos basados en reacciones catalíticas y enzimáticas no cinéticas, métodos quimioluminiscentes y métodos volumétricos luminiscentes.

- **Determinación de sustancias orgánicas por métodos fluorescentes.** Se vieron ejemplos de sustancias que presentan fluorescencia natural o que pueden ser derivatizadas mediante diferentes reacciones. También se estudiaron los métodos cinéticos.

- **Métodos basados en el *quenching*.** Se describieron los dos tipos de *quenching* que se emplean con fines analíticos: atenuación dinámica o difusional (*quenching* colisional) y *quenching* estático. Además se propusieron ejemplos de sustancias que se pueden determinar basándose en este efecto.

- **Fosforescencia.** En este apartado se estudiaron los parámetros que definen las medidas fosforimétricas, los factores que las afectan y las diferentes metodologías existentes para la obtención de una señal fosforescente y algunas aplicaciones prácticas en las que se emplean.

La evaluación de este curso de doctorado se realizó mediante un trabajo escrito en el que se obtuvo la calificación de sobresaliente.

2.3. Introducción a la química orgánica ambiental.

Este curso optativo de tipo fundamental fue impartido por D. Andrés Parra Sánchez, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica. La duración del curso fue de 30 horas (3.0 créditos), todos ellos de carácter teórico. El curso fue estructurado de la siguiente manera:

- **Introducción.** En esta primera parte se ofreció una visión general de los compuestos más frecuentes en el medio ambiente y se establecieron varios criterios para su clasificación: basándose en sus propiedades químico-físicas, según su fuente de procedencia y según su utilización.

- **Tipos de reacciones medioambientales más frecuentes.** En este apartado se hizo notar la importancia de conocer cuáles son las reacciones químicas más habituales en el medio ambiente porque de ellas dependerá que posibles contaminantes desaparezcan (destoxificación) o que aparezcan otros más peligrosos. Las reacciones estudiadas fueron: reacciones de hidrólisis, sustituciones nucleofílicas, reacciones de sustitución de acilo, hidrólisis de compuestos organofosforados, reacciones de reducción (deshalogenación reductiva de haluros de alquilo, reducción nitroaromática, reducción de azo-compuestos, reducción de las nitrosoaminas, reducción de sulfóxidos, reducción de quinonas, reacciones de desalquilación reductiva), reacciones de oxidación en las que se estudiaron los principales agentes oxidantes (oxígeno triplete, oxígeno singlete, superóxido, ozono, H_2O_2 , radical hidroxilo y el radical alquilperóxido) y las reacciones en las que están involucrados (reacciones de oxidación en superficies sólida, oxidaciones térmicas y oxidaciones con aire húmedo).

- **Tratamientos con desinfectantes en medios acuosos.** Se explicó la diferencia entre potabilizar y descontaminar, los pasos necesarios hasta llegar a desinfectar un agua (medios mecánicos, tratamientos físicos, métodos químicos) y cuáles son los agentes desinfectantes que más se emplean: cloro (que se emplea para desinfectar aguas que contengan fenoles), trihalometanos, cloro acuoso combinado (cloroaminas y dióxido de cloro) y ozono. Se estudiaron también procesos de desinfección en presencia de materiales sólidos y los procesos de oxidación avanzada (Advanced Oxidation Processes, AOPs).

- **Ecología química.** Se definió este concepto y se estudiaron las sustancias involucradas: feromonas y aleloquímicos, haciéndose una clasificación de las primeras atendiendo al individuo que benefician (alomonas, cairomonas y sinomonas) y de las

segundas atendiendo a la etapa del proceso en la que aparecen (pre-infecciosas, potenciales y post-infecciosas o fitoalexinas).

- **Compuestos orgánicos persistentes (COPs).** En este último tema se explicó qué son los COPs, cuáles son los doce designados para la acción internacional (Convenio de Estocolmo), qué propiedades tienen, qué daños han ocasionado y las negociaciones que se están llevando a cabo en la actualidad para reducir su riesgo en la salud y en el medioambiente.

Este curso fue superado con una calificación de sobresaliente.

2.4. Quimioluminiscencia y bioluminiscencia. Aplicaciones analíticas.

Este curso optativo de tipo fundamental fue impartido por D. Fermín Gerardo Alés Barrero, Dña. María del Carmen Valencia Mirón y Dña. Ana María García Campaña, Profesores Titulares del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada. La duración fue de 30 horas (3'0 créditos), de las que 20 horas (2'0 créditos) fueron de carácter teórico y 10 horas (1'0 créditos) de carácter práctico. En la parte teórica se estudiaron los siguientes temas:

- **Introducción a la quimio(bio)luminiscencia.** En este apartado se definieron los conceptos de quimioluminiscencia y bioluminiscencia, y se explicó la evolución histórica de dichas técnicas.

- **Fundamentos teóricos de la quimioluminiscencia.** Se analizaron los factores fundamentales y requisitos necesarios para la emisión quimioluminiscente, los componentes que pueden participar en una reacción quimioluminiscente, el rendimiento cuántico de quimioluminiscencia, la cinética de este tipo de reacciones, la intensidad de emisión quimioluminiscente, los factores que afectan a dicha emisión, así como las ventajas de este tipo de detección.

- **Instrumentación en quimioluminiscencia.** Se explicaron los diferentes sistemas que se pueden emplear en esta técnica: sistemas estáticos, sistemas de flujo, sistemas de inyección en flujo y sistemas de flujo detenido. Se estudiaron los tipos y premisas que deben cumplir los distintos reactores, al igual que los diferentes detectores y sus requerimientos.

- **Sistemas quimioluminiscentes.** Con este epígrafe se estudió la implicación entre oxígeno y quimioluminiscencia, y se distinguieron los sistemas quimioluminiscentes en función de la fase donde tienen lugar. En fase líquida se vieron las reacciones del 1,2-dioxetano, de las acilhidrazinas (luminol y derivados), de los

esteres de acridinio (lucigenina), de los imidazoles (lofina), del complejo tris(2,2'-bipiridina)rutenio(II), de los peroxioxalatos, de oxidación de los sulfitos y otras reacciones de menor aplicación analítica. Con respecto a las reacciones en fase gaseosa, se estudiaron sus características, sus ventajas e inconvenientes y se clasificaron en función de si tienen lugar en llama o en ausencia de ella. Dentro de los sistemas en llama se estudió la quimioluminiscencia de los compuestos de azufre y de los compuestos de fósforo, y dentro de los sistemas a temperatura ambiente se estudió la determinación de ozono con etileno u olefinas y con rodamina B, la determinación de hidrocarburos y los sistemas en los que se involucran los óxidos de nitrógeno. También se estudió la metodología y algunas aplicaciones de las reacciones en fase sólida. Finalmente se vieron los sistemas bioluminiscentes, concretamente el sistema de la luciérnaga y su aplicación a la determinación de ATP, y el sistema de la luciferasa.

- **Quimioluminiscencia como sistema de detección.** Se analizó la posibilidad del acoplamiento de la quimioluminiscencia como sistema de detección a otras técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la electroforesis capilar, el análisis por inyección en flujo y la cromatografía de gases. En todos los casos se discutieron las ventajas e inconvenientes, la instrumentación necesaria, las reacciones quimioluminiscentes más convenientes y se vieron algunas aplicaciones prácticas.

- **Sensores de flujo quimioluminiscentes y bioluminiscentes.** Se evaluó las ventajas que ofrecen frente a otras metodologías y se definió y diferenció lo que son y lo que no son sensores quimioluminiscentes.

- **Inmunoensayo quimioluminiscente.** En esta sección se explicaron diferentes casos prácticos de la utilización de la quimioluminiscencia para el análisis de sustancias químicas o biológicas de interés, empleando agentes enzimáticos, antígenos o anticuerpos para llevar a cabo la medida quimioluminiscente.

En la parte práctica se llevaron a cabo dos sesiones: determinación de metilparabén en cosméticos y determinación de aminoglucósidos en preparados farmacéuticos. En ambos casos se empleó la técnica de inyección en flujo (FIA) con detección quimioluminiscente.

La calificación obtenida fue de sobresaliente.

2.5. Sensores químicos.

Este curso optativo de tipo fundamental fue impartido por D. Luís Fermín Capitán Vallvey, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada y Dña. María Dolores Fernández Ramos, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada. La duración fue de 30 horas (3'0 créditos) de las que 24 (2'4) fueron de carácter teórico y 6 de carácter práctico. Los temas estudiados fueron los siguientes:

- **Introducción.** En esta primera parte se abordó la importancia de la obtención de nuevos sistemas de análisis rápidos, baratos, portátiles, sencillos, etc., para resolver problemas analíticos concretos. Se definieron los conceptos de sensor y sensor químico, se clasificaron en función de diversos criterios y se establecieron sus características generales.

- **Técnicas e instrumentación.** Se estudiaron las diferentes técnicas utilizadas en la obtención de una propiedad analítica para el desarrollo de sensores, estas son: técnicas ópticas, electroquímicas, térmicas y piezoeléctricas. Dentro de las técnicas ópticas se definieron conceptos básicos de absorción UV-Vis-IR y otros como: reflectancia, luminiscencia, onda evanescente, plasmón superficial e interferometría. Además se describieron las fibras ópticas y se explicaron sus características generales, las leyes de la difracción aplicadas a la propagación de la luz dentro de una fibra óptica, el ángulo de cono de aceptación, el máximo número de nodos de propagación, los diferentes tipos de guías de ondas existentes, los fenómenos de atenuación en las fibras ópticas, los fenómenos de distorsión en dichas fibras y los tipos básicos de cables ópticos y materiales que se emplean para su fabricación. Se estudiaron también las técnicas de imagen con especial énfasis en la cámara CCD. En las técnicas electroquímicas se estudiaron conceptos básicos de potenciometría y amperometría, en las técnicas térmicas los conceptos estudiados fueron de entalpimetría y en las piezoeléctricas de piezoelectricidad.

- **Sensores ópticos.** Se definió el concepto de sensor óptico y se estudiaron los diferentes esquemas basados en la fibra óptica (intrínsecos, extrínsecos y de fase reactiva). Se estudiaron también los esquemas de sensores en flujo, definiendo el concepto de microzona reactiva, de células de flujo, así como las diferentes configuraciones. Finalmente se analizó la preparación de zonas sensoras, los tipos de soportes sólidos empleados y los métodos de inmovilización.

- **Tipos de sensores ópticos.** Se estudiaron los diferentes tipos de sensores ópticos para el pH, para cationes, para aniones, para compuestos orgánicos y para gases (oxígeno, dióxido de carbono y amoníaco). Se describieron también los biosensores enzimáticos y los biosensores inmunológicos (RIA, ELISA, inmunofluorescencia).

- **Sensores electroquímicos.** Se analizaron los sensores potenciométricos (simétricos y asimétricos), los sensores amperométricos, los biosensores catalíticos (de enzimas, de tejidos, de células o de microorganismos) y los biosensores de afinidad (inmunosensores y quimiorreceptores).

- **Sensores térmicos, piezoeléctricos y otros.** Se enunciaron sus generalidades, se desarrolló su funcionamiento básico, su forma de actuación y sus aplicaciones.

Se realizaron dos sesiones prácticas: determinación de fenoles en cerveza mediante un biosensor voltamétrico de pasta de carbón y tejido vegetal y la determinación de n-propilgalato y butilhidroxianisol en alimentos mediante un sensor de flujo.

En este curso se valoró la asistencia y la realización de un trabajo escrito que trató sobre narices electrónicas. La calificación obtenida fue de sobresaliente.

2.6 Aplicaciones de los sensores químicos, cromatografía de gases con detección de masas y electroforesis capilar al control de medicamentos.

Este curso optativo de tipo fundamental fue impartido por D. Alberto Fernández Gutiérrez, D. Luís Fermín Capitán Vallvey y D. José Luís Vílchez Quero, Catedráticos del Departamento Química Analítica de la Universidad de Granada. La duración fue de 30 horas (3'0 créditos) teóricas. El temario se dividió en tres partes:

- **Sensores químicos.** En esta parte se definió el concepto de sensor, las partes de la que consta y las características que se le exigen, se estudiaron las diferentes clasificaciones existentes basándose en distintos criterios: actividad del proceso, especies inmovilizadas, tipos de proceso de reconocimiento, tipo de capa sensora, procesos de separación, tipo de transductor, relación receptor-transductor, forma de funcionamiento, forma externa del sensor, forma de operación y según el número de especies monitorizadas. Finalmente se estudiaron sensores que se aplican satisfactoriamente en el campo del control de calidad en la fabricación de medicamentos.

- **Cromatografía de gases con detección de masas.** Se explicó el fundamento de la cromatografía de gases y de la detección de masas. Se estudió la instrumentación

necesaria para ello, las dos forma operatorias que existen (modo barrido o Scan y monitorización de iones simples o SIM) y de qué manera puede ser esta técnica útil para la determinación de una gran diversidad de fármacos en distintas matrices con tal que los analitos presenten suficiente volatilidad y estabilidad térmica o puedan llegar a presentarla mediante una reacción de derivatización adecuada. Se definió el concepto de librería de espectros y cómo, mediante el empleo de potentes algoritmos de búsqueda, son capaces de identificar el fármaco de que se trate con un gran porcentaje de confianza.

- **Electroforesis capilar.** En este apartado se estudiaron los fundamentos de la técnica así como los fenómenos en los que se basa (electromigración y electroósmosis). Se desarrollaron los diferentes modos de trabajo (electroforesis capilar zonal, cromatografía electrocinética micelar, electrocromatografía capilar, electroforesis capilar en gel, isoelectroenfoque capilar e isotacoforesis capilar). Se describieron los componentes de un equipo básico y cuáles son y de qué manera afectan los parámetros que se deben optimizar en un método electroforético. Finalmente se expusieron las características que hacen de esta técnica una opción ideal para el control de medicamentos.

2.7. Aseguramiento de la calidad de los ensayos farmacéuticos.

Este curso optativo de tipo fundamental fue impartido por D. Juan Manuel Bosque Sendra, D. Luís Cuadros Rodríguez y D. Ignacio de Orbe Payá, Profesores Titulares del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada. La duración fue de 30 horas (3'0 créditos) de las que 24 (2'4) fueron de carácter teórico y 6 de carácter práctico. Los temas estudiados fueron los siguientes:

- **Calidad en los laboratorios de ensayo farmacéutico.** Se definieron los conceptos de calidad, trazabilidad y validación. Se estudiaron los elementos que componen un sistema de calidad, incluyendo normas y documentos de calidad, y se plantearon los requisitos para cumplir con las Buenas Prácticas de Laboratorio.

- **Evaluación de laboratorios farmacéuticos.** Se describió el marco legal en el que se mueven los laboratorios de ensayos. Se estudiaron los conceptos de certificación y acreditación, y fueron analizadas las auditorias de calidad, explicándose para ello las no conformidades y las acciones correctoras.

- **Gestión de equipos de laboratorio.** En este apartado se vieron las operaciones de gestión de equipos de laboratorio: calificación, mantenimiento, verificación y

calibración. Dentro de este último punto se explicaron las calibraciones directas y las indirectas, los modelos de regresión para establecer calibrados, además de la estabilidad del calibrado y los periodos de calibración.

- **Gestión de muestras de laboratorio.** Se definió el concepto de muestreo y se propusieron diversos planes para acometerlo. Se hizo notar la importancia del control de muestras y cómo se deben estabilizar, transportar, almacenar e identificar. Se explicó en qué consisten las muestras de control, patrones y materiales de referencia y los tipos que de ellos hay.

- **Estudios interlaboratorios.** Fueron expuestos los distintos tipos y metodologías de estudios interlaboratorios: estudios de aptitud, colaborativos, cooperativos y de certificación. Se estudiaron también los documentos reguladores: normas y protocolos.

- **Seguridad en los laboratorios farmacéuticos.** En este punto se vieron los riesgos asociados a los laboratorios farmacéuticos, las posibles vías de contaminación, intoxicación y contagio, y de qué manera se pueden prevenir estos riesgos. También se estudió la manera más correcta de llevar a cabo la gestión de residuos de laboratorio.

En las 6 horas prácticas se diseñaron y elaboraron documentos específicos para la gestión de la calidad en los laboratorios.

La calificación obtenida fue de sobresaliente.

B. PERIODO DE INVESTIGACIÓN

**DETERMINACIÓN DE FENOTIAZINAS EN PREPARADOS
FARMACÉUTICOS Y MUESTRAS BIOLÓGICAS MEDIANTE
ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL CON DETECCIÓN
QUIMIOLUMINISCENTE BASADA EN LA REACCIÓN DEL
LUMINOL CON FERRICIANURO POTÁSICO**

1. Línea de investigación.

Según la normativa que rige actualmente los estudios de Tercer Ciclo, los estudiantes que estén en posesión del certificado del Periodo de Docencia podrán iniciar el Periodo de Investigación Tutelada del programa correspondiente. Se deberán completar 12 créditos, matriculándose en una de las líneas de investigación, tutelados por el Profesor Doctor responsable de esa línea.

En el presente curso académico 2004/2005, me encuentro matriculado en el Programa de Doctorado “Química”, en la Línea “Desarrollo de métodos de análisis de residuos de fármacos en fluidos biológicos mediante cromatografía y electroforesis capilar” (código 83), perteneciente al área de conocimiento de “Química Analítica” y cuya responsable es la Profesora Dña. Ana M. García Campaña.

2. Objeto de la Memoria.

Una de las necesidades de la industria farmacéutica es la determinación de los principios activos de los productos que pone en el mercado (control del producto terminado), mediante análisis rápidos, lo más automatizados posibles y al menor costo. En este sentido, se persigue controlar la cantidad de principio activo que finalmente lleva el preparado farmacéutico puesto que cantidades superiores a la deseada pueden tener efectos muy negativos en el paciente, y cantidades inferiores harían ineficaz el medicamento. Además, se persigue controlar las posibles impurezas y productos no deseados que se hayan podido formar en el proceso de síntesis del principio activo como consecuencia de reacciones colaterales o incontroladas. En el mejor de los casos, estas impurezas no tendrán ningún efecto, pero es posible que sean perjudiciales aun estando en muy bajas concentraciones. Por ello es necesario el desarrollo de métodos de análisis sensibles que permitan llevar a cabo un control exhaustivo del producto terminado.

Por otro lado, más importante aún, en la práctica común de la farmacoterapia, es la monitorización del fármaco en el paciente. Para ello, es necesario su determinación rápida en fluidos corporales (sangre, plasma, suero y orina), para poder controlar sus efectos terapéuticos y tóxicos y así, asegurar la dosis beneficiosa para el enfermo. La rapidez en el análisis se hace aún más necesaria cuando hablamos de diagnósticos de sobredosis puesto que la decisión de un médico se basará en los resultados analíticos.

El análisis en fluidos biológicos supone un reto para la Química Analítica, fundamentalmente por dos aspectos. En primer lugar, nos encontramos ante matrices complicadas en las que puede haber un gran número de interferentes que nos impidan obtener una señal analítica adecuada. Estos interferentes serán, la mayoría de las veces, desconocidos, siendo otra de las complicaciones de estas matrices su variabilidad, no solamente entre distintos pacientes, sino también entre distintas horas del día para un mismo paciente. Esto obliga a disponer de métodos de análisis muy selectivos.

En segundo lugar, hay que tener presente que los fármacos, al realizar su función sanatoria, sufren procesos que modifican su estructura molecular y al final lo que se

puede encontrar en los fluidos biológicos es una cantidad muy pequeña del principio activo sin modificar. Esto obliga a disponer de métodos de análisis muy sensibles.

Entre todos los fármacos que hoy día se comercializan, son los antihistamínicos unos de los que mayor difusión tienen, creciendo su demanda cada año debido fundamentalmente a que cada vez es mayor el número de personas que sufren alergias.

En este sentido, el objetivo principal de esta memoria es la puesta a punto de un procedimiento analítico sensible para la determinación de fenotiazinas (concretamente promazina y prometazina) en preparados farmacéuticos y en muestras de orina. Para ello, se ha empleado la electroforesis capilar (CE) acoplada a un detector quimioluminiscente (CL), utilizando la reacción de exaltación, por parte de las fenotiazinas, de la quimioluminiscencia del luminol con ferricianuro potásico. De esta manera se pretende demostrar la potencialidad de la detección CL acoplada a CE en el análisis de fármacos en diversas matrices.

La mayoría de los métodos que se utilizan en la actualidad para el análisis de fármacos son cromatográficos o electroforéticos. Sin embargo, existen muy pocos métodos en bibliografía que usen la quimioluminiscencia como sistema de detección. El método más habitual para la determinación de fenotiazinas consiste en una detección UV-Vis o electroquímica previa separación mediante HPLC [1,2]. Otras técnicas empleadas han sido la fluorescencia [3], el inmunoensayo [4], la fotometría [5] y la cromatografía de gases [6]. El método aquí propuesto ha sido optimizado siguiendo la metodología de los diseños de experimentos, y ha sido aplicado satisfactoriamente a la detección de prometazina en preparados farmacéuticos, y a promazina en muestras de orina. En el desarrollo de esta memoria se recogerán las experiencias realizadas, los resultados obtenidos y la discusión de los mismos, así como las conclusiones alcanzadas en la presente investigación.

[1] G. Taylor y J. B. Houston, *J. Chromatogr. B*, 230 (1982), 194-198.

[2] J.E. Wallace, E.L. Shimek, S. Stavchansky y S.C. Harris., *Anal. Chem.*, 53 (1981), 960-962.

[3] B. Laassis, M. Maafi, J.J. Aaron y M.C. Mahedero, *Anal. Lett.* 30 (1997), 1541-1554.

[4] A. Mounsey, D. Strachan, F.J. Rowell, V. Rowell, y J.D. Tyson, *Analyst* 121 (1996), 955-958.

[5] T. Aman, A. Ali, I. Khokhar y A. Rashid, *Mikrochim. Acta* 126 (1997), 295-300.

[6] M.L. Olmos-Carmona y M. Hernández-Carrasquilla, *J. Chromatogr. B* 734 (1999), 113-120.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Definición y clasificación de los fármacos.

Por “fármaco” se entiende cualquier sustancia que cura, previene o alivia una enfermedad. Se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios [7]:

- 1) Según su estructura química.
- 2) Según el receptor sobre el que actúan.
- 3) Según la enfermedad que curan:
 - Agentes quimioterápicos: para enfermedades infecciosas y anticancerígenos.
 - Agentes farmacodinámicos: son los que se emplean para corregir una disfunción en el organismo causada por una enfermedad. Ej.: analgésicos.
- 4) Según el grado en el que la estructura afecta a la actividad biológica:
 - Inespecíficos estructuralmente: su actividad no está directamente subordinada a la estructura química, solamente en el grado en que esta estructura afecta a las propiedades físicas del fármaco (solubilidad, constante de ionización, etc.). Actúan por un mecanismo físico y físico-químico. Su actividad depende de la actividad termodinámica. Se administran en altas concentraciones, poseen estructuras muy variadas y pequeñas modificaciones en dicha estructura no originan cambios en la actividad.
 - Específicos estructuralmente: es el caso de las fenotiazinas y se caracterizan porque su actividad depende de la estructura química. Su actividad biológica se basa en la interacción con un receptor. Actúan por un mecanismo químico. Su actividad no depende de la actividad termodinámica. Se administran en bajas concentraciones. Compuestos con la misma actividad tienen estructuras muy semejantes, y si le afectan a la actividad pequeños cambios en la estructura química.

3.2. Descubrimiento y desarrollo de las fenotiazinas.

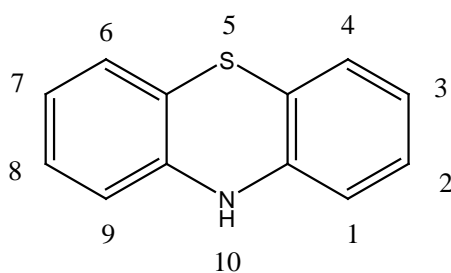
Una de cada cinco prescripciones que se dispensan en los EEUU es un fármaco destinado a modificar los procesos mentales, sea a través de la estimulación, sedación u otro cambio de comportamiento. Los fármacos que interfieren principalmente con los

[7] W.O. Foye. *Principios de Química Farmacéutica*. Editorial Reverté, Barcelona, 1991.

procesos mentales pueden dividirse en tres categorías, según su empleo clínico: los neurolépticos, los antidepresivos y los ansiolíticos. Cada una de estas clases comprende compuestos químicos de estructura no relacionada entre sí pero que, sin embargo, afectan a las mismas estructuras anatómicas y reacciones bioquímicas, por lo que producen efectos clínicos similares. Los neurolépticos, que también se han denominado antipsicóticos, ataráticos o “tranquilizantes mayores”, se emplean en el tratamiento de las psicosis. Uno de los representantes más destacados de este grupo son las fenotiazinas. Desde el punto de vista clínico, dichos agentes contrarrestan las alucinaciones y quimeras, alivian la excitación psicomotora, activan a los pacientes retraídos y facilitan su reajuste social. En cuanto a la acción bioquímica, su efecto esencial consiste en una reducción de la actividad dopaminérgica en el sistema nervioso central.

La indicación principal de los agentes neurolépticos consiste en el control de la esquizofrenia. Reducen la agitación, hostilidad, combatividad e hiperactividad y asimismo mejoran los estados de alucinación, pensamiento y percepción desordenados, retraimiento emocional y social, síntomas paranoides y descuido personal. Muchos de estos agentes reducen el umbral de convulsiones y disminuyen la actividad psicomotora. También afectan al control motor extrapiramidal. Las clases químicas más importantes, dentro de los fármacos con actividad antipsicótica, son las fenotiazinas, tioxantenos y butirofenonas.

Figura 1. Anillo de fenotiazina.



Fenotiazina

Las fenotiazinas, cuya estructura básica se muestra en la figura 1, es un uno de los grupos neurolépticos más empleados y pueden dividirse en tres subclases: alifáticos, piperidinas y piperazinas, de acuerdo con las diferencias en la estructura química del

sustituyente sobre el átomo de nitrógeno. Aunque la fenotiazina se sintetizó en 1883 y se ha empleado durante muchos años como antihelmíntico, no posee una actividad antipsicótica. El descubrimiento de esta clase de fármacos antipsicóticos proporciona un destacado ejemplo en la historia del desarrollo de los fármacos modernos y asimismo pone de manifiesto el carácter impredecible de la actividad biológica de aquellas moléculas que proceden de la modificación de un fármaco prototipo. El tipo estructural básico del que se originaron las fenotiazinas antipsicóticas es el correspondiente a los antihistamínicos derivados del benzodioxano I (figura 2). Bovet y Staub [8] establecieron en 1937 la hipótesis de que debían existir sustancias capaces de antagonizar la acción de la histamina y ensayó diversos compuestos de los que se conocía su acción sobre el sistema nervioso autónomo, siendo los primeros en reconocer la actividad antihistamínica. Con los benzodioxanos como punto de partida, se llevaron a cabo en varios laboratorios un gran número de modificaciones moleculares, dirigidas a la búsqueda de otros tipos de antihistamínicos. Los benzodioxanos condujeron a los éteres de etanolamina del tipo II, los cuales a su vez fueron modificados hasta los éteres del bencidrilo, caracterizados por la difenhidramina (III), un antihistamínico con utilidad clínica, o bien hasta las etilendiaminas (IV), que condujeron a fármacos como la tripelenamina (V). Una modificación posterior de las etilendiaminas antihistamínicas dio lugar a la incorporación de uno de los átomos de nitrógeno a un sistema de fenotiazina, lo que condujo a la fenotiazina (VI), con propiedades antihistamínicas y, como otros muchos fármacos con dicha acción, con un fuerte efecto sedante. La dietazina (VI) es más útil para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson que en las alergias, mientras que la prometazina (VII) se utiliza clínicamente como antihistamínico. En un esfuerzo dirigido a exaltar los efectos sedantes de estas fenotiazinas, Charpentier, dirigiendo la parte química, y Courvoisier, a cargo de la farmacológica, evaluaron un gran número de modificaciones de la prometazina. Esta investigación condujo en 1950 [9] a la síntesis de la clorpromazina (VIII), en la compañía Rhône-Poulenc. Poco después el cirujano francés Laborit y sus colaboradores [10] describieron la potencialidad de este compuesto para potenciar la acción de los anestésicos y producir “hibernación artificial”. Observaron que la clorpromazina por sí

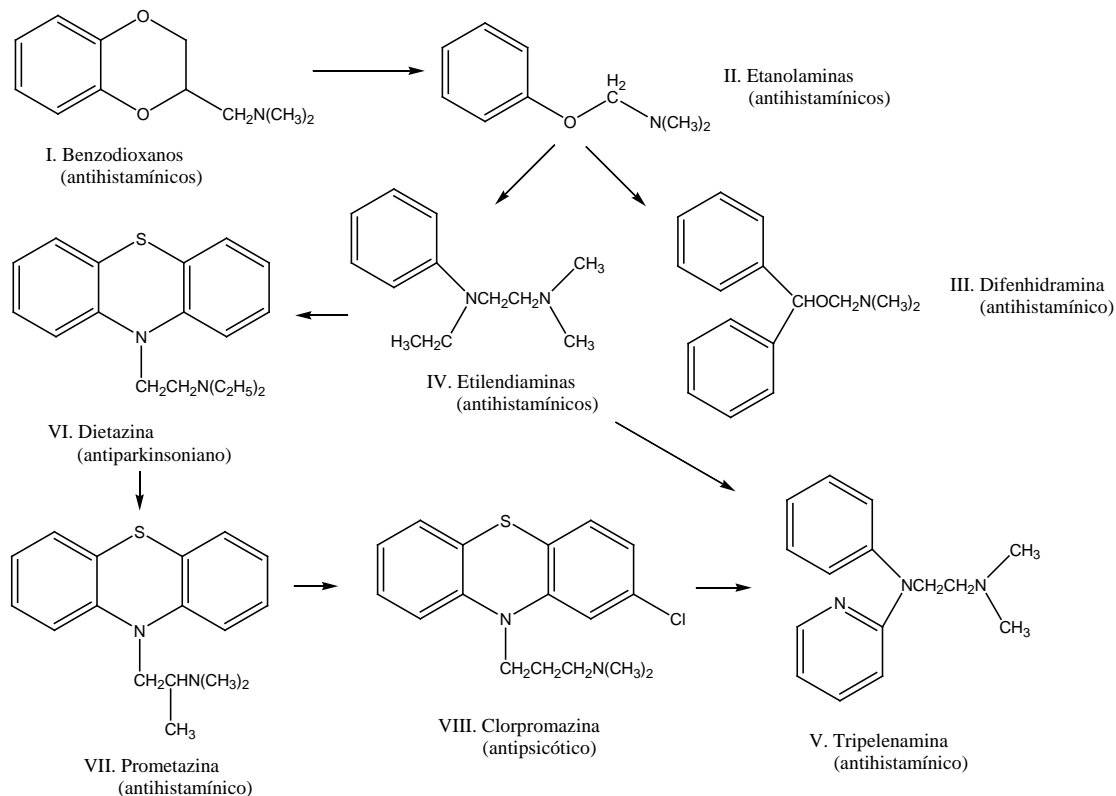
[8] D. Bovet y A.M. Staub, *C. R. Soc. Biol.*, 124 (1937), 547.

[9] P. Charpentier, U.S. Pat. 2,519,886; 2,530,451 (1950); P. Charpentier et al., *C.R. Acad. Sci.*, 59 (1952), 325.

[10] H. Laborit, P. Huguernard y R. Allvanume, *Presse Med.*, 206 (1952), 60.

sola no produce una pérdida de consciencia sino únicamente una tendencia al sueño y un profundo desinterés por el entorno.

Figura 2. Diagrama del desarrollo estructural de las fenotiazinas.



La primera comunicación acerca del tratamiento de las enfermedades mentales por medio de la clorpromazina se debe a Delay y col. [11]. Así, lo que inicialmente sólo suponía una serie de modificaciones moleculares menores de un antihistamínico, que producía “efectos secundarios” de tipo sedante, dio lugar al desarrollo de un grupo farmacológico principal que inició una nueva era en la farmacoterapia de las enfermedades mentales. Las fenotiazinas y aquellos fármacos relacionados han influido más positivamente sobre el destino de los esquizofrénicos que cualquier otro avance en la historia de la psiquiatría. Han permitido que muchos pacientes, antes relegados de por vida a la reclusión en una institución mental, puedan asumir un papel cada vez más importante en la sociedad.

3.3. Perfil farmacológico.

En su aspecto farmacológico, las fenotiazinas son extremadamente complejas. Según la dosis empleada, se origina un gran número de respuestas farmacológicas:

[11] J. Delay, T. Deniker y J.M. Harl, *Ann. Med. Psychol.*, 112 (1952), 110.

- Efecto antipsicótico: reducen la psicosis.
- Efectos antiadrenérgicos, anticolinérgicos, antihistamínicos y antiserotonínicos: unas fenotiazinas reducen el efecto vasopresor de la epinefrina y otras son eficaces antialérgicos.
- Potenciación de fármacos: incrementan la acción de barbitúricos y aumentan la duración de la anestesia con éter. Disminuyen la toxicidad de la anfetamina y del LSD.
- Efectos antieméticos: evitan la emesis producida por la apomorfina.
- Efectos antiparkinsonianos: sólo dos fenotiazinas son eficaces en el síndrome de Parkinson: la prometazina y la etopropazina.
- Efecto relajante muscular: producen sedación.
- Efectos cardiovasculares y respiratorios: la clorpromazina provoca hipotensión y en dosis pequeñas estimula la respiración, pero en dosis elevadas es fatal.
- Efecto sobre la temperatura corporal: reducen dicha temperatura quizás debido al efecto relajante muscular, pero no se pueden considerar antipiréticos.
- Otros efectos: estimulan el apetito y originan una ganancia de peso considerable.

3.4. Mecanismo de acción de las fenotiazinas.

A continuación discutiremos el mecanismo de acción de las dos fenotiazinas estudiadas: promazina (efecto antipsicótico) y prometazina (efecto antialérgico).

El efecto antipsicótico se fundamenta en un bloqueo de los receptores de la dopamina, según propusieron por primera vez Carlsson y Lindquist [12]. De hecho, hay estudios de rayos X que han demostrado que en la conformación preferida de las fenotiazinas son superponibles parcialmente a la dopamina. Estos autores observaron que la clorpromazina y los neurolepticos relacionados elevan la concentración de los metabolitos de la dopamina, como el ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético o el ácido vanilmandélico. La fenotiazina antihistamínica prometazina no es efectiva en el tratamiento de la esquizofrenia y no provoca alteraciones en las concentraciones de estos metabolitos metilados, una explicación posible es que el hecho de que sólo contenga dos átomos de carbono entre los dos nitrógenos hace que su estructura no sea superponible a la de la dopamina. Carlsson y Lindquist razonaron que las fenotiazinas

[12] A. Carlsson y M. Lindquist, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 140 (1963), 20.

bloquean los receptores de las catecolaminas, con lo que se emite un mensaje, a través de una retroalimentación neuronal, hacia las restantes neuronas corporales: “los receptores no estamos recibiendo suficiente cantidad de neurotransmisor ¡enviad más catecolaminas!”. En consecuencia, las neuronas productoras de catecolaminas incrementan su velocidad de funcionamiento y, a la vez, se origina un aumento de la síntesis de metabolitos de las catecolaminas. Este aumento es proporcional a la eficacia clínica de las fenotiazinas. La cuestión es que el bloqueo del receptor dopaminérgico por parte de algunas fenotiazinas origina una deficiencia funcional de la dopamina lo que explica los destacados efectos secundarios extrapiramidales semejantes a los observados en la enfermedad de Parkinson. Sin embargo hay fenotiazinas, como es el caso de la tioridazina, cuyos efectos extrapiramidales son menores. Una explicación puede ser su mayor afinidad por los receptores muscarínicos del cerebro, con los consecuentes efectos anticolinérgicos. Se sabe que los fármacos anticolinérgicos han tenido una especial eficacia a la hora de combatir los efectos secundarios extrapiramidales de las fenotiazinas. Su eficacia terapéutica en la enfermedad de Parkinson refleja la existencia de un equilibrio entre la dopamina y la acetilcolina, de modo que antagonizar los efectos de la acetilcolina es equivalente a exaltar los de la dopamina, y viceversa. Por tanto, cuando un paciente esquizofrénico que está siendo tratado con clorpromazina sufre de efectos extrapiramidales graves, se le puede suministrar tioridazina, que es de todas las fenotiazinas la de mayor poder anticolinérgico, para contrarrestar dichos efectos.

El efecto antialérgico se explica mediante la interacción de estos fármacos con algún lugar del receptor de la histamina y evitan con ello que la histamina manifieste sus repuestas. La histamina pueden actuar sobre dos receptores: H_1 y H_2 . Si antagonizamos los receptores de la histamina en H_1 conseguimos un efecto antialérgico, y si lo hacemos en H_2 es un efecto antiúlceras. Las fenotiazinas actúan sobre H_1 . Es necesario un nivel de investigación mayor para saber qué es lo que ocurre cuando la histamina se une al receptor H_1 , pero es probable que la histamina interaccione con las membranas celulares dando lugar a un incremento de la permeabilidad de la membrana a los iones inorgánicos y que esto produzca la diversidad de acciones farmacológicas. La facilitación de la entrada de Ca^{2+} explica el efecto estimulante de la histamina sobre la contracción del músculo liso. Las fenotiazinas podrían unirse al receptor H_1 en otro sitio distinto al que lo hace la histamina. Tal como ocurre con los enzimas sería un lugar

alostéreo. Tal unión podría producir una pequeña perturbación molecular reversible en la proteína y cambiar la naturaleza estructural y química del centro activo al que normalmente se une la histamina. Puede ocurrir que la histamina no se una al centro activo alterado o que si lo hace no manifieste su actividad.

3.5. Vías metabólicas de las fenotiazinas.

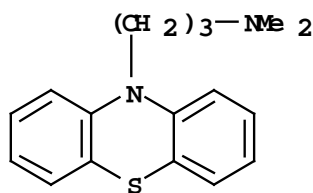
Para el químico analítico es importante conocer las vías metabólicas de un fármaco porque de esta manera puede decidir correctamente cuál es la matriz más idónea para realizar el análisis y qué otros metabolitos puede encontrar además del principio activo. La mayoría de los compuestos biológicamente activos que son extraños al organismo son liposolubles y, antes de ser excretados, los enzimas metabolizadores de fármacos los alteran químicamente, convirtiéndolos normalmente en sustancias menos tóxicas y más hidrosolubles. La formación de conjugados con ácido glucurónico es particularmente efectiva a la hora de aumentar la polaridad de los fármacos. La ruta principal de excreción de fármacos y sus metabolitos es la orina. Si los fármacos no se metabolizasen así, las sustancias con un coeficiente de reparto lípido/agua alto podrían reabsorberse fácilmente de la orina al plasma y continuarían circulando, con los que sus efectos farmacológicos se podrían prolongar. A menudo las moléculas muy polares o altamente ionizadas se excretan por la orina sin modificación. Las modificaciones que sufren las fenotiazinas son: N-desmetilación, sulfoxidación, hidroxilación en las posiciones 3 y 7, y conjugación con el ácido glucurónico.

3.6. Propiedades físicas

A continuación describiremos las propiedades físicas de los dos analitos estudiados en esta Memoria: promazina y prometazina.

La promazina es un sólido cristalino blanco y ligeramente higroscópico. Se afecta por el aire, la luz y trazas de metales pesados. Las disoluciones degradadas pueden ser de color rosa, rojo o azul.

Su estructura es la siguiente:



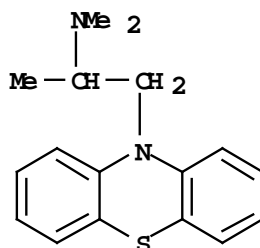
En la tabla 2 recogemos algunas de sus características más destacables.

Tabla 2. *Propiedades físicas de la promazina.*

Número CAS:	58-40-2
Nombre químico:	<i>N,N</i> -dimetil-3-(10 <i>H</i> -fenotiazin-10-il)propan-1-amina.
Solubilidad en agua:	Ligeramente soluble en agua si no es en forma de hidrocloreuro.
Punto de fusión:	181 °C
Punto de ebullición:	412 °C
Presión de vapor:	$5'08 \cdot 10^{-7}$ Torr (a 25 °C)
Entalpía de vaporización.	$66'54 \pm 3$ kJ/mol
Log P:	4'6
pK_a	9'4
Dosis	Habitualmente hasta 400 mg de hidrocloreuro de promazina diariamente. Más de 1 g diario puede ser peligroso.

La prometazina es un sólido blanco o débilmente amarillo que se oxida lentamente si se expone al aire. Las disoluciones se vuelven azules cuando se degradan.

La estructura de la prometazina es la siguiente:



Sus características más destacables son las que se recogen en la tabla 3.

Tabla 3. *Propiedades físicas de la prometazina.*

Número CAS:	60-87-7
Nombre químico:	<i>N,N</i> -dimetil-1-(10 <i>H</i> -fenotiazin-10-il)propan-2-amina.
Solubilidad en agua:	Ligeramente soluble en agua si no es en forma de hidrocloreuro.
Punto de fusión:	60 °C
Punto de ebullición:	403 °C
Presión de vapor:	$9'96 \cdot 10^{-7}$ Torr (a 25 °C)
Entalpía de vaporización.	$65'51 \pm 3$ kJ/mol
Log P:	4'7
pK_a	9'0
Dosis	Habitualmente desde 20 a 100 mg diarios. La dosis letal mínima es de 200 mg/kg.

3.7. Control de calidad en los productos farmacéuticos

Los orígenes de los fármacos pueden ser naturales, generalmente provenientes de plantas (de cualquiera de sus partes: raíces, tallos u hojas), o bien sintéticos. Si se pretende un uso comercial del fármaco es preferible la vía sintética puesto que las plantas suelen generar cantidades muy pequeñas. Esta vía consiste en generar el fármaco, una vez que se conoce el principio activo, a partir de estructuras más sencillas por síntesis total. Otra vía es la semisintética que consiste en hacer pequeñas modificaciones químicas a un producto natural. También se pueden obtener a partir de microorganismos. Sea cual sea la vía elegida para la obtención del producto final es, indudablemente, muy importante controlar todo el proceso. Es aquí donde aparece el concepto de calidad. La guía 25 de la ISO [13] define calidad como: “la totalidad de rasgos y características de un producto, proceso o servicio que inciden en su capacidad de satisfacer necesidades reguladas o implícitas”. Si la calidad es un proceso importante en todos los sectores industriales, ésta es aún de más relevancia en la industria farmacéutica. Por la finalidad y naturaleza de los productos farmacéuticos, la exigencia de calidad en éstos es mayor, debido a los posibles efectos perjudiciales para la salud. La calidad de un producto farmacéutico puede atribuirse a dos condiciones básicas:

- Que el producto farmacéutico en cuestión sea efectivo ante una determinada patología.
- Que no provoque efectos perjudiciales o no deseados, es decir, que sea seguro para la salud.

Una mayor exigencia de calidad se traduce en controles de calidad más estrictos y en el cumplimiento de normativas específicas, como Buenas Prácticas de Fabricación (Good Manufacturing Practices, GMPs) y Buenas Prácticas de Laboratorio (Good Laboratories Practices, GPLs). Los fabricantes europeos de medicamentos deben cumplir las Normas para la Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Medicamentos Veterinarios de la Unión Europea [14,15]. Esta normativa establece, de forma explícita, la obligación de llevar a cabo un control de calidad.

[13] ISO, Guide 25, *General Requirements for the Competence of Calibration and Testing Laboratories*, 1990.

[14] Normas sobre Medicamentos de la Unión Europea, Volumen 4: *Normas de Correcta Fabricación. Medicamentos de Uso Humano y Medicamentos Veterinarios*, 1999.

[15] Directiva 91/356/CEE. *Principios y Directrices de las Prácticas de la Correcta Fabricación de los Medicamentos de Uso Humano*, 1991.

A lo largo del siglo XX una serie de sucesos han propiciado la aparición de organismos reguladores para controlar la calidad de los productos farmacéuticos, con la finalidad de que éstos cumplan unos requisitos de calidad y seguridad. A principios de siglo, la escasa y dispersa normativa sobre control de calidad y de seguridad de los medicamentos, no imponía condiciones estrictas a las industrias farmacéuticas en la fabricación y comercialización de sus productos. En EEUU, la Federal Pure Food and Drug Act de 1906 legislaba sobre el transporte interestatal de alimentos y medicamentos adulterados. Esta ley no obligaba a las compañías farmacéuticas a establecer ni la eficacia ni la seguridad de los medicamentos que comercializaba.

En 1938 más de 100 niños murieron en EEUU como consecuencia de la comercialización de una solución de sulfanilamida en dietilenglicol, que es un excelente disolvente pero a la vez muy tóxico. Este desgraciado hecho dio origen ese mismo año a la enmienda del acta federal de 1906, a partir de la cual se incluyó el concepto de seguridad de los medicamentos, siendo la Food and Drug Administration (FDA) la encargada de su aplicación práctica. A partir de ese momento, se comenzaron a exigir estudios de toxicidad a los fármacos existentes, a la vez que era necesario que la FDA diera su visto bueno (New Drug Application, NDA) a un fármaco nuevo para que pudiera ser fabricado y distribuido. Sin embargo, aún no se exigían pruebas de eficacia de un medicamento para darle el permiso de comercialización. Además un fármaco pasaba de los ensayos en animales a los ensayos en humanos sin la aprobación de la FDA.

En la década de los 60, el desastre de la talidomida, medicamento promovido para ser utilizado durante el primer trimestre de embarazo y que resultó ser altamente teratogénico, marcó un antes y un después en lo referente a la normativa farmacéutica. Se introdujeron, en todos los países desarrollados, leyes que exigían seguridad y eficacia demostrada con ensayos clínicos controlados. En los EEUU la respuesta fue una enmienda al acta de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos en 1962 que requiere que se presente suficiente investigación farmacológica y toxicológica en animales antes que un nuevo fármaco pueda ser aprobado en humanos. En Europa, los países irían paulatinamente adaptando su legislación: Noruega y Suecia (1964), Inglaterra (1968), Suiza (1971) y Alemania (1976). Las nuevas leyes exigían a los productos

farmacéuticos pruebas que demostrasen la eficacia y la seguridad relativa del nuevo medicamento en términos de la relación riesgo / beneficio.

Los nuevos requisitos de estas leyes determinaron que el tiempo total de desarrollo de un fármaco nuevo se extendiera de 8 a 9 años. En los últimos años los organismos reguladores de los medicamentos se han visto envueltos en un debate con grupos de consumidores y las compañías farmacéuticas en relación a la demora en la aprobación de aquellos fármacos para enfermedades con riesgo vital (SIDA, Esclerosis Múltiple, etc.). Estos organismos se encuentran ante la difícil tarea de equilibrar, por un lado, su misión de garantizar la seguridad y eficacia de los nuevos medicamentos y, por otro, la necesidad de la sociedad de disponer de los medicamentos útiles en un tiempo razonable.

En Europa, la situación a lo largo de la primera mitad del siglo XX ha sido de una total descentralización de los organismos reguladores farmacéuticos. Cada estado, por medio de sus respectivos ministerios de Sanidad, regulaba la producción y comercialización de los medicamentos en su territorio, así como los controles de eficacia y seguridad que debían cumplir. Desde 1965 la Comunidad Económica Europea ha desarrollado una intensa actividad de armonización, desarrollando directivas y recomendaciones referentes a los medicamentos con medidas en defensa de los intereses de los pacientes y de los consumidores. Desde la constitución de la Unión Europea (UE) en 1995, los organismos normativos del medicamento se ha agrupado en la European Agency for the Evaluation of Medicinal Drugs (EMA). Los gobiernos europeos y las industrias farmacéuticas coincidieron en un punto de común interés: “Poner en el mercado medicamentos seguros y efectivos, dándose prioridad a la seguridad, en el menor tiempo posible para beneficio de los pacientes”. La EMA dispone el marco normativo que atañe a los productos farmacéuticos para todos los estados que conforman la UE.

En España, el organismo encargado de regular todo lo relacionado con los productos farmacéuticos es la Agencia Española del Medicamento. Esta organización, creada en 1997, unifica por primera vez las actividades de evaluación, autorización, registro y control de los medicamentos de uso humano y veterinario en España. La Agencia Española del Medicamento es un Organismo Autónomo, adscrito al Ministerio

de Sanidad y Consumo, cuyo objetivo esencial es garantizar que los medicamentos autorizados y registrados en España respondan a estrictos criterios de calidad, seguridad y eficacia, según lo establecido en la normativa sobre medicamentos de la UE y en las normativas españolas.

3.8. Controles de rutina farmacéuticos.

En esta apartado se describen algunos de los test más habituales que se realizan durante el control de calidad que se lleva a cabo en el proceso de producción de fármacos.

- **Aspecto:** se trata de realizar una inspección cualitativa del producto, tanto si es materia prima como producto final o intermedio. Se comprueban distintas características del producto como: apariencia (sólido, líquido, suspensión...), color, forma, tamaño, etc. Suele realizarse mediante una simple inspección visual del producto.

- **Identificación:** los test de identificación deben establecer la identidad del producto analizado y ser capaces de discriminar entre compuestos parecidos o de estructura relacionada que pueden formar parte de la muestra. Este test debe ser lo más específico posible. Si un solo método no fuese capaz de identificar se puede emplear una combinación de varios.

- **Ensayo de contenido:** consiste en una determinación cuantitativa del producto, para establecer su grado de pureza o bien para determinar el contenido de uno o más componentes de la muestra. Una vez realizada la determinación se comprueba si el valor obtenido coincide con las especificaciones del producto.

- **Sustancias relacionadas:** bajo este nombre se recogen tanto las posibles impurezas que pueda contener una muestra (orgánicas e inorgánicas), tanto derivadas de la degradación de alguno de los componentes de la muestra como del proceso de producción (caso de disolventes residuales). Se debe disponer de métodos adecuados que permitan determinar los bajos niveles de concentración de este tipo de sustancias en los productos farmacéuticos para demostrar que éstos se encuentran por debajo de los valores establecidos como aceptables.

- **Propiedades físico-químicas:** es muy común llevar a cabo la determinación de algunas propiedades fisicoquímicas de los productos farmacéuticos. Las propiedades a determinar varían en función de la naturaleza del producto. De esta forma, en preparados líquidos (bebibles o inyectables) se suelen realizar controles de pH, mientras

que en productos sólidos se realizan controles de tamaño de partícula (granulometría), control de dureza, etc.

- Test de disolución: es una medida que indica como el principio activo es liberado del producto farmacéutico. Es una prueba muy importante en control de calidad de preparados sólidos, ya que da una aproximación del comportamiento del fármaco en el cuerpo una vez consumido.

- Test de uniformidad de contenido: es una medida de la homogeneidad del producto. También se la puede denominar homogeneidad del lote, puesto que se comprueba que distintas partes de un mismo lote contengan la misma cantidad de principio activo.

- Ensayos biológicos: este tipo de ensayos se realizan utilizando organismos microbiológicos para evaluar determinadas propiedades del fármaco. Se suelen realizar para muestras líquidas de las cuales debe evaluarse su esterilidad, o en vacunas para evaluar su efectividad. Son muy diversos y suelen ser específicos para cada fármaco.

La mayoría de los test que se han descrito se suelen realizar mediante métodos instrumentales de análisis. La tendencia actual de la farmacopea es a introducir nuevos métodos de análisis que permitan obtener resultados de forma más sencilla, rápida, fiable, preferiblemente automatizables y que no requieren personal muy cualificado. Por todo ello, es habitual que el Departamento de Control de Calidad disponga de un número considerable de técnicas instrumentales de análisis para el control de rutina. Las más habituales son HPLC, cromatografía de gases, espectrofotometría UV-Vis, de infrarrojos, de absorción y/o emisión atómica de llama y polarimetría. Últimamente están surgiendo nuevas técnicas instrumentales que intentan resolver los problemas o limitaciones de las técnicas más clásicas. De este modo, es muy común la hibridación de técnicas: conjunción de técnicas separativas con técnicas espectroscópicas para aunar las ventajas de ambos. En esta memoria se aborda precisamente la introducción de dos nuevas técnicas a los problemas analíticos que se presentan en los laboratorios farmacéuticos y clínicos: electroforesis capilar y quimioluminiscencia. Ambas técnicas presentan un gran potencial analítico y una gran versatilidad en su posible aplicación al control de calidad y a los análisis clínicos.

3.9. Electroforesis capilar.

El nombre de electroforesis proviene del griego Electro (electricidad) Foros (llevar). Fue descrita por primera vez en 1930 por Arne Tiselius en su tesis doctoral y el primer artículo con referencia a este tema se publicó en 1937 [16]. En 1967, Hjertén introdujo el concepto de electroforesis capilar (CE), describiendo su aplicación a la separación de proteínas séricas, iones orgánicos e inorgánicos, péptidos, ácidos nucleicos, virus y bacterias [17]. Al final de la década de los 70 e inicios de los 80, la electroforesis en zona libre (CZE) se aplicó de nuevo [18,19,20] utilizando un capilar de PTFE con un diámetro interno de 200 micras. Jorgenson y Lukacs demostraron el potencial de la CE, también denominada electroforesis capilar de alta resolución (HPCE), gracias a la introducción de los capilares de sílice fundida con diámetros internos inferiores a 100 micras y de las fuentes de alto voltaje. La CE experimentó una importante evolución en los modos de trabajo, inicialmente las separaciones se realizaban mayoritariamente en CZE, y en sus campos de aplicación a partir de los años 80. Así, en 1984 los estudios de Terabe y col. [21] introdujeron la cromatografía electrocinética micelar (MEKC) para la separación de moléculas neutras y cargadas mediante la adición de surfactantes al electrolito para formar micelas. La CE con enfoque isoeléctrico (CIEF) fue introducida en 1985 por Hjertén y Zhu [22] y la electroforesis capilar en gel [23] (CGE) y los capilares recubiertos supusieron también un avance importante para esta técnica de separación. En la tabla 4 se recogen los eventos históricos más destacables.

[16] A.Tiselius, *Trans Faraday Soc.*, 33 (1937), 524-531.

[17] S. Hjertén, *Chromatogr. Rev.*, 9 (1967), 122-128.

[18] F.E.P.Mikkers, F.M. Everaerts y T.P.E.M. Verheggen, *J Chromatogr.*, 169 (1979), 11-20.

[19] J.W. Jorgenson y K.D. Lukacs, *J. Chromatogr.*, 218 (1981), 209-216.

[20] S. Hjertén, *J. Chromatogr.*, 270 (1983), 1-6.

[21] S. Terabe, S. Otsuka, A. Tsuchiya y T. Ando, *Anal Chem.*, 56 (1984), 111-117.

[22] S. Hjertén y M.D. Zhu, *J. Chromatogr.*, 346 (1985), 265-270.

[23] A.S.Cohen y B.L. Karger, *J. Chromatogr.*, 397 (1987), 409-417.

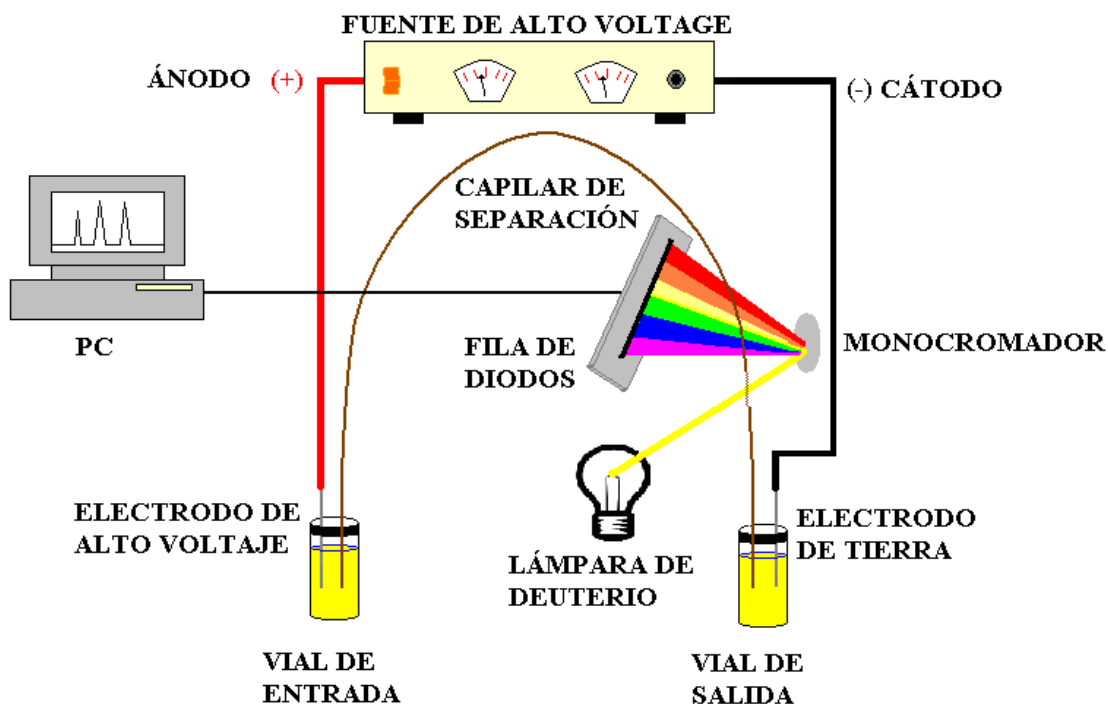
Tabla 4. *Desarrollo histórico de la electroforesis capilar.*

Año	Investigadores	Desarrollo
1886	Lodge	Migración de H ⁺ en un tubo con gelatina de fenolftaleína
1899	Hardy	Movimiento de globulinas en tubos en forma de U con corriente eléctrica
1923	Kendall y Crittenden	Separación preparativa de isótopos en tubos en forma de U con agar
1937	Tiselius	Desarrollo del primer aparato para electroforesis convencional
1956	Porath	Electroforesis en columna usando polvo de celulosa
1965	Tiselius	Electroforesis libre de partículas de virus en capilares rotatorios de 3 mm de d.i.
1967	Hjertén	Descripción de la electroforesis capilar como electroforesis libre.
1974	Virtanen	Demostración de las ventajas de emplear capilares de diámetros más pequeños
1979	Mikkers	Electroforesis en capilares de teflón (< 200 µm d.i.)
1981	Jorgenson y Luckacs	Comienzo de la electroforesis capilar en capilares de pyrex (< 75 µm d.i.)
1983	Hjertén	Adaptación de la SDS-PAGE a la electroforesis capilar en gel
1984	Terabe	Aparición del modo de cromatografía capilar electrocinética micelar (CCEM)
1987	Cohé y Karger	Demostración de la eficacia de utilizar capilares de diámetros muy pequeños en la electroforesis capilar en gel
1989		Aparición del 1 ^{er} instrumento comercial de electroforesis capilar

La separación en electroforesis capilar se basa en las diferencias entre las movilidades electroforéticas de los distintos analitos (como consecuencia de su diferente relación carga / tamaño) dentro de un tubo capilar lleno de disolución tampón cuando son sometidos a la acción de un campo eléctrico. Para llevar a cabo la separación son necesarios los siguientes elementos que se detallan en la figura 3:

- Fuente de alto voltaje: capaz de aplicar hasta 30 kV.
- Capilar: su diámetro interno oscila entre 25 y 100 µm y el externo es de 375 µm.
- Detector: el más utilizado es el de UV-Visible de diodos en fila aunque también se puede utilizar un detector fluorescente, un espectrómetro de masas y en desarrollo se encuentran los detectores quimioluminiscentes, fosforescentes y de espectroscopía Raman.
- Viales: además del vial de muestra son necesarios un vial con agua, otro con NaOH y otro con tampón para acondicionar el capilar, un vial de desecho y dos más con tampón para cerrar el circuito cuando apliquemos un voltaje.
- Sistema de introducción de la muestra: el modo más habitual es aplicando presión sobre el vial de muestra (inyección hidrodinámica) aunque también se puede hacer mediante la aplicación de un voltaje (inyección electrocinética). Otra posibilidad es elevando el vial de entrada para que la muestra entre por gravedad (inyección por efecto sifón).

Figura 3. Diagrama de un sistema de electroforesis capilar.



Los dos fenómenos en los que se basan las separaciones electroforéticas son: electroósmosis y electromigración, de tal manera que el flujo de iones será la suma del flujo electrosmótico y el flujo electroforético. El flujo electrosmótico (Electrosmotic Flow, EOF) está provocado por el movimiento de los cationes de la disolución tampón que contrarrestan la carga negativa de los grupos silanoles que constituyen la pared interna del capilar de sílice. Se forma una doble capa eléctrica o, también denominada, capa móvil. Estos cationes arrastran moléculas de disolvente en su movimiento hacia el cátodo lo que origina un flujo de disolvente en ese sentido. Cuanto mayor es el pH mayor es este flujo. El flujo electroforético sólo afecta a las especies cargadas en disolución cuando se someten a la acción de un campo eléctrico externo.

Los parámetros instrumentales que afectan a la calidad de la separación electroforética son los siguientes:

- Tiempo de migración (t): se define como el periodo de tiempo que transcurre entre la introducción de la muestra dentro del capilar y la aplicación del campo eléctrico y su paso por el detector.
- Eficacia (N): la eficacia de una separación se puede considerar como la capacidad de una columna para conseguir que los analitos salgan lo más tarde y lo más agrupados posible.

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

t: tiempo de migración, $w_{1/2}$: anchura del pico a media altura.

▪ Resolución: mide la calidad de la separación en base a la capacidad que tiene un determinado método para separar 2 componentes contiguos de una mezcla.

$$R = 2 \left(\frac{t_2 - t_1}{w_2 + w_1} \right) \quad t_2 > t_1, \quad w: \text{anchura del pico en la base.}$$

Las variables que en CE van a afectar a los parámetros anteriores son las siguientes:

a) pH del tampón: es necesario una disolución conductora que nos permita mantener una corriente estable y que nos asegure una ionización adecuada en los analitos para su separación.

b) Naturaleza del tampón: una vez que se elige el pH adecuado se estudian los tampones que pueden trabajar a ese pH. No es una cuestión baladí puesto que puede haber importantes diferencias de unos a otros.

c) Concentración de tampón: un aumento en la concentración de tampón provoca un aumento en la viscosidad del mismo lo que origina tiempos de migración y eficacias mayores. También puede mejorar la resolución. La concentración máxima viene limitada por el efecto Joule.

d) Voltaje de separación: se tiende a trabajar con los voltajes más altos posibles (hasta 30 kV) porque así tendremos tiempos de análisis menores. La limitación viene impuesta, otra vez, por el efecto Joule.

e) Dimensiones del capilar: es importante tanto su diámetro interno (desde 25 a 100 μm) como su longitud (desde 30 a 110 cm).

f) Temperatura del capilar: es importante porque afecta a la viscosidad del tampón (se suele variar entre 10 y 40 $^{\circ}\text{C}$).

g) Aditivos del tampón: son muy variados, los más habituales son: surfactantes (dodecil sulfato sódico (SDS) y bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB), entre otros), ciclodextrinas y disolventes orgánicos (acetonitrilo y metanol).

Las modalidades de electroforesis que se emplean actualmente son las siguientes:

- Electroforesis capilar zonal (CZE): es la modalidad más empleada por ser la más sencilla. Consiste en rellenar todo el capilar con un electrolito fondo que en la mayoría de los casos es un tampón.
- Cromatografía electrocinética micelar (MEKC): consiste en añadir micelas al electrolito fondo de manera que los compuestos neutros se distribuyen en un equilibrio entre dentro y fuera de la micela. Permite separar compuestos neutros y cargados a la vez. En vez de micelas podemos añadir ciclodextrinas y tendremos electroforesis capilar quiral (CCE).
- Isoelectroenfoque capilar (CIEF): consiste en establecer un gradiente de pH a lo largo del capilar. Se ha empleado para separar proteínas y péptidos basándose en sus diferentes puntos isoeléctricos.
- Electroforesis capilar en gel (CGE): el capilar se rellena con un gel. La separación se basa en las diferencias de tamaños entre moléculas puesto que el gel actúa de criba.
- Isotacoforesis capilar (CITP): es similar a CZE con la diferencia de que ahora el electrolito no es continuo, el tampón de entrada no es el mismo que el de salida. Su limitación es que no podemos separar cationes y aniones a la vez.
- Electrocromatografía capilar (CEC): el capilar se rellena de fase estacionaria y los analitos se separan en base al equilibrio de partición entre la fase estacionaria y la fase móvil. La diferencia con HPLC estriba en que la fuerza que hace avanzar a los analitos por la columna no es una bomba de alta presión sino el campo eléctrico aplicado.

Como características de la CE debemos destacar que se trata de una nanotécnica, tanto en los volúmenes de muestra que emplea (1 a 40 nL) como en los volúmenes de reactivos. Esto la convierte en una técnica más barata y menos contaminante si se compara con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se trata también de una técnica rápida puesto que los tiempos de análisis suelen ser siempre inferiores a 30 min., incluso a veces se consiguen separaciones en menos de 2 min. Quizás su característica más destacable es su alta eficacia, pudiéndose conseguir fácilmente cientos de miles de platos teóricos y en ocasiones hasta varios millones. La razón estriba fundamentalmente en su perfil de flujo plano, recordemos que en HPLC los perfiles de

flujo son parabólicos. Otra característica importante es que no se encuentra limitada por el peso molecular de los analitos, pudiendo separar, en la misma columna, desde pequeñas moléculas hasta otras mucho más complicadas, y al igual que HPLC se puede automatizar completamente. Si bien es verdad que CE es menos sensible que HPLC debido al poco volumen de muestra que se introduce en el capilar, y a un camino óptico menor (si hablamos de detección UV-Vis o fluorescente), también es cierto que es posible realizar técnicas de concentración “on-line”, lo que aumenta considerablemente su capacidad de detección. Otra opción para mejorar la sensibilidad es emplear técnicas de detección que sean más sensibles, como es el caso de la quimioluminiscencia (CL).

3.10. Detección quimioluminiscente.

La quimioluminiscencia (CL) es un fenómeno basado en la producción de radiación electromagnética a través de una reacción química en la que se produce una especie intermedia en estado excitado, la cual puede emitir radiación directamente al regresar al estado fundamental (CL directa), o bien transferir su energía a un fluoróforo, el cual retornará al estado fundamental emitiendo radiación característica de su naturaleza (CL sensibilizada). La intensidad de la radiación emitida depende de la concentración de cualquiera de las especies implicadas en estas reacciones (oxidantes, catalizadores, precursores quimioluminiscentes, fluoróforos, etc.). En este sentido se pone de manifiesto la versatilidad de la técnica con finalidad analítica ya que pueden ser detectadas y/o cuantificadas cualquiera de las sustancias que participan directa o indirectamente en estas reacciones [24].

Las técnicas analíticas basadas en la CL pueden proporcionar medidas muy sensibles, presentando en ocasiones falta de selectividad. Aunque las primeras observaciones fueron realizadas por Radziszewski en 1877 con la lofina (2,4,5-trifenilimidazol) al emitir una luz verde en su reacción con oxígeno en medio alcalino, las investigaciones sobre el uso analítico de la CL se han desarrollado fundamentalmente desde 1970 en fase gaseosa y desde 1980 para reacciones en fase líquida. Desde entonces, el número de reacciones CL citadas en la bibliografía se ha incrementado cada año, con aplicaciones analíticas en el ámbito de la química,

[24] A.M. García Campaña y W.R.G. Baeyens (eds.) *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*. Marcel Dekker, New York, 2001.

biomedicina, alimentación, medioambiente y toxicología [25,26,27,28]. En la última década destaca su empleo como sistema de detección en el análisis por inyección en flujo (FIA), en sistemas de cromatografía líquida (HPLC) e inmunoanálisis [29,30,31,32,33,34].

Una ventaja de la detección CL es que requiere una instrumentación muy sencilla, ya que no se necesita fuente de excitación, al ser la propia reacción CL la que proporciona la energía requerida. Esto supone la ventaja adicional de una mayor estabilidad en la línea de base, con lo que se mejoran los límites de detección, proporcionando excelentes sensibilidades debido al bajo ruido de fondo. Por este motivo a esta técnica se la ha clasificado como de “*campo oscuro*”, ya que produce una señal frente a un fondo nulo, haciéndola fácilmente detectable y siendo posible adquirir la señal mediante un tubo fotomultiplicador (TFM) que sea lo suficientemente sensible para la región espectral de interés.

En la última década se ha comenzado a explorar la CL como técnica de detección para CE, ofreciendo excelentes sensibilidades y elevada selectividad, y permitiendo la resolución y cuantificación de diversos analitos en mezclas complejas. Algunos artículos de revisión recogen los avances y aplicaciones de los sistemas CE-CL [35,36,37,38,39,40,41,42]. Debido a las ventajas de esta detección y a su potencial

-
- [25] A.C. Calokerinos, N.T. Deftereos y W.R.G. Baeyens., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13 (1995), 1063-1071.
- [26] M.J. Navas y A.M. Jiménez., *Food Chem.*, 55 (1996), 7-15.
- [27] A.M. Jiménez y M.J. Navas, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 27 (1997), 291-305.
- [28] L.J. Kricka., *Anal. Chim. Acta*, 500 (2003), 279-286.
- [29] T.A. Nieman, en W.R.G. Baeyens, D. De Keukeleire y K. Korkidis (Eds.), *Luminescence Techniques in Chemical and Biochemical Analysis; Practical Spectroscopy Series, Vol. 12*. Marcel Dekker, New York, 1995. 523-561
- [30] A.R. Bowie, M.G. Sander y P.J. Worsfold., *J. Biolum. Chemilum.*, 11 (1996), 61-90.
- [31] L.P. Palilis, A.C. Calokerinos, W.R.G. Baeyens, Y. Zhao y K. Imai., *Biomed. Chromat.*, 11 (1997) 85-86.
- [32] W.R.G. Baeyens, S.G. Schulman, A.C. Calokerinos, Y. Zhao, A.M. García-Campaña, K. Nakashima y D. De Keukeleire., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17 (1998), 941-953.
- [33] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, X. Zhang, E. Smet, G. Van der Weken, K. Nakashima y A.C. Calokerinos., *Biomed. Chromatog.*, 14 (2000), 166-172.
- [34] A.M. García-Campaña y W.R.G. Baeyens., *Analisis*, 28 (2000), 686-698.
- [35] W.R.G. Baeyens, B. Lin Ling, K. Imai, A.C. Calokerinos y S.G. Schulman., *J. Microcol. Sep.*, 6 (1994), 195-206.
- [36] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens y Y. Zhao., *Anal. Chem.*, 69 (1997), 83A-88 A.
- [37] T.D. Staller y M.J. Sepaniak., *Electrophoresis*, 18 (1997), 2291-2296.
- [38] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens y N.A. Guzman., *Biomed. Chromatog.*, 12 (1998), 172-176.
- [39] R. Zhu y W.Th. Kok., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17 (1998), 985-999.
- [40] X.J. Huang y Z.L. Fang., *Anal. Chim. Acta*, 414 (2000), 1-14.

cuando se combina con la alta eficacia en la separación que presenta la CE, la investigación en esta área se ha incrementado significativamente, aunque existen ciertos inconvenientes que pueden limitar su aplicación. En primer lugar, cualquier sustancia fluorescente podría ser medida tras una excitación química adecuada, lo que implica que los reactivos CL no son exclusivos para un único analito. Esta falta de selectividad es importante en las aplicaciones en FIA, donde deben incorporarse reactores selectivos antes de que se produzca la reacción CL, sin embargo en combinación con técnicas separativas como HPLC o CE no es una limitación importante. Una desventaja de la CL en el acoplamiento con CE es la gran dependencia que presenta la emisión de factores influyentes en las condiciones de la reacción, lo que implica establecer una solución de compromiso entre las condiciones requeridas en la separación electroforética, y las necesarias para la reacción CL. Por último, ya que la emisión CL no es constante, sino que varía con el tiempo y este perfil de emisión frente a tiempo difiere de unos sistemas CL a otros, se debe tener la precaución de detectar la señal CL en un sistema en flujo a un tiempo fijo, coincidiendo con el momento en el que se produzca el máximo de emisión en la ventana de detección.

Hoy en día, la necesidad de mejorar las técnicas de detección está claramente relacionada con la tendencia general de la Química Analítica de disminuir el consumo de disolventes orgánicos mediante el empleo de sistemas en fase acuosa, además de reducir el tamaño de muestra, analizando concentraciones cada vez menores. Ya que la CL puede mejorar estos aspectos, proporcionando bajos límites de detección, amplios rangos lineales y alta sensibilidad, en los últimos años el acoplamiento de diferentes sistemas CL con equipos de CE presenta un considerable potencial, fundamentalmente en la detección de analitos a niveles traza en muestras de cantidad limitada.

Las reacciones quimioluminiscentes en fase líquida más destacables son las siguientes [43]:

- Reacciones de oxidación que utilizan como precursor quimioluminiscente el luminol (5-aminofthalhidracida) o sus derivados, como el N-(4-aminobutil)-N-

[41] A.M. García-Campaña, L Gámiz-Gracia, W.R.G. Baeyens y F Alés-Barrero., *J. Chromatog. B*, 793 (2003), 49-74.

[42] F. Li, C. Zhang, X. Guo y W. Feng., *Biomed. Chromatog.*, 17 (2003), 96-105.

[43] K. Nakashima y K. Imai y S.G. Schulman (ed.) *Molecular Luminescence Spectrometry*, part 3. New York, Wiley, 1993, Pp 1-23.

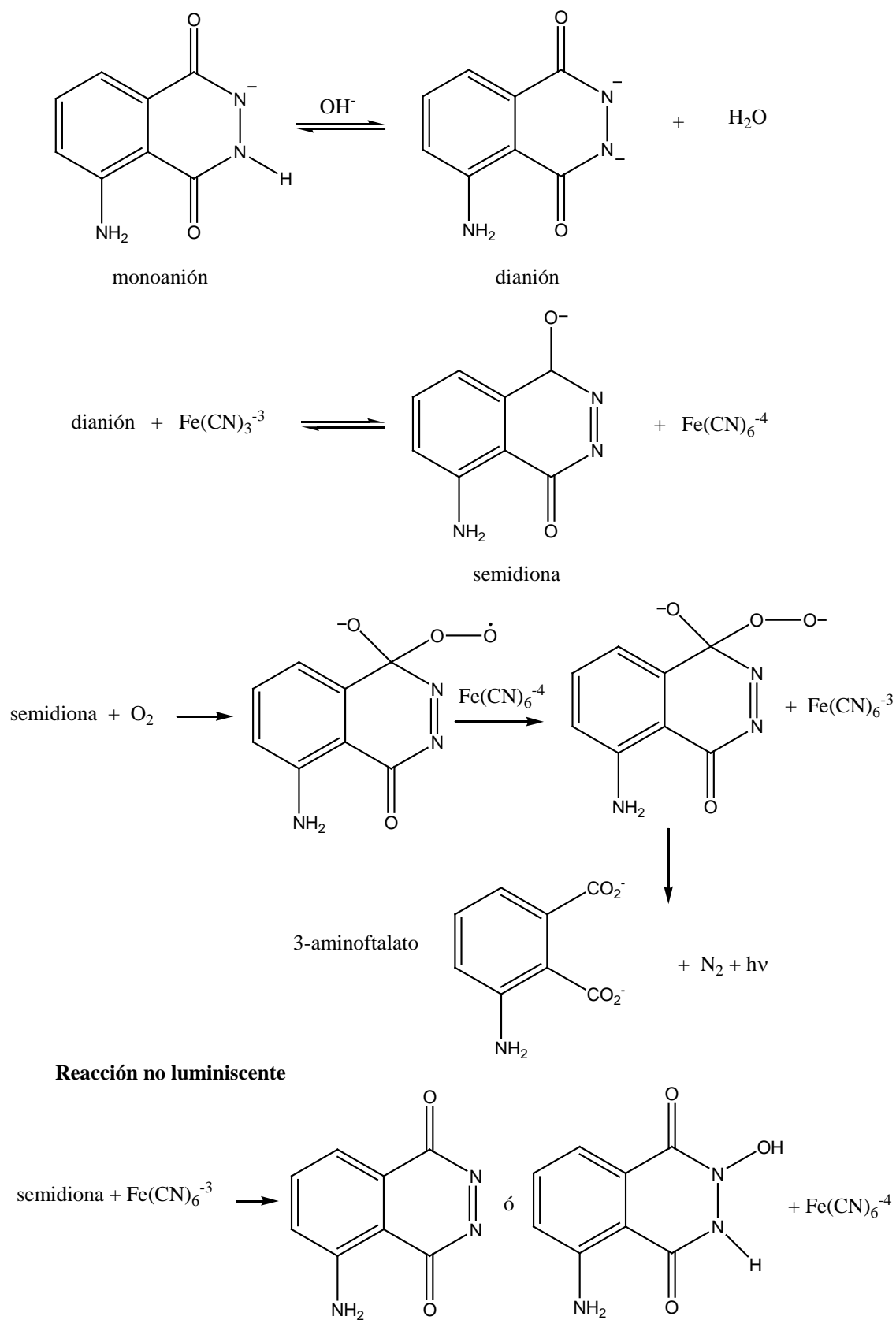
etilisoluminol (ABEI), en medio básico, catalizada por enzimas que contiene grupos hemo o iones metálicos.

- Reacciones de oxidación que utilizan como precursores quimioluminiscentes ésteres de acridinio en medio básico, fundamentalmente la lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridinio).
- Reacciones de oxidación directa, con oxidantes usuales, en medios ácidos o básicos, que generan como producto de la oxidación un derivado excitado que emite radiación luminosa.
- Quimioluminiscencia sensibilizada: la más representativa es la que implica la oxidación de peroxioxalatos, fundamentalmente bis (2,4,6- triclorofenil) oxalato (TCPO) y bis (2,4-dinitrofenil) oxalato (DNPO), mediante peróxido de hidrógeno y en presencia de un fluoróforo responsable de la emisión de luz.

3.11. Sistemas quimioluminiscentes con luminol empleados en CE.

La oxidación del luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona) en medio básico es la reacción más representativa en CL directa, en la que se produce el ión excitado 3-aminofthalato que emite luz en el intervalo de longitudes de onda entre 425-435 nm. Se pueden emplear oxidantes como permanganato, hipoclorito, yodo o ferricianuro (figura 4), aunque el más común es el peróxido de hidrógeno. La reacción está catalizada por iones metálicos (Fe(II), Cu(II), Co(II), etc.), y algunos complejos metálicos (hemina, hemoglobina y peroxidasa). Al ser la emisión resultante proporcional a las concentraciones de luminol, oxidante y catalizador, ésta puede aplicarse en la determinación de iones metálicos o enzimas (peroxidasas, compuestos hemáticos, etc.), oxidantes, exaltadores, inhibidores o sustancias que son fácilmente oxidadas y se determinan de forma indirecta por la disminución en la emisión CL, así como de especies marcadas con el catalizador, peróxido o especies que se pueden convertirse en peróxido, luminol, y también de especies marcadas con luminol. Un inconveniente de la reacción del luminol es que es eficaz únicamente en un estrecho rango de pH (aproximadamente 10–11).

Figura 4. Mecanismo de la oxidación del luminol con $K_3[Fe(CN)_6]$.



El isómero 6-amino del luminol (isoluminol), aunque presenta menor emisión CL que el luminol, ha sido extensamente empleado debido a que su grupo amino está menos oculto estéricamente, formando derivados CL más frecuentemente que el luminol [44].

Esta reacción del luminol se ha empleado con CE para detectar luminol y derivados, y para la detección de catalizadores, exaltadores e inhibidores de la emisión.

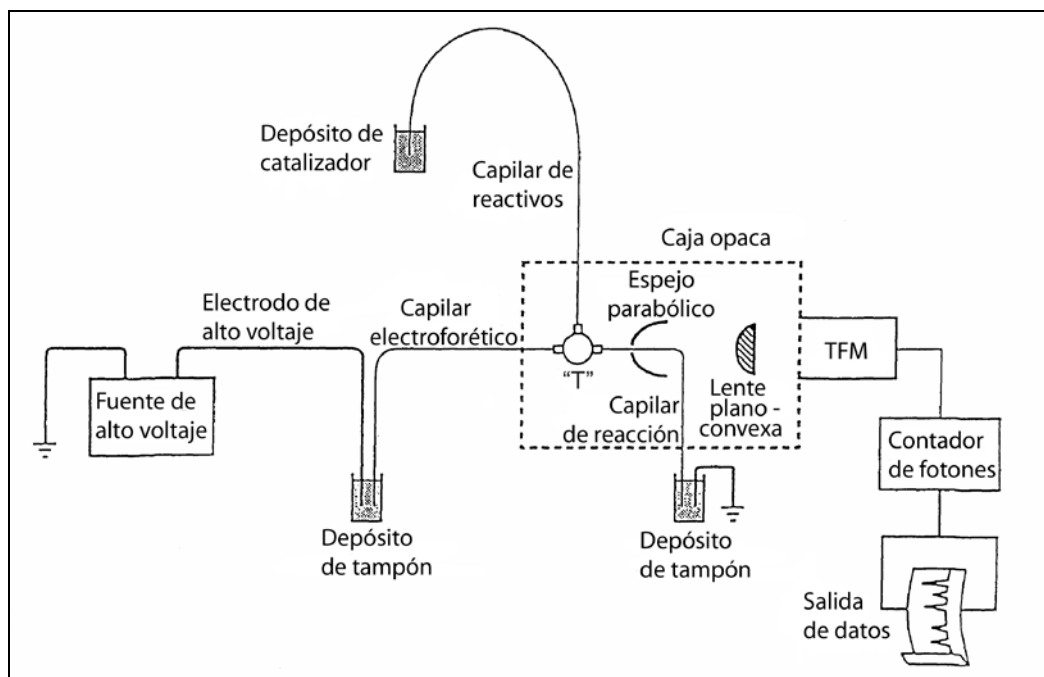
- Detección de luminol y derivados: En 1992 Dadoo y *col.* publicaron el primer estudio sobre la detección de luminol en CE [45]. El sistema empleado se muestra en la figura 5, y consta de un capilar de reactivos, un capilar electroforético y un capilar de reacción, unidos por un conector. La ventana de detección está situada en el punto focal de un espejo parabólico para colimar toda la luz emitida, que es enfocada después en un tubo fotomultiplicador (TFM) conectado a un sistema de conteo de fotones. Para disminuir la corriente de fondo del TFM éste se enfría mediante un refrigerador termoeléctrico. Con este sistema se separaron luminol y aminobutiletíl isoluminol (ABEI), obteniendo límites de detección de 100 y 400 amol para estos compuestos, respectivamente, y una mejora en la sensibilidad de 2-3 órdenes de magnitud respecto a las obtenidas con detección UV. Con objeto de desarrollar un sistema sencillo y sensible que permitiera disminuir el ensanchamiento de banda causado por turbulencias al final del capilar, y al mismo tiempo conseguir una alta eficacia en la separación, Zhao y *col.* [46] diseñaron un reactor post-columna para la detección CL de aminoácidos derivatizados con isotiocianato de isoluminol (ILITC). La separación se llevó a cabo en un capilar de cuarzo empleando una cubeta de flujo cubierta post-capilar como cámara de mezcla y un caudal adicional impulsado por una bomba de jeringa para retirar los analitos de la zona de detección, una vez que han sido eluidos del capilar.

[44] M. Yamaguchi, H. Yoshida y H. Nohta. , *J. Chromatog. A*, 950 (2002), 1-19.

[45] R. Dadoo, L.A. Colon y R.N. Zare, , *J. High Resol. Chromatogr.*, 15 (1992), 133-135.

[46] J.Y. Zhao, J. Labbe y N.J. Dovichi., *J. Microcol. Sep.*, 5 (1993), 331-339.

Figura 5. Esquema del sistema CE-CL empleado por Dadoo y col. [45].

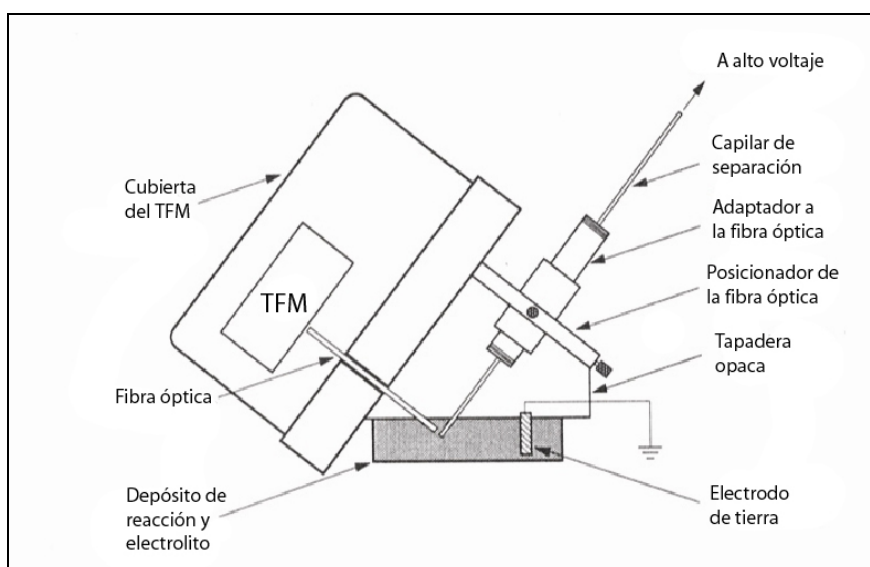


En este caso se requiere una mezcla eficaz de los analitos derivatizados con ILITC con el peróxido de hidrógeno y el catalizador microperoxidasa, ya que si los tres compuestos se introdujeran en canales separados, el peróxido se descompondría por el catalizador antes de llegar a reaccionar con el analito, y no se produciría emisión CL. A diferencia de los experimentos llevados a cabo por el grupo de Zare [45], que añaden el peróxido al tampón de separación y mezclan el catalizador en la cámara de detección, en esta modalidad se añade la peroxidasa directamente al tampón de separación, produciendo un contacto íntimo entre catalizador y analitos cuando se mezclan con el peróxido, y evitando el problema de la formación de burbujas en el capilar de separación, que podría producir perturbaciones en la separación. La sensibilidad del detector CL se encuentra influenciada por varios factores, rigurosamente controlados en el trabajo experimental, tales como las concentraciones de microperoxidasa y peróxido de hidrógeno y la distancia de mezcla (distancia entre el capilar de separación y la zona de detección del TFM). La separación de aminoácidos derivatizados se mejoró mediante la adición de bajas concentraciones de dodecil sulfato sódico (SDS) al tampón de separación, teniendo en cuenta que un aumento en la concentración del medio micelar podría desnaturalizar la microperoxidasa, destruyendo el catalizador e inhibiendo la reacción. La eliminación de turbulencias y el corto tiempo de residencia de los reactivos en la cámara de detección proporcionaron una alta eficiencia en la

separación, de 100.000 platos teóricos para los aminoácidos estudiados, obteniéndose buenas resoluciones en comparación con otros detectores CL previamente descritos [42,45]. Para el derivado de la valina se consiguió un límite de detección de 500 amol, aunque no fue posible separar los 20 aminoácidos derivatizados con ILITC.

Con objeto de facilitar la implantación de detectores CL en sistemas de CE, en 1994 Dadoo y *col.* centraron sus esfuerzos en el diseño de una interfase sencilla en la que la señal se generase a la salida del capilar [47]. Basándose en el sistema CE previamente descrito [45] y retirando una sección de 1-3 mm de la cubierta de poliimida del final del capilar, el detector CL se acopló al sistema de CE tal y como se muestra en la figura 6.

Figura. 6. Detector CL para CE a la salida del capilar, propuesto por Dadoo y *col.* [47]



El final del capilar de separación está inmerso en el recipiente que contiene el electrolito y el reactivo para la reacción CL. Cuando los analitos emergen del capilar, reaccionan con los reactivos CL en el recipiente produciendo luz visible que es transportada por una fibra óptica hacia un TFM. Un electrodo de platino inmerso en este recipiente completa el circuito electroforético. Este sistema fue empleado para la separación de luminol y ABEI y también para la separación de derivados de arginina y glicina con ABEI. En esta separación de luminol y ABEI, la eficiencia obtenida estuvo comprendida entre 10.000 y 20.000 platos teóricos, indicando una mejora con respecto a

[47] R. Dadoo, A.G. Seto, L.A. Colon y R.N. Zare. *Anal. Chem.*, 66 (1994), 303-306.

la obtenida con el diseño anterior, pero con un límite de detección más alto para el luminol. Los factores responsables de la disminución en la sensibilidad incluyen la insuficiente colección de la luz al emplear fibra óptica, en comparación con la obtenida al aplicar el reflector parabólico y también la ausencia de enfriamiento en el TFM. Otro problema adicional es la posible contaminación del recipiente de salida por parte de los analitos eluidos, aunque considerando los pequeños volúmenes de muestra empleados en CE, esta contaminación no sería importante y podría solventarse cambiando el tampón frecuentemente. Aunque este detector al final del capilar presenta ciertos inconvenientes como el ensanchamiento de banda como resultado de la mezcla de reactivos a la salida del capilar, la lenta cinética de la reacción CL y la amplia zona de detección que proporcionaría un número relativamente bajo de platos teóricos, la simplicidad y límites de detección obtenidos hacen a este montaje adecuado para trabajos de rutina. Posibles modificaciones para aumentar la sensibilidad implicarían el enfriamiento del TFM para disminuir la corriente de fondo y el empleo de fibras ópticas adicionales para incrementar la recolección de la luz.

ABEI se ha usado igualmente en la formación de derivados con aminos biogénicas para su detección CL en línea tras la separación mediante CZE y MEKC, obteniéndose mejores resoluciones con ésta última modalidad [48]. Se consiguieron límites de detección comprendidos entre $3.5 \cdot 10^{-8}$ y $1.2 \cdot 10^{-7}$ M para diaminopropano, putrescina, cadaverina y diaminohexano. Recientemente se ha explorado la reaccionabilidad que presenta el luminol con los carbohidratos, demostrándose que es posible conseguir la derivatización de azúcares a niveles inferiores a 2 pmol, de modo que realizando una reacción de derivatización pre-capilar es posible la separación y detección en línea de siete monosacáridos, usando como electrolito tampón borato con peróxido de hidrógeno a pH 10 y como reactivo CL post-capilar una disolución de hexacianoferrato en medio básico [49]. El límite de detección estimado para la glucosa mediante este método fue de 420 amol. En estas dos contribuciones se ha utilizado un acoplamiento CE-CL similar al presentado en la figura 8.

[48] Y.M. Liu y J.K. Cheng. *J. Chromatogr. A*, 1003 (2003), 211-216.

[49] X. Wang, Q. Wang, Y. Chen y H. Han, *J. Chromatogr. A*, 992 (2003), 181-191.

La CL electrogenerada (ECL) ha sido también empleada en CE utilizando la reacción del luminol con peróxido de hidrógeno [50]. En este caso la producción de luz se consigue mediante reacciones de oxidación o reducción que tienen lugar en un electrodo que actúa como catalizador en la reacción del luminol, ofreciendo la ventaja de generar luminiscencia en una posición definida de la superficie del electrodo. Esta modalidad proporciona una gran sensibilidad, pero implica un control exhaustivo de la localización del electrodo. Una vez que el luminol se ha separado empleando un sistema convencional, migra electroforéticamente hacia la celda de detección que contiene el peróxido de hidrógeno. Inmediatamente después de la salida del capilar se sitúa un microelectrodo, y cuando se aplica potencial, se genera luz en éste, debido a la oxidación electroquímica del luminol con peróxido de hidrógeno. El pequeño tamaño del electrodo empleado permite su alineación con el capilar de separación y un óptimo aislamiento de la CL generada en un área reducida. A continuación, dos fibras ópticas situadas a 180° colectan la luz generada, que es detectada en un TFM. De esta forma se evita el uso de un sistema post-capilar de adición de los reactivos CL. La respuesta de ECL del luminol está fuertemente influenciada por dos factores: la concentración de peróxido de hidrógeno en el recipiente del tampón, que es dependiente del tipo de electrodo empleado en el proceso de electroxidación, y también por el voltaje aplicado en el microelectrodo ya que éste regula la proporción en que se lleva a cabo la reacción, que a su vez está correlacionada con la intensidad de luz emitida. Los microelectrodos de carbono producen respuestas para el luminol más estables, pero con electrodos de platino se obtiene mayor sensibilidad, aunque no se ha encontrado una explicación para estas diferencias. La eficacia de esta metodología fue demostrada en el análisis de aminas derivatizadas con ABEI unido a N,N-disuccinimidilcarbonato (ABEI-DSC), obteniéndose límites de detección de 2.0 y 0.96 fmol para n-octilamina y n-propilamina, respectivamente. Asimismo, el ABEI-DSC ha sido empleado con éxito para marcar el tripéptido Val-Tyr-Val, determinado posteriormente mediante MEKC con detección por ECL. Las principales ventajas de esta detección son la alta sensibilidad que se consigue al reducir las interferencias de las impurezas de la disolución, debidas al catalizador adicionado en la reacción del luminol, y la eliminación de complicados reactores post-capilar necesarios en otros acoplamientos CE-CL.

[50] S.D. Gilman, C.E. Silverman y A.G. Ewing, *J. Microcol. Sep.*, 6 (1994), 97-106.

▪ Detección de catalizadores, exaltadores e inhibidores de la emisión: Otro modo de detección es la CL indirecta, basada en la detección de una sustancia que produce interferencia o supresión de una reacción CL dada, detectándose el analito de forma indirecta, como un pico negativo, donde la intensidad de CL disminuye a partir de una señal de fondo elevada. Liao y *col.* [51, 52] demostraron por primera vez la utilidad de este modo indirecto de detección para CE usando la reacción del luminol catalizada por Cu(II) para la determinación de cinco aminoácidos sin derivatización previa, siendo posible igualmente la detección de una amplia variedad de biomoléculas, capaces de complejarse fuerte y rápidamente con Cu(II), como aminas, catecol, catecolaminas y proteínas. Para llevar a cabo la detección, la interfase empleada se modificó con respecto a la propuesta por Dadoo y *col.* [45]. Este sistema de detección indirecta es más sencillo y sensible que la CL directa, con límites de detección para los aminoácidos ensayados entre 100 fmol y 400 fmol. También se ha aplicado a la separación y detección de cationes mediante el uso de Co(II) como ión sonda en el tampón electroforético [53]. El método proporciona una señal de fondo alta y estable debido a la reacción de oxidación del luminol con peróxido de hidrógeno catalizada con Co(II), señal que disminuye debido al desplazamiento del Co(II) en el tampón electroforético por un catión de la muestra, siendo esta disminución proporcional a la concentración de catión. Los límites de detección obtenidos estuvieron comprendidos en el rango entre $3.0\text{-}6.0 \cdot 10^{-9}$ M para Mn(II), Cd(II), Ni(II), Pb(II) y 14 lantánidos.

Otras aplicaciones se basan en el efecto catalizador de una variedad de iones metálicos como Cu (II), Co (II), Ni (II), Fe (II) y Mn (II) en la reacción del luminol con peróxido de hidrógeno, proporcionando un modo de detección directa rápido y eficaz para estos iones, empleando un detector CL en línea después de la separación mediante CE [54]. Esta contribución combina el análisis iónico capilar (CIA) y la detección CL mediante un reactor post-capilar similar al diseñado por Wu y Huie [55]. El capilar de reacción está situado justo enfrente del TFM sin emplear fibra óptica para transportar la luz, evitando pérdidas en torno al 10% e incrementando la sensibilidad en la detección gracias al uso de un volumen de inyección de muestra inferior a 20 nL. El modo de

[51] S.Y. Liao, Y.C. Chao y C.W. Whang., *J. High. Resol. Chromatogr.*, 18 (1995), 667-669.

[52] S.Y. Liao y C.W. Whang., *J. Chromatogr. A*, 736 (1996), 247-254.

[53] J. Ren y X. Huang., *Anal. Chem.*, 73 (2001), 2663-2668.

[54] B. Huang, J. Li, L. Zhang y J. Cheng., *Anal. Chem.*, 68 (1996), 2366-2369.

[55] N. Wu y C.W. Huie., *J. Chromatogr.*, 634 (1993), 309-315.

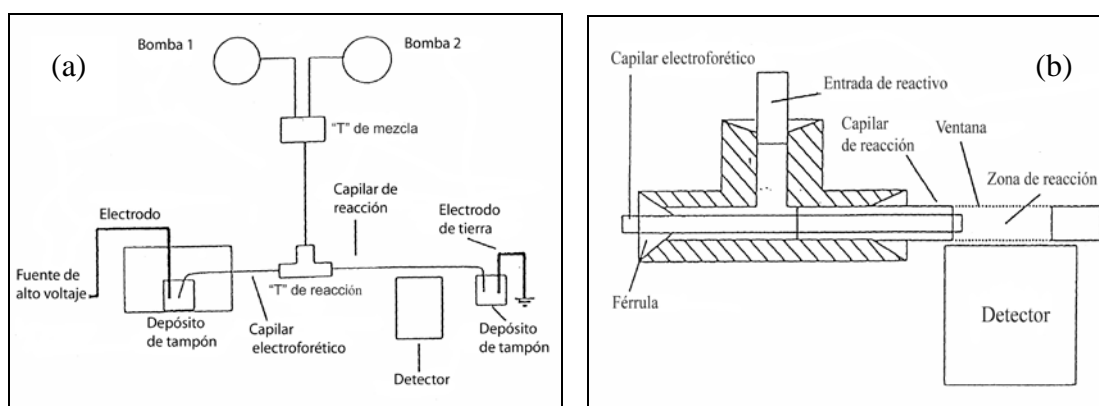
mezcla más efectiva para mejorar la sensibilidad de esta determinación es el empleo de luminol como uno de los componentes electroforéticos, introduciendo sólo peróxido de hidrógeno en modo post-capilar. Así, el luminol, peróxido de hidrógeno y el ión metálico confluyen en la ventana del detector y la rápida cinética de la reacción produce una señal CL detectada en ese instante. Es obvio que el pH debe seleccionarse convenientemente, ya que el EOF y la especiación del ión metálico están fuertemente influenciados por este parámetro. En este proceso de separación, la movilidad neta de los iones será la suma del EOF y de la movilidad electroforética, siendo este último componente muy similar para los metales de transición y lantánidos, lo que no permite una buena separación. Para solucionar este problema y lograr una mejor resolución, es necesario alterar de forma selectiva las movilidades por medio de un proceso de complejación con un agente quelante débil como el ácido 8-hidroxiquinolina-5-sulfónico (HQS) o el ácido α -hidroxiisobutírico (HIBA). Las movilidades electroforéticas netas serán medias ponderadas de la movilidad de cada ión libre y sus complejos y lógicamente dependerán del grado de formación del complejo obtenido. Los límites de detección para Co(II), Cu(II), Ni(II), Fe(III) y Mn(II) fueron de 20 zmol, 2 amol, 80 amol, 740 amol y 100 amol, respectivamente, obteniendo una sensibilidad considerablemente mejor que la de técnicas más comunes de detección en CIA como absorción UV y detección electroquímica.

Zhang y Cheng han propuesto la determinación de iones de tierras raras mediante el acoplamiento CE-CL, empleando un método en el que bajo condiciones estáticas estos iones pueden formar complejos con el luminol e inhibir la reacción CL, pero por otro lado pueden catalizar la reacción CL por la transformación del radical libre del luminol a aminofalato y aumentar así la emisión CL, mostrando un carácter dual [56]. En este caso se ha empleado un reactor coaxial similar al mostrado en la figura 7, en el que el capilar de separación se llena de tampón electroforético, y los reactivos CL (H_2O_2 y luminol) y Co(II) son introducidos por gravedad en la confluencia y llevados hacia la ventana de detección mediante un caudal continuo, de forma que siempre existe reactivo fresco. La muestra se introduce por inyección electrocinética existiendo una emisión CL de fondo constante debida a la presencia de una concentración estable de radical libre de luminol. Cuando un ión migra a la ventana de

[56] Y. Zhang y J. Cheng., *J. Chromatogr. A*, 813 (1998), 361-368.

detección desde el capilar de separación, reacciona con el radical libre de luminol y genera un segundo aumento de la señal CL. Cuanto mayor sea la CL de fondo, mayor será la concentración de radical libre de luminol presente y la señal CL inducida por el ión será por tanto más intensa. Con este método se han conseguido separar y detectar con éxito La^{3+} , Ce^{4+} , Pr^{3+} y Nd^{3+} con límites de detección de 33, 27, 42 y 50 fmol, respectivamente.

Figura 7. Sistema CE-CL propuesto por Ruberto y Grayeski [57]. (a) Configuración experimental. El peróxido de hidrógeno se introduce por la bomba 1 y la bomba 2 proporciona la base. (b) Esquema de la interfase empleada para la detección CL.



El grupo de Cheng fue el primero en emplear detección indirecta en línea para el análisis de catecolaminas y catecol, basándose en la disminución de la emisión CL del luminol debido a la complejación de los analitos con Co(II) [58], empleando el sistema CE-CL descrito anteriormente [54]. Los autores proponen un nuevo modo de mezcla de los analitos con el reactivo CL, en el que el luminol se emplea como componente del tampón electroforético, y el H_2O_2 y Co(II) se introducen de forma post-capilar. De esta forma, luminol, H_2O_2 y Co(II) confluyen simultáneamente justo en la ventana de detección evitando la formación de burbujas producidas por el H_2O_2 en presencia de una base, lo que evita inestabilidades en la corriente eléctrica y en la señal CL de fondo, incrementos del ruido y disminución de la eficacia de la separación. En la separación de catecol, epinefrina, norepinefrina y dopamina, se empleó SDS, con límites de detección de 87, 51, 22 y 38 fmol, respectivamente. Asimismo se detectaron seis aminoácidos (Arg, Hyp, Lys, His, Glu y Asp), obteniéndose límites de detección mejorados respecto

[57] M.A. Ruberto y M.L. Grayeski., *Anal. Chem.*, 64 (1992), 2758-2762.

[58] Y. Zhang, B. Huang y J. Cheng, *Anal. Chim. Acta*, 363 (1998), 157-163.

al trabajo de Liao y Wang [52]. Usando un sistema CE-CL similar al descrito por estos autores [52] se ha conseguido aplicar satisfactoriamente la CL indirecta al análisis de muestras reales, determinando monoaminas y catecol en muestras biológicas y compuestos farmacéuticos mediante la inhibición del sistema luminol-H₂O₂-Cu(II) [59] y ácido clorogénico y rutin en cigarrillos mediante la inhibición del sistema luminol-hexacianoferrato potásico [60]. También usando un detector coaxial se han separado y detectado indirectamente aminoácidos sin previa derivatización, mediante el efecto inhibitorio de éstos sobre la emisión del luminol en su reacción con BrO⁻, alcanzándose límites de detección de 7 a 144 fmol [61]. Usando el sistema propuesto por Dadoo y *col.* [45] se ha demostrado la eficacia del empleo de ferricianuro potásico como catalizador para determinar luminol y sus derivados [62].

Cheng y *col.* han continuado mejorando la detección CL en CE, proponiendo el uso de un conector de metacrilato de 4 vías en el que se ubica el electrodo de tierra, en vez de situarlo en el vial del tampón, colocando el capilar de reacción en una de las salidas del conector, con una ligera pendiente con objeto de que la disolución fluya más fácilmente hacia fuera del capilar, tal como se muestra en la figura 8 [63]. De este modo se consiguen una corriente y una línea de base más estables ya que las burbujas generadas por la descomposición del peróxido de hidrógeno no perturbarían el electroferograma al colocar el electrodo antes del capilar de reacción, mejorándose la sensibilidad. Con este sistema se han detectado metaloporfirinas con límites de detección entre 361 amol y 964 fmol. Este sistema ha sido usado para la detección ultrasensible de Co(II) [64], Nb(V) y Ta(V) [65], V(IV) [66] y Cu(II) [67].

[59] H.C. Tsai y C.W. Whang., *Electrophoresis*, 20 (1999) 2533-2538.

[60] H.L. Jiang, Y.Z. He, H.Z. Zhao y Y.Y. Hu., *Anal. Chim. Acta*, 512 (2004), 111-119.

[61] W. Yang, Z. Zhang y W. Deng., *Talanta*, 59 (2003), 951-958.

[62] K. Tsukagoshi, Y. Ouji, y R Nakajima., *Anal. Sci.* 17, (2001), 1003-1005.

[63] Y. Zhang, Z. Gong, H. Zhang y J. Cheng., *Anal. Commun.*, 35 (1998), 293-296.

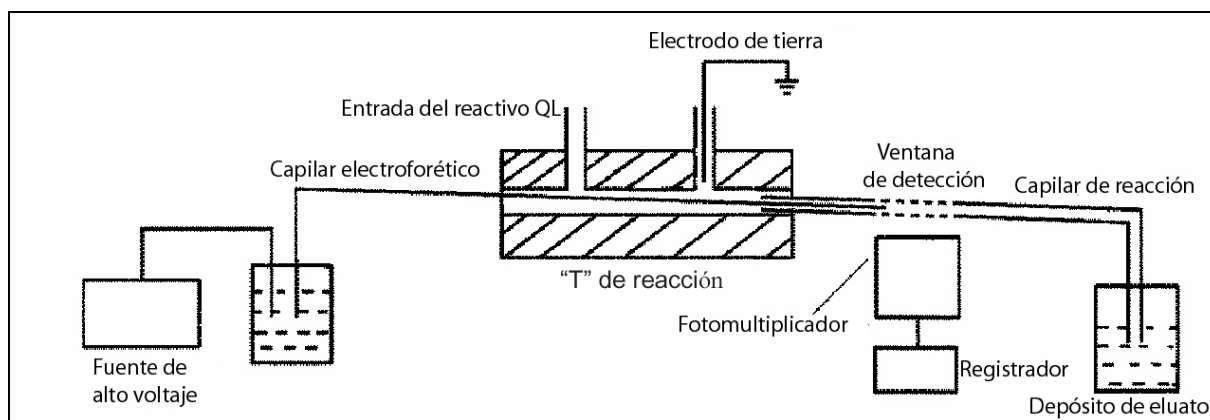
[64] Y.M. Liu, E.B. Liu y J.K. Cheng., *J. Chromatog. A*, 939 (2001), 91-97.

[65] E.B. Liu, Y.M. Liu y J.K. Cheng., *Anal. Chim. Acta*, 443 (2001), 101-105.

[66] E.B. Liu, Y.M. Liu y J.K. Cheng., *Anal. Chim. Acta*, 456 (2002), 177-181.

[67] Y.M. Liu y J.K. Cheng., *Electrophoresis*, 23 (2002), 556-558.

Figura 8. Esquema del detector CL post-columna para CE propuesto por Cheng y col. [63].



Con un sistema similar al descrito por Ruberto y Grayeski [57] se han determinado simultáneamente Cr(III) (como Cr^{3+}) y Cr(IV) (como CrO_4^{2-}) mediante un proceso basado en una reducción del Cr(IV) a Cr(III) dentro del capilar mediante hidrógeno sulfito sódico ácido [68]. Pevio al proceso electroforético se inyecta la muestra (conteniendo Cr^{3+} y CrO_4^{2-}), el tampón y el hidrógeno sulfito sódico ácido, aplicando posteriormente el correspondiente voltaje. Como ambas especies tienen cargas opuestas, cada una de ellas migra hacia electrodos opuestos, el Cr^{3+} hacia el cátodo mientras que los iones CrO_4^{2-} se mueven hacia el ánodo, reaccionan con el hidrógeno sulfito sódico ácido y se reducen a Cr^{3+} . Debido a los distintos tiempos de migración de las especies Cr^{3+} , se produce la separación de Cr(III) y Cr(IV) y posterior detección mediante el efecto catalítico del Cr^{3+} en la oxidación de luminol, obteniéndose límites de detección de 12 y 380 zmol, respectivamente. Los mismos autores han usado una estrategia similar para determinar ambas especies en muestras de agua, pero usando peróxido de hidrógeno en medio ácido para la reducción del Cr(IV) a Cr(III) [69].

El grupo de Tsukagoshi desarrolló un nuevo equipo de CE con detección CL en línea empleando el sistema del luminol- H_2O_2 para el análisis de hemoproteínas [70]. Así, se observó que Fe(III), sulfato, hematina como complejo de Fe(III)-porfirina, y

[68] W.P. Yang, Z.J. Zhang y W. Deng., *J. Chromatog. A*, 1014 (2003), 203-214.

[69] W.P. Yang, Z.J. Zhang y W. Deng., *Anal. Chim. Acta*, 485 (2003), 169-177.

[70] K. Tsukagoshi, S. Fujimura y R. Nakajima., *Anal. Sci.*, 13 (1997), 279-281.

varias hemoproteínas podían ser separados y detectados por este sistema. Para ello emplearon el mismo sistema de confluencia de tres vías para la mezcla de los reactivos CL y el eluato del capilar de separación, y la misma celda para detectar bajas señales CL [71]. No obstante, el tratamiento de la disolución CL (luminol + H₂O₂) se consideró drástico en este caso, debido a cambios en la intensidad CL de la disolución, que rápidamente disminuía hasta 10 veces en 1 hora, siendo constante al cabo de 12 horas. Por esta razón, en este estudio se usó una disolución CL preparada el día anterior, ya que disoluciones frescas originaban señales de fondo con ruido elevado e irreproducibilidad en las medidas. Para todas las proteínas analizadas se obtuvieron picos simétricos y estrechos, a pesar de la mezcla turbulenta de los analitos con la disolución de reactivo CL al final del capilar de separación. Estos buenos resultados se deben a varias razones: en primer lugar, ya que todas las proteínas migraban a un pH de 10, que es mayor o igual al valor del punto isoeléctrico de las mismas, la interacción entre éstas y la carga negativa de los grupos silanoles de las paredes del capilar fue despreciable, y en segundo lugar, a que la concentración de proteínas en la muestra empleada en CE-CL fue muy inferior a la empleada comúnmente para detección espectrofotométrica o fluorimétrica. Así, el método CE-CL resultó unas 10⁴ veces más sensible que el método convencional de CE-UV-Vis para la detección de hemoglobina.

3.12. Extracción en fase sólida.

La extracción en fase sólida es un sistema ampliamente utilizado para la preparación de muestra antes de su análisis por HPLC, GC, CE, etc. Sus principales objetivos son limpieza y eliminación de interferentes ("clean-up"), concentración del analito y cambio de disolvente (por ejemplo, de acuoso a orgánico).

Se basa en el mismo principio de retención selectiva que la cromatografía líquida. La extracción se lleva a cabo en unas columnas de extracción a modo de jeringa que contienen una fase estacionaria. Hay una gran variedad de columnas que se diferencian en el tipo, la capacidad y la cantidad de fase que contienen.

La extracción ofrece muchos beneficios y ventajas sobre las técnicas tradicionales de preparación de muestra. Entre otros los beneficios son:

[71] T. Hara, S. Kayama, H. Nishida y R. Nakajima., *Anal. Sci.*, 10 (1994), 223-225.

- a. Altas recuperaciones de los analitos.
- b. Posibilidad de concentración de los analitos.
- c. Capacidad de extraer analitos de amplio rango de polaridad simultáneamente.
- d. Fácil automatización.
- e. Compatibilidad con instrumentos de análisis.
- f. Reducción del consumo de disolventes orgánicos.

Los objetivos de la extracción en fase sólida se consiguen en sólo cuatro etapas:

1. Acondicionamiento: debe prepararse la fase antes de aplicar la muestra para obtener una interacción reproducible. Esto se consigue solvatando la fase. Se pasa un volumen de disolvente adecuado a través de la fase, seguido de un volumen de líquido similar a la matriz de la muestra. Un ejemplo común es el acondicionamiento con metanol seguido de agua a través de un cartucho C18, previo a la aplicación de una muestra acuosa.

2. Retención: una vez aplicada la muestra, el analito y quizás, otros componentes de la matriz quedan retenidos en la fase debido a una o varias interacciones químicas (por ejemplo, de Van der Waals, o no-polares entre la cadena alifática del analito y la cadena alifática de una fase C18). Otros componentes de la matriz pueden pasar a través de la fase sin ser retenidos.

3. Lavado: esta fase debe conseguir que se eluyan los componentes de la matriz no deseados que hayan quedado retenidos en la fase en la etapa de retención. Un disolvente de lavado común para una extracción no polar en una fase C18 es el agua.

4. Elución: debe elegirse un disolvente de elución capaz de romper sólo la interacción entre el analito y la fase, obteniendo así una elución selectiva del analito. Volviendo al ejemplo de extracción no polar, un disolvente orgánico como el metanol debería ser suficientemente fuerte para eliminar la interacción entre la mayoría de analitos no polares y la fase C18.

3.13. Aplicación de la quimiometría a la optimización del método analítico: uso del diseño de experimentos.

A día de hoy la Química, y especialmente la Química Analítica, está marcada por la importancia de la calidad de los resultados generados y del cálculo de su incertidumbre. En esta situación el empleo de metodologías estadísticas es casi inevitable. De hecho, la utilización de técnicas de diseño de experimentos multivariantes está aumentando ampliamente en la Química Analítica y en otras ciencias. Los diseños multivariantes permiten el estudio simultáneo de distintas variables de control que influyen en un proceso analítico de una manera más rápida y efectiva que las más tradicionales metodologías univariantes [72]. Esto es así porque el número de experiencias que se requieren para hallar las condiciones óptimas de medida es menor y porque son capaces de considerar los efectos de los distintos factores en la respuesta incluso si hay interacción entre dichos factores. Existen varios modelos de diseños de experimentos que reducen el número de experimentos y que pueden ser empleados en diferentes casos. Si lo que se pretende es detectar factores influyentes en la respuesta analítica se emplean diseños experimentales de modelos de primer orden (diseños factoriales o diseños Plackett-Burman). Por otro lado, si lo que se pretende es aproximar una función de respuesta u optimizar un proceso, los diseños experimentales que deberíamos emplear son los correspondientes a modelos de segundo orden.

El diseño más popular de primer orden es el factorial completo (o fraccionado) a dos niveles, en él cada factor es estudiado a dos niveles. Debido a su simplicidad y relativamente bajo coste (pocas experiencias), los diseños factoriales completos son muy útiles en estudios preliminares o en los pasos iniciales de una optimización. Son casi obligados cuando el problema en cuestión implica un número bastante elevado de factores [73]. Sin embargo, ya que solamente se pueden emplear dos niveles, los modelos que pueden ser ajustados a estos diseños están algo restringidos. Si se requiere un modelo más sofisticado, como por ejemplo para localizar el máximo de un conjunto de condiciones experimentales, entonces se deben emplear diseños para modelos de segundo orden (diseños de superficie de respuesta), los cuales emplean más de dos factores para ajustar un modelo polinomial cuadrático completo. En Química Analítica,

[72] D.C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, Wiley, New York, 1997.

[73] G.E.P. Box, W.G. Hunter y J.S. Hunter, *Statistics for Experimenters*, Wiley, New York, 1978.

los diseños de superficie de respuesta más empleados son simétricos y describen un dominio experimental esférico.

Un diseño central compuesto (DCC) [74] combina un diseño completo o fraccionado a dos niveles con puntos adicionales (puntos estrella) y al menos uno de estos puntos está en el centro de la región experimental de manera que se obtengan propiedades tales como rotabilidad u ortogonalidad para ajustar modelos polinomiales cuadráticos. Para ajustar modelos de respuesta cuadráticos, los DCC son una alternativa mejor que los diseños factoriales completos a tres niveles porque su eficacia es comparable con un menor número de experiencias. Esto ha favorecido que se hayan convertido en el diseño de experimentos más aceptado para modelos de segundo orden. El número total de experiencias viene determinado por la fórmula: $N = 2^k + 2k + C_0$, donde k es el número de variables y C_0 es el número de puntos centrales. En Química Analítica este tipo de diseños ha sido ampliamente utilizado.

Los diseños Box-Behnken (DBB) [75] son diseños rotatables de segundo orden basados en diseños factoriales incompletos. La ordenación especial de los niveles en un DBB permite incrementar el número de puntos del diseño a la par que el número de coeficientes polinomiales. Para tres factores, por ejemplo, el diseño puede ser construido en tres bloques de cuatro experimentos que consisten en un diseño factorial completo a dos niveles con el nivel del tercer factor fijado a cero. El número de puntos experimentales (N) se define por la expresión $N = 2k(k-1) + C_0$, donde k es el número de variables y C_0 es el número de puntos centrales.

Una alternativa muy útil para el diseño de experimentos para modelos de segundo orden es el diseño de estructura uniforme propuesto por Doehlert en 1970 [76]. Este tipo de diseños son fáciles de aplicar y ofrece ventajas frente a los diseños Box-Behnken ya que necesitan menos experiencias con lo que son más eficaces y además se pueden mover a través del dominio experimental. A pesar de estas atractivas características pasaron varios años hasta que los investigadores los empezaran a utilizar. En Química Analítica, la primera aplicación de un matriz Doehlert se empleó para

[74] G.E.P. Box, K.B. Wilson, *J.R. Statist. Soc.*, B 13 (1951) 1.

[75] G.E.P. Box, D.W. Behnken, *Technometrics*, 2 (1960) 195.

[76] D.H. Doehlert, *Appl. Statist.*, 19 (1970) 231.

optimizar una separación mediante HPLC [77]. Desde entonces se ha incrementado el número de artículos publicados empleando esta metodología tanto para determinaciones espectrofotométricas, cromatográficas o electroanalíticas [78].

El diseño Doehlert describe dominios experimentales esféricos haciendo énfasis en la uniformidad del espacio ocupado. Aunque esta matriz no es ni ortogonal ni rotatable esto no supone una desventaja a la hora de una utilización efectiva. Para dos variables, el diseño Doehlert consiste en un punto central y otros seis puntos que forman un hexágono regular y están, por tanto, formando un círculo. En tres dimensiones se puede visionar de diferentes maneras dependiendo de la estructura geométrica seleccionada [79]. En los diseños Doehlert el número de niveles no es el mismo para todas las variables, por ejemplo, una variable es estudiada a cinco niveles y otra es estudiada a tres. Esta propiedad permite una libre elección de que factores quieren ser estudiados en mayor o menor detalle. Aunque se pueden emplear diferentes criterios para asignar el número de niveles a cada factor, una regla general es seleccionar la variable con mayor efecto como el factor con más niveles para así obtener más información del sistema.

Cada diseño se define considerando el número de variables y valores codificados (C_i) de la matriz experimental. La relación entre los valores reales y los codificados

viene dada por: $C_i = \left\{ \frac{X_i - X_i^0}{\Delta X_i} \right\} \alpha$, donde C_i es el valor codificado para el nivel del

factor i , X_i es su valor real en un experimento, X_i^0 es el valor real en el centro del dominio experimental, ΔX_i es la amplitud de la variación del valor real y α es el límite del valor codificado para cada factor. El número de experimentos requeridos (N) viene dado por: $N = k^2 + k + C_0$, donde k es el número de variables y C_0 es el número de puntos centrales. La réplicas del punto central se hacen para validar el modelo por medio de una estimación de la varianza experimental.

[77] Y. Hu, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A*, 485 (1989) 311.

[78] S.L.C. Ferreira, W.N.L. dos Santos, C.M. Quintella, B.B. Neto y J.M. Bosque-Sendra, *Talanta*, 63 (2004) 1061-1067.

[79] A.M. García-Campaña, L. Cuadros Rodríguez, A. Lupiañez González, F. Alés Barrero, M. Román Ceba, *Anal. Chim. Acta*, 348 (1997) 237.

La comparación entre los diseños de segundo orden citados han demostrado que las matrices Doehlert son más eficaces que los DBB y que los DCC, considerando que la eficacia de un diseño experimental está definida por el número de coeficientes del modelo estimado dividido por el número de experimentos. Los diseños Doehlert son también más eficaces describiendo el espacio ya que los hexágonos pueden llenar el espacio sin solapamiento. Otra ventaja es su potencial para la secuenciación [80], donde los experimentos pueden ser reutilizados cuando los límites del dominio experimental no fue correctamente elegido en un principio.

En definitiva, las matrices Doehlert son un buen diseño para la metodología de superficie de respuesta porque permite: a) la estimación de los parámetros de un modelo cuadrático, b) la construcción de diseños secuenciales, c) la detección de la falta de ajuste del modelo y d) la utilización de bloques.

3.14. Validación de un método analítico. Parámetros de calidad.

Los métodos de análisis utilizados en el control de calidad de productos farmacéuticos, que no se traten de métodos oficiales de análisis (registrados o contemplados en farmacopea), deben haber sido validados previamente a su utilización en rutina. La validación de un método de ensayo tiene como finalidad demostrar la idoneidad de dicho método para llevar a cabo un análisis determinado. Mediante la validación del método se establece si los parámetros de calidad satisfacen los requisitos de una aplicación analítica concreta. Para ello, se requiere experimentación y comparación con los valores de referencia bien conocidos. Los objetivos de una validación analítica son:

- Garantizar la coherencia entre los resultados obtenidos y las necesidades.
- Asegurar la calidad y constancia de la calidad de la información obtenida.
- Caracterizar métodos y herramientas analíticas.
- Facilitar las auditorías de calidad.
- Fundamentar la transferencia (de métodos y herramientas) y la armonización de los resultados entre los laboratorios, con el objetivo de conseguir el reconocimiento mutuo entre laboratorios.

[80] J.M. Bosque-Sendra, M. Nechar, L. Cuadros Rodríguez, M.F. Molina, *Anal. Proc.* 32 (1995) 375.

Uno de los requisitos básicos para llegar al cumplimiento de estos objetivos es que el laboratorio donde se realicen los ensayos trabaje bajo Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP), que garantiza la seguridad de los resultados obtenidos. Estas normas enfatizan la importancia de una buena organización, personal cualificado, instalaciones apropiadas y aparatos adecuados en buen estado y cualificados, métodos escritos, actualizados y disponibles, y un registro adecuado de los resultados y una posterior supervisión y verificación de los mismos.

Según la metódica de análisis que se realice, las validaciones pueden ser:

- Prospectivas: para metódicas nuevas.
- Restrospectivas: para metódicas muy utilizadas que no han sido validadas, y de las cuales se posee suficiente información para que sean validadas.
- Revalidaciones: para metódicas validadas en las que se han introducido cambios. El grado de revalidación dependerá de la naturaleza e importancia de los cambios.

Existen numerosos textos oficiales que sirven de guía para la validación de métodos analíticos [81,82]. Aunque con pequeñas diferencias de nomenclatura, todos ellos se basan en el estudio de los mismos parámetros de calidad. Una guía muy empleada para la validación de métodos de análisis farmacéuticos es la propuesta por la *Internacional Conference on Harmonisation (ICH)* [83]. Esta guía fue redactada para la validación de métodos cromatográficos ya que eran los métodos más utilizados en control de calidad, pero puede ser fácilmente adaptada a los métodos electroforéticos.

Para que un método de análisis pueda ser validado, es necesaria la determinación y evaluación de un serie de parámetros que definen la calidad del método de ensayo. Dependiendo de la naturaleza y la finalidad del método analítico los parámetros a evaluar son distintos. En un método cuantitativo los parámetros de calidad que normalmente se suelen evaluar son: selectividad, repetibilidad, precisión intermedia, exactitud, linealidad, rango dinámico lineal, límite de detección y límite de cuantificación.

[81] *A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, Eurachem Guide, Teddington, UK, 1998.

[82] *Analytical Procedures and Methods Validation*, Draft Guidance, CDER/CBER, FDA, Rockville, MD, USA, 2000.

[83] *ICH Q2B: Validation of Analytical procedures: Methodology*, Consensus Guideline, Internacional Conference on Harmonisation (ICH), 1998.

1. Selectividad: también se denomina especificidad por algunas guías de validación, es la capacidad del método para asegurar que se está evaluando el analito de interés en presencia de una matriz con otros componentes. Dependiendo del objetivo del método, los procedimientos necesarios para evaluar la selectividad son diferentes. En el caso de métodos cuantitativos, evaluar la selectividad implica demostrar que se discrimina entre el analito a determinar de impurezas o excipientes. Cuando se emplean técnicas separativas como la CE, la correcta separación (resolución mayor de 1'5) entre los componentes de la muestra se utiliza para demostrar la selectividad.

2. Linealidad: demostrar la linealidad de un método implica obtener, en todo el intervalo de concentraciones estudiado, una respuesta proporcional entre la concentración de analito y la magnitud física medida, descrita correctamente por la ecuación de calibración. En el caso de calibraciones univariantes, la evaluación de la linealidad consiste en obtener una relación lineal entre la concentración y el parámetro medido (emisión quimioluminiscente, en nuestro caso). En este memoria fue evaluada como: $\text{Linealidad} = 1 - \text{desviación estándar relativa de la pendiente}$ [84].

3. Rango dinámico lineal: es el intervalo entre los niveles extremos de concentraciones que puede ser determinado de forma precisa, exacta y lineal. Este parámetro se deriva generalmente de los estudios de linealidad, exactitud y precisión. Dependiendo del tipo de análisis que se realice, el intervalo de concentraciones mínimo a cubrir varía. La ICH recomienda cubrir intervalos de 80-120 % para análisis cuantitativo.

4. Exactitud: la exactitud de un método analítico expresa la proximidad entre los valores obtenidos por dicho método con los valores reales (obtenidos mediante pesada de un estándar) o bien con los valores obtenidos por un método de referencia adecuado. En la norma ISO 5725 [85] a este concepto de exactitud se le denomina veracidad, siendo entendida la exactitud como un concepto superior, dependiente de la veracidad y la precisión. Esto se deriva del hecho que puede interpretarse que la obtención de valores exactos consiste en que éstos deben ser próximos al valor real pero además de

[84] L. Cuadros Rodríguez, A.M. García-Campaña y J.M. Bosque Sendra, *Anal. Lett.*, 29 (1996) 1231.

[85] ISO 5725, *Accuracy (Trueness and Precision) of Measurements Methods and Results*, Part 1-6, International Standardization Organization, Geneva, 1993.

forma precisa. La ICH recomienda realizar un mínimo de 9 determinaciones, cubriendo tres niveles de concentración (3 niveles · 3 réplicas). Para preparados farmacéuticos puede evaluarse la exactitud realizando un mínimo de 6 determinaciones distintas. Lo habitual es realizar un test de estadístico para comparar los valores obtenidos con un valor de referencia, o bien hacer estudios de recuperaciones.

5. Precisión: es una medida del error aleatorio asociado al método analítico. Expresa la proximidad de una serie de resultados obtenidos a partir de distintas tomas de muestra de un producto perfectamente homogéneo. Los resultados pueden expresarse en términos de desviación estándar absoluta o bien relativa (coeficiente de variación (%CV)). El nivel de exigencia de los resultados dependerá del tipo de muestra y del método utilizado. Según la ICH, existen tres niveles distintos en la evaluación de la precisión:

- Repetibilidad: expresa la precisión de un método bajo las mismas condiciones de operación y en un intervalo corto. La manera habitual de proceder es realizar 9 determinaciones a 3 niveles de concentración o bien un mínimo de 6 determinaciones al 100 % de la concentración nominal. Los métodos habituales de análisis implican pretratamiento de la muestra, por lo que la repetibilidad debe realizarse incorporando esta etapa.

- Precisión intermedia: expresa el grado de reproducibilidad de una serie de resultados variando las condiciones operacionales normales. Factores típicos que se estudian son: diferentes analistas, días, lotes de reactivos, temperatura, etc. No es necesario el estudio de cada uno de los factores por separado. Por lo general, la precisión intermedia se expresa mediante un CV global, de resultados obtenidos variando estos factores. Es recomendable realizar un diseño experimental para evaluar la influencia de los factores sobre los resultados.

- Reproducibilidad: generalmente un estudio de reproducibilidad implica estudios de colaboración interlaboratorios. Es un estudio de precisión intermedia, ampliando como factor adicional distintos laboratorios. Este parámetro es de obligada consideración para la estandarización del método de análisis y para que adopte carácter de método oficial de farmacopeas.

6. Límite de detección: se define como la cantidad más pequeña de analito que puede ser detectada en una muestra, aunque no sea posible determinarla exactamente a ese nivel de concentración. La determinación de este valor depende de la naturaleza del método de análisis. La metodología empleada en esta memoria consiste en evaluarlo como tres veces la relación señal / ruido. Esta es quizás la evaluación más sencilla que se puede hacer y además es muy habitual en la bibliografía referente a CE con detección CL, con lo que se hace necesario emplearla a la hora de comparar sensibilidad entre métodos.

7. Límite de cuantificación: es el nivel mínimo que puede ser determinado de forma exacta y precisa bajo las condiciones operacionales normales. Es un compromiso entre la concentración de analito y la precisión y exactitud deseadas. Para su cálculo se ha empleado como criterio diez veces la relación señal / ruido.

8. Robustez: es la evaluación de la susceptibilidad del método de análisis a variaciones de las condiciones analíticas, como variaciones en reactivos (concentraciones, pHs, etc.) y variaciones instrumentales (temperatura, voltaje, etc.). En el caso de determinar que hay parámetros que afectan al método de análisis, éstos deberán ser controlados y los procedimientos del método deberán incluir recomendaciones de cómo mantenerlos bajo control.

PARTE EXPERIMENTAL

4. REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MATERIAL.

4.1. Reactivos

A continuación se relatan los reactivos empleados en la presente memoria.

Patrones:

- Promazina (PMH), suministrada por Federa (Bélgica).
- Prometazina (PTH) y metilsulfato de thiazinamium (TMS) fueron suministrados por Alfa Pharma (Bélgica).

Fármacos analizados:

- Ampollas de metilsulfato de thiazinamium, suministradas por el laboratorio del Hospital Universitario de Gante (Gante, Bélgica). Composición: metilsulfato de thiazinamium (65 mg), Na-EDTA (1 mg), vitamina C (2 mg), NaCl (14 mg), agua (2 mL).
- Jarabe Actitiol Antihistamínico, es producido por Almirall Prodesfarma. Composición: clorhidrato de prometazina (50 mg), carbocisteína, sacarosa, etanol, metilparabén, propilparabén, propilenglicol, hidróxido sódico, esencia de piña, esencia de melocotón y agua.
- Grageas Frinova, son producidas por Rhône-Poulenc. Composición: clorhidrato de prometazina (25 mg), almidón de trigo, lactosa, talco, sacarosa, levilite y estearato de magnesio.

Reactivos para la reacción quimioluminiscente:

- 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona (luminol) suministrado por Sigma-Aldrich.
- Ferricianuro potásico ($K_3[Fe(CN)_6]$) suministrado por Probus.
- Hidróxido sódico (NaOH) suministrado por Panreac.

Reactivos para la separación electroforética:

- Tetraborato sódico ($B_4Na_2O_7 \cdot 10H_2O$) suministrado por Sigma.

Otros reactivos

- Agua ultrapura (Milli-Q plus Ibérica)
- Ácido clorhídrico (HCl) suministrado por Scharlaub.

Disolventes orgánicos

- Metanol y acetonitrilo suministrados por Panreac, de grado HPLC.

Cartuchos usados en la extracción:

- HLB, 60 mg, 3 ml suministrados por Oasis® (Waters).

4.2. Disoluciones

- Disolución de tampón tetraborato sódico (Borax) pH = 8'5.

La disolución de tampón tetraborato que se preparó fue de 20 mM y un volumen de 100 mL.

$$[\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}] = 0.020 \text{ M}; P_m = 381.4 \text{ g/mol}$$

$$0.020 \text{ M} \cdot 0.100 \text{ L} \cdot 381.4 \text{ g/mol} = 0.763 \text{ gramos de borax}$$

Este tampón se ajustaba a pH 8'5 con HCl 5 M después de añadir el luminol.

- Disolución madre de luminol.

La concentración de luminol que se preparó fue 25 mM en NaOH 0'1 N y un volumen de 50 mL.

$$[\text{Luminol}] = 25 \text{ mM}; P_m: 177 \text{ g/mol.}$$

$$25 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 0.050 \text{ L} \cdot 177.16 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0.221 \text{ gramos de luminol}$$

Esta disolución se dejaba envejecer un día antes de ser utilizada. Se almacenaba a 4 °C aproximadamente en un frasco topacio.

- Disolución de trabajo de luminol.

Para preparar esta disolución se partió de la disolución madre de luminol 25 mM.

La concentración del luminol de trabajo es de 1'25 mM; se preparó un volumen de 100 mL.

$$[\text{Luminol de trabajo}] = 1'25 \text{ mM}$$

$$\text{Volumen de madre de luminol: } \frac{1.25 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot 100 \text{ ml}}{25 \cdot 10^{-3} \text{ M}} = 5.0 \text{ mL}$$

Esta disolución se preparaba diariamente empleando como disolvente el tampón borato.

- Disolución de madre de ferricianuro potásico.

La concentración de la disolución madre de ferricianuro potásico es 25 mM, preparándose un volumen de 25 mL.

$[K_3[Fe(CN)_6]] = 25 \text{ mM}$, Pm: 329.25 g/mol.

$$25 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 0.025 \text{ L} \cdot 329.25 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0.206 \text{ gramos de } [K_3[Fe(CN)_6]]$$

La disolución de ferricianuro se preparaba diariamente en agua Milli-Q.

- Disolución de trabajo de ferricianuro potásico.

Para preparar esta disolución se partió de la disolución madre de ferricianuro 25 mM.

La concentración del ferricianuro de trabajo es de 0.27 mM; se preparó un volumen de 100 mL.

$[K_3[Fe(CN)_6] \text{ de trabajo}] = 0.27 \text{ mM}$

$$\text{Volumen de madre de } [K_3[Fe(CN)_6]]: \frac{0.27 \cdot 10^{-3} \text{ M} \times 100 \text{ ml}}{25 \cdot 10^{-3} \text{ M}} = 1.08 \text{ mL}$$

Esta disolución se preparaba diariamente en NaOH 0.01 N.

- Disolución de madre de NaOH.

La concentración de la disolución madre de NaOH es 1 N, preparándose un volumen de 25 mL.

$[NaOH] = 1 \text{ N}$, Pm: 40 g/mol.

$$1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 0.025 \text{ L} \cdot 40 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 1.0 \text{ gramos de NaOH}$$

La disolución de NaOH se preparaba diariamente en agua Milli-Q.

- Disolución de trabajo de NaOH.

Para preparar esta disolución se partió de la disolución madre de NaOH 1 N.

La concentración del hidróxido sódico de trabajo es de 0.01 N; se preparó un volumen de 100 mL.

$[NaOH \text{ de trabajo}] = 0.01 \text{ N}$.

$$\text{Volumen de madre de } [NaOH]: \frac{0.01 \text{ N} \times 100 \text{ ml}}{1.0 \text{ N}} = 1.0 \text{ mL}$$

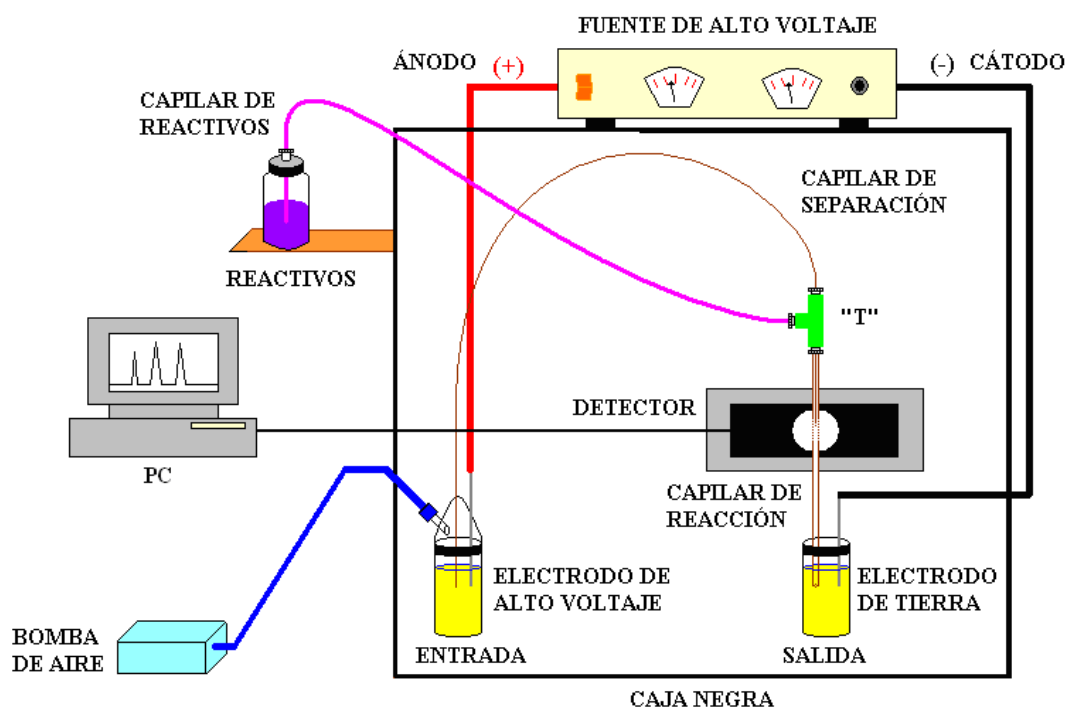
Esta disolución se preparaba diariamente.

4.3. Material

4.3.1. Instrumentación desarrollada. Sistema CE-CL

Para llevar a cabo la separación electroforética y la posterior detección quimioluminiscente, considerando que no existe instrumento comercial disponible, se diseñó y construyó un montaje casero como el que se muestra en la figura 9.

Figura 9. Esquema del montaje CE-CL.

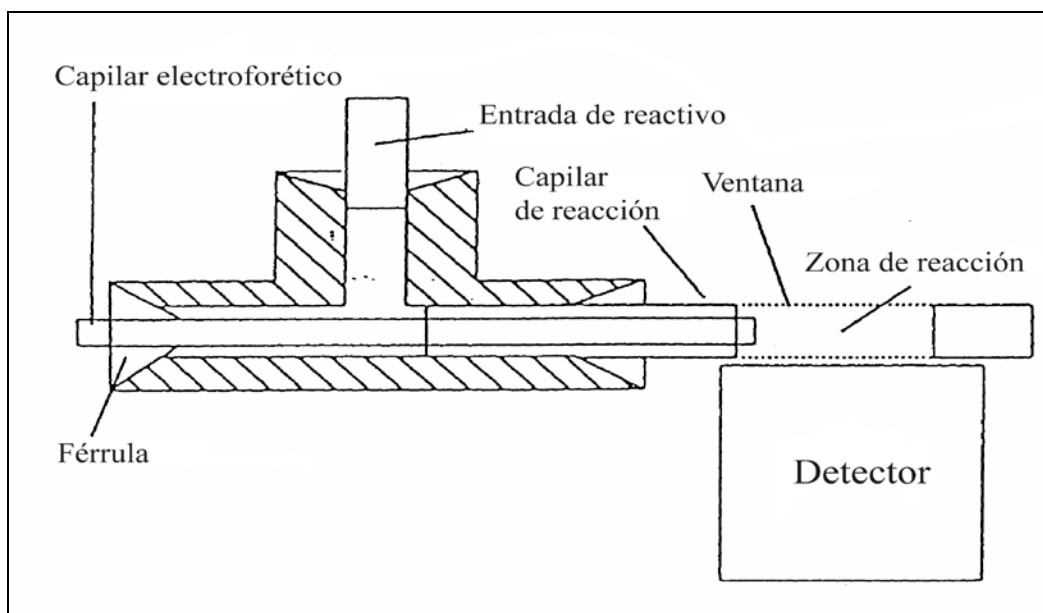


Los componentes del sistema son:

- Detector: Contador de fotones Hamamatsu M7824.
- Fuente de alto voltaje: Glassman series EL, modelo PS/EL30P01.5-22.
- Toma de tierra.
- Capilar de separación: sílice fundida 50 cm x 50 μm ID x 192 μm OD.
- Capilar de reactivos: tubo de teflón 90 cm x 0.3 mm ID.
- Capilar de reacción: sílice fundida 11 cm x 320 μm ID x 450 μm OD.
- Conector: T de PEEK de 0.508 mm ID.
- Electrodo de platino.
- Viales de vidrio de 4 mL.
- Bombas de aire: Otto SA-3500.

El sistema consistía en dos viales de vidrio de 4 mL, uno de entrada y otro de salida. En el primero se introducía un electrodo de platino (ánodo) conectado a la fuente de alto voltaje y en el segundo se introducía un electrodo (cátodo), también de platino, conectado a tierra. En el vial de entrada se sumergía el capilar de separación y en el de salida desembocaba el capilar de reacción. La unión entre estos dos capilares y el capilar de reactivos se realizaba mediante un conector en forma de “T” como se detalla en la figura 10. Este tipo de unión o interfase se la conoce como coaxial. La ventana para la detección se hizo eliminando la poliimida del capilar de reacción con H_2SO_4 , tenía una longitud de 1 cm y empezaba 2 mm antes de que acabara el capilar de separación. Esta ventana se enfrentaba directamente al detector.

Figura 10. *Detalle de la interfase CE-CL.*



Todo el sistema fue dispuesto dentro de una caja negra para evitar la radiación externa, y el detector, además, se encontraba embutido en un armazón de aluminio que permite la focalización de la zona de detección en la ventana del capilar. Mientras que el vial de salida se encontraba destapado, el de entrada estaba cerrado para permitir su presurización mediante las bombas de aire y consecuentemente que la disolución en cuestión pudiera fluir por el capilar de separación. De esta manera se conseguía acondicionar el capilar. El acondicionamiento al comienzo de cada día consistía en: 20 min. de NaOH 0'1N, 10 min. de H_2O y 20 min. de tampón. Entre análisis se acondicionaba con 5 min. de NaOH, 5 min. de tampón aplicando presión seguidos de otros 5 min. aplicando

voltaje para que se estabilizara la línea base. Si el capilar era nuevo se acondicionaba durante 30 min. con NaOH 1 N, 20 min. de H₂O y finalmente con 30 min. de tampón. La introducción de reactivos se llevaba a cabo elevando el vial con ferricianuro 30 cm. sobre la salida del capilar de reacción. Esto originaba un caudal de reactivo de aproximadamente 60 µL/min. La introducción de muestra se podía realizar mediante la elevación del vial con muestra 20 cm. sobre el mismo nivel anterior (inyección hidrostática), o bien aplicando voltaje durante un tiempo determinado (inyección electrocinética). La adquisición de datos se realizaba conectando el detector a un PC. La frecuencia de esta adquisición era de un punto cada 200 ms., en total se tomaban 1600 puntos, lo que equivalía a 5 min. y 20 s.

4.3.2. Instrumentación auxiliar

- Granatario Sartorius CP-323-S.
- Balanza analítica de precisión AND GR-120.
- Micropipetas de volumen variable entre 5 y 1000 µL Transferpette Brand.
- pH-metro Crison micro-pH 2000.
- Baño ultrasónico Selecta ultrasons.
- Trompa de vacío Büchi B-169.
- Sistema de extracción en fase sólida Supelco.
- Centrífuga Hettich Zentrifugen.
- Material de vidrio como pipetas graduadas y aforadas de distintos volúmenes, tubos de centrífuga, matraces aforados de distintos volúmenes, vasos diversos.

4.3.3. Software

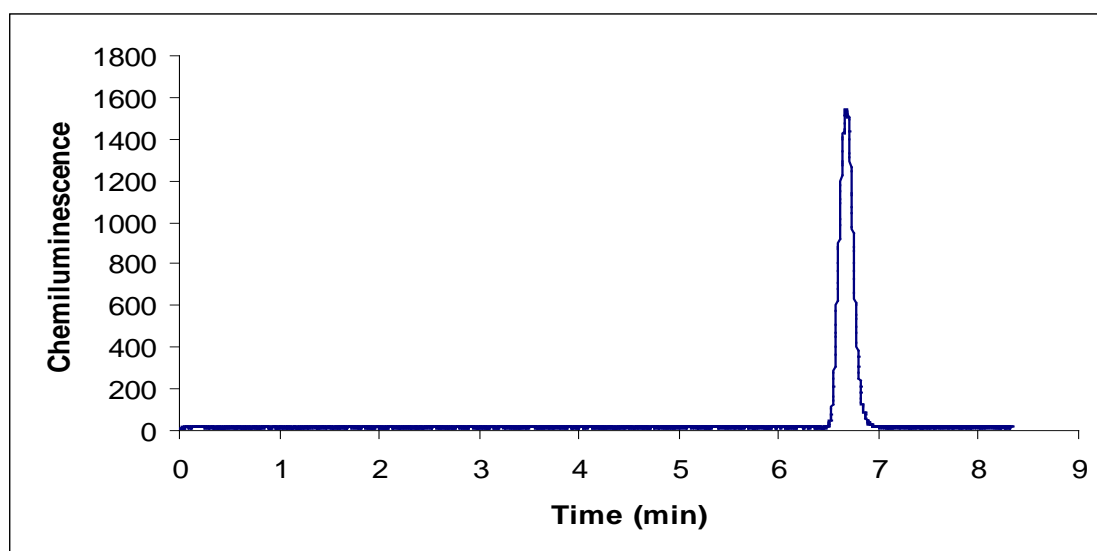
- La adquisición de datos se ha realizado con el programa Hamamatsu M7824.
- El tratamiento estadístico de los datos se ha llevado a cabo con los programas Statgraphics Plus 5.0 y hojas de cálculo diseñadas en Excel 2000.

5. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA.

5.1. Desarrollo instrumental y selección de la reacción CL.

Con objeto de demostrar que el instrumento diseñado presenta un óptimo funcionamiento se comenzó inyectando luminol en el sistema electroforético, empleando la detección quimioluminiscente [86]. Para ello se introdujo una muestra de 100 ng/mL de luminol preparada en una disolución tampón 10 mM Na_3PO_4 / Na_2HPO_4 a pH 10'8. Este mismo tampón con 10 mM de H_2O_2 se utilizó como tampón de separación, e igualmente sirvió para preparar la disolución de reactivo disolviendo ferricianuro potásico en una concentración de 25 mM. El voltaje aplicado durante la separación fue de 15 kV. El electroferograma que se obtuvo aparece en la figura 11.

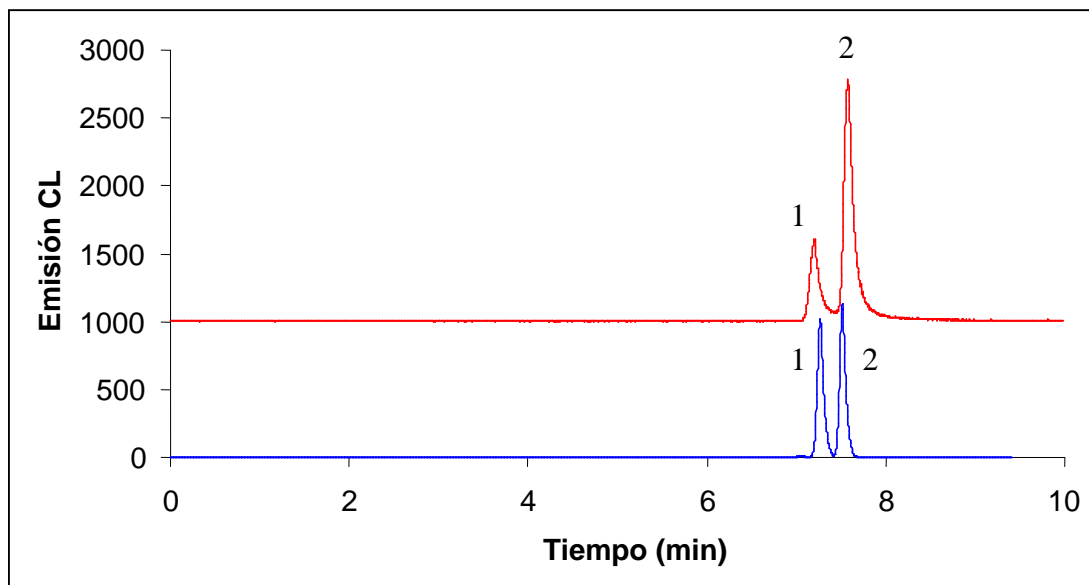
Figura 11. *Electroferograma de una muestra de 100 ng/mL de luminol.*



Si cambiamos el tampón de separación anterior por uno compuesto de: 20 mM de Tetraborato / NaOH a pH 9'5 con 20 mM de SDS y 10 mM de H_2O_2 era posible separar el luminol de su isómero isoluminol como lo demuestra la figura 12. La identificación de los picos se hizo aumentando la concentración de luminol en la muestra para ver que pico aumentaba su altura.

[86] K. Tsukagoshi, Y. Uoji y R. Nakajima, *Analytical Sciences*, 17 (2001), 1003-1005.

Figura 12. *Electroferogramas de una mezcla de isoluminol (1) y luminol (2) a distintas concentraciones.*

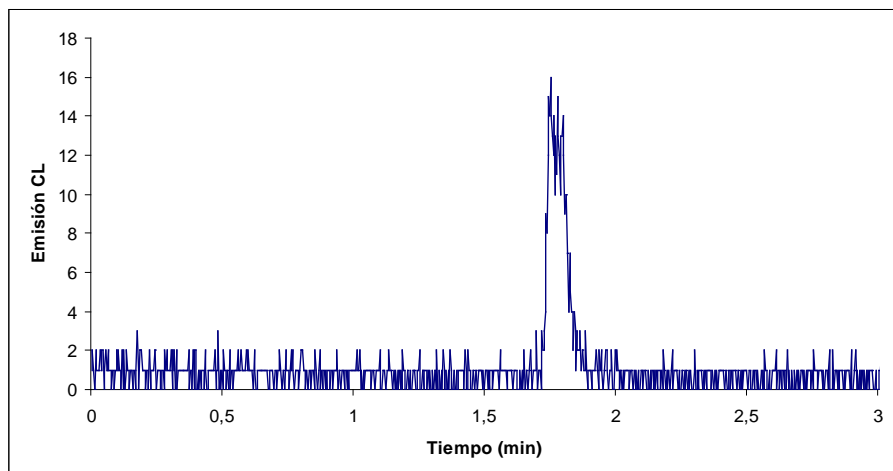


Por tanto, el primero en migrar era el isoluminol y el segundo el luminol. Con esta experiencia se pretendió demostrar que el montaje no sólo fue eficaz en la detección de la emisión CL de la reacción sino que además era posible la separación electroforética previa. El siguiente paso era encontrar una reacción quimioluminiscente apropiada para los analitos de interés (fenotiazinas). Para ello se consideraron ciertas reacciones quimioluminiscentes en las que participan las fenotiazinas, siendo posible su determinación. Hasta el momento estas reacciones han sido aplicadas sólo a sistemas de análisis por inyección en flujo (FIA).

La primera que se probó fue una oxidación directa [87]. El tampón de separación fue 50 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{H}_3\text{PO}_4$ a pH 3 y el reactivo consistía en una disolución 1 mM de KMnO_4 en H_2SO_4 1M, introducido por gravedad a una altura de 15 cm. Se aplicaron 15 kV para la separación. En esta reacción, la oxidación de prometazina por permanganato en medio ácido produce un intermedio en estado excitado que genera una emisión CL proporcional a la concentración de analito. Este intermedio aún no ha sido bien caracterizado pero parece estar más relacionado con una especie reducida de Mn(II) que con una especie oxidada del sustrato (fenotiazinas en nuestro caso). Aunque se consiguió detectar la prometazina a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (figura 13) se intentó aplicar otra reacción que fuese más eficaz y proporcionase mayor sensibilidad.

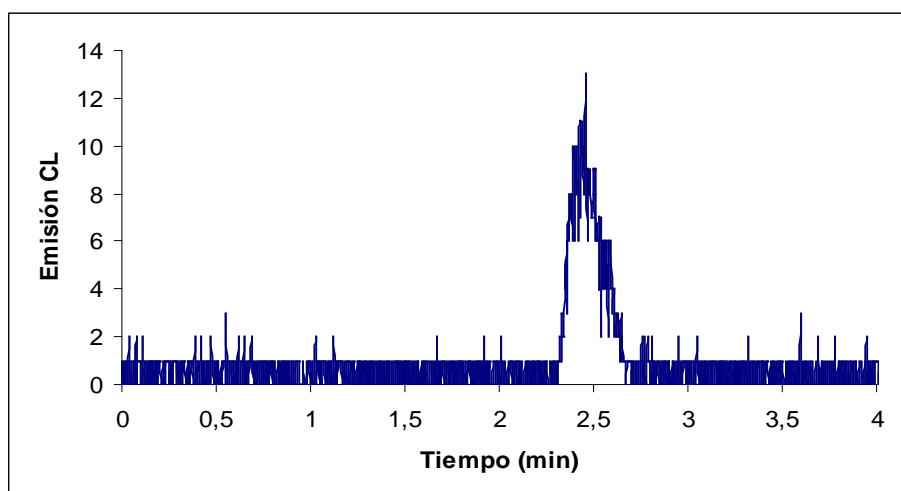
[87] S.M. Sultan, Y. A. M. Hassan y A. M. Abulkibash, *Talanta*, 59 (2003), 1073-1080.

Figura 13. *Electroferograma obtenido tras la oxidación directa de una muestra de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de prometazina con KMnO_4 .*



La segunda reacción que se probó fue la oxidación de las fenotiazinas con Ce(IV) en medio de ácido nítrico y empleando un sensibilizador como es la Rodamina 6-G [88]. En este caso el tampón de separación fue el mismo que para la primera reacción pero se le adicionó Rodamina 6-G hasta obtener una concentración de 30 μM . El reactivo consistió en una disolución de 0,6 mM de sulfato de Ce(IV) en ácido nítrico 1M, introducido por gravedad a una altura de 15 cm. Se aplicaron 15 kV para la separación. En este caso la fenotiazina ensayada fue la clorpromazina a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (figura 14).

Figura 14. *Electroferograma de una muestra de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ clorpromazina mediante oxidación con Ce(IV) y sensibilización con Rodamina 6-G.*



[88] Y. Huang y Z. Chen, *Talanta*, 57 (2002), 953-959.

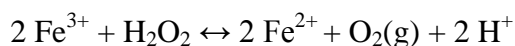
Se comprobó que aumentando la concentración de Rodamina 6-G se podía mejorar la sensibilidad del sistema, pero los resultados tampoco eran los deseados en cuanto a sensibilidad, así que se siguieron buscando reacciones que fuesen más eficaces.

Una de las reacciones de mayor eficacia quimioluminiscente es la del luminol cuando se oxida con H_2O_2 en presencia de un catalizador. Teniendo en cuenta que las fenotiazinas se oxidan fácilmente transformándose en los correspondientes sulfóxidos, se pensó estudiar la participación de estos fármacos en dicha reacción con objeto de comprobar si alteraban la emisión CL [89]. Los problemas que nos encontramos ante esta estrategia eran: en primer lugar era necesario que el luminol fuese disuelto en tampón y el H_2O_2 entrara por el canal de reactivo. Obviamente debían ir por canales separados y encontrarse justo delante del detector para que allí, debido a su rápida cinética, generasen la emisión CL debida a la reacción. Esto originaría una línea base elevada que podría disminuir en presencia de alguna fenotiazina, puesto que esta se oxidaría con el peróxido, lo que provocaría que hubiese menos reactivo disponible para oxidar al luminol. Si se oxida menos luminol deberíamos observar una caída en la línea base. Otro inconveniente es que no era posible introducir el peróxido con el tampón de separación porque eso provocaría que las fenotiazinas se oxidasen mucho antes de llegar al detector y antes de haber sido separadas. También plantea problemas la introducción del catalizador, puesto que de no hacerlo la línea base no sería lo suficientemente alta como para conseguir una buena sensibilidad. Los catalizadores que se suelen emplear son iones metálicos como Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} o Fe^{2+} . Las sales de estos iones son solubles a pHs neutros o ácidos y la reacción del luminol es eficaz si formamos el dianión para lo que es necesario un pH de 10-11. A estos pHs básicos se forman los hidróxidos de los iones metálicos con lo que precipitan y dejan de catalizar la reacción. Una estrategia muy empleada en bibliografía [90] ha sido la formación de complejos con los iones metálicos de manera que sean solubles en medios alcalinos y no pierdan su actividad catalítica. Así, decidimos utilizar el mismo catalizador que habíamos empleado para comprobar el funcionamiento del montaje, es decir, el ferricianuro potásico, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Aunque este complejo podía ir disuelto tanto en el tampón como en el reactivo, existían problemas en ambos casos. Si lo disolvíamos en el tampón no conseguíamos que avanzase por el capilar porque el anión $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, al tener tres cargas negativas, posee una movilidad electroforética mayor y

[89] A. A. Alwarthan, S. A. Al-Tamrah y A.A. Akel, *Anal. Chim. Acta*, 282 (1993), 169-174.

[90] K. Tsukagoshi, K. Nakahama y R. Nakajima, *Chem Letters*, 32 (2003), 634-635.

de sentido contrario a la electroosmótica, con lo que esta especie nunca migraba hacia el cátodo, que es donde se encontraba el detector, sino que tenía tendencia a ir hacia el ánodo, que se encuentra en el vial de entrada. La otra opción era introducirlo por el capilar de reactivos pero esto hacía que se descompusiese el peróxido, con lo que no conseguíamos una estabilidad en la línea base porque además la descomposición del peróxido formaba burbujas de oxígeno conforme a la siguiente reacción redox:

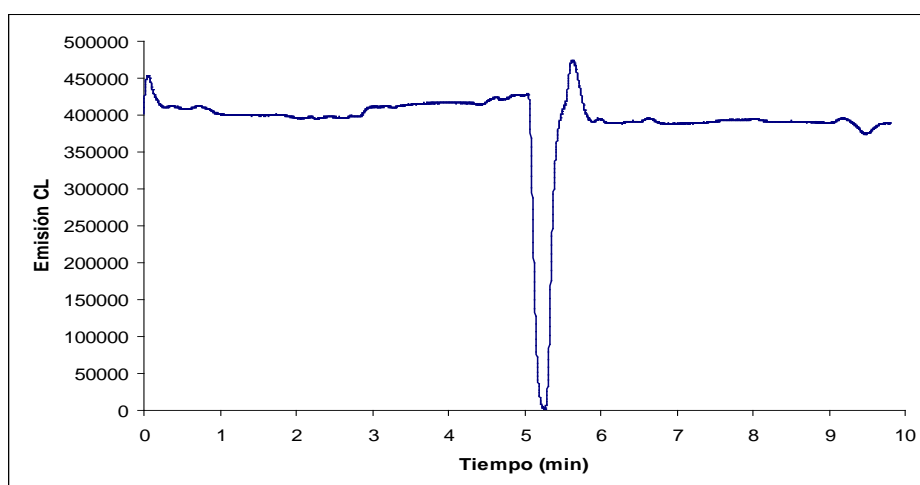


El Fe^{3+} proviene del equilibrio de disociación del ferricianuro lo que explicaría que la reacción no sea espontánea porque es necesario que se disocie el complejo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Como se encuentra descrito que el $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ es capaz de oxidar por si solo al luminol produciendo quimioluminiscencia [91] decidimos eliminar el peróxido de la disolución de reactivo e introducir sólo el $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Las condiciones de partida fueron:

- Muestra: disoluciones individuales de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada fenotiazina. Se inyectó aplicando presión durante 5 s.
- Tampón: 20 mM Tetraborato / HCl a pH 8'5, con 2 mM de luminol. Se aplicaron 15 kV para la separación.
- Reactivo: 0'2 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en NaOH 0'1N introducido por gravedad a una altura de 30 cm.

La línea base que se obtuvo con este sistema es la que aparece en la figura 15. El pico negativo que se observa corresponde al flujo electroosmótico.

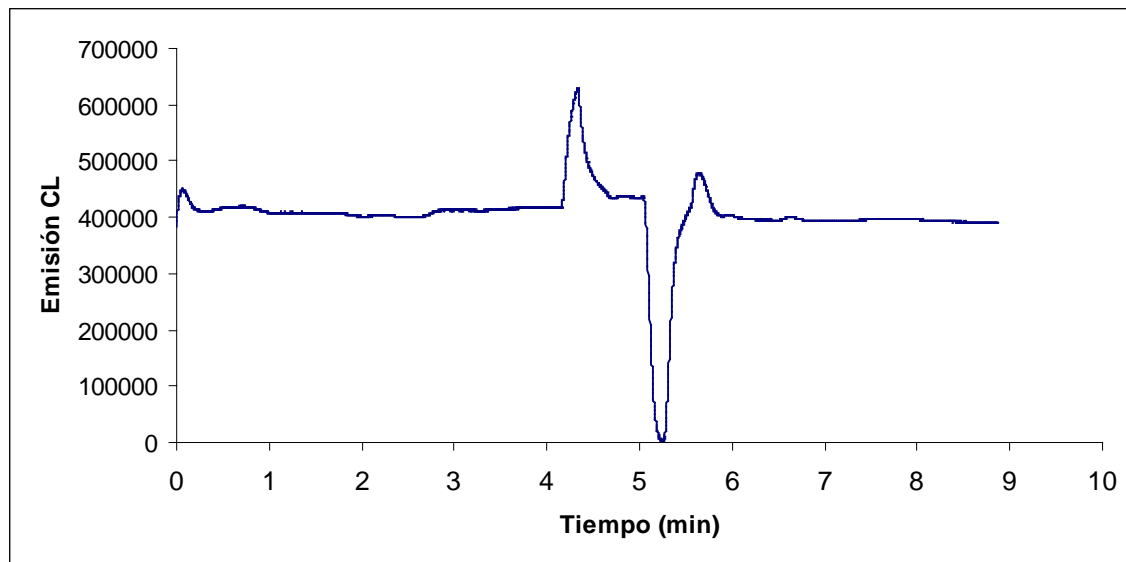
Figura 15. Línea base obtenida con el sistema del luminol- $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.



[91] P. B. Shevlin y H. A. Neufeld, *J. Org. Chem.*, 35 (1970), 2178-2182.

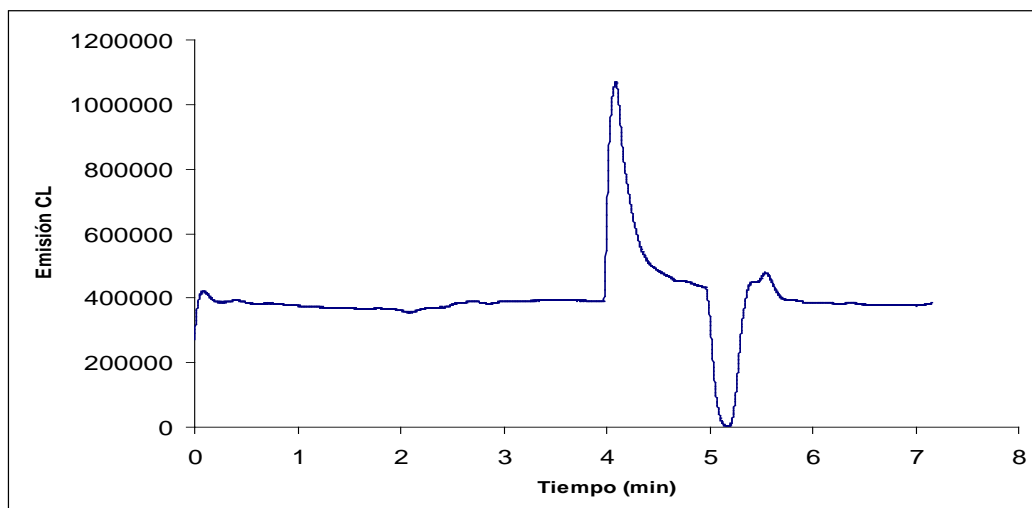
Cuando inyectábamos 100 $\mu\text{g/mL}$ prometazina se obtenía el electroferograma de la figura 16.

Figura 16. *Electroferograma de una muestra de 100 $\mu\text{g/mL}$ de prometazina con la reacción del luminol – $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.*



Algo semejante ocurría con la promazina (figura 17).

Figura 17. *Electroferograma de una muestra de 100 $\mu\text{g/mL}$ de promazina con la reacción del luminol – $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.*

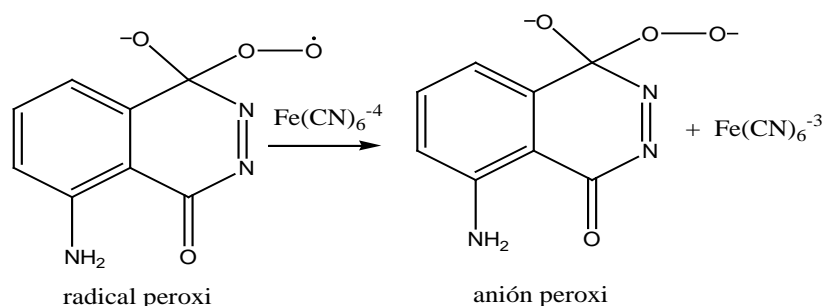


Otras fenotiazinas ensayadas (metilsulfato de thiazinamium, clorpromazina y thioridazina) no dieron señal en estas condiciones.

5.2. Posible mecanismo de la emisión CL.

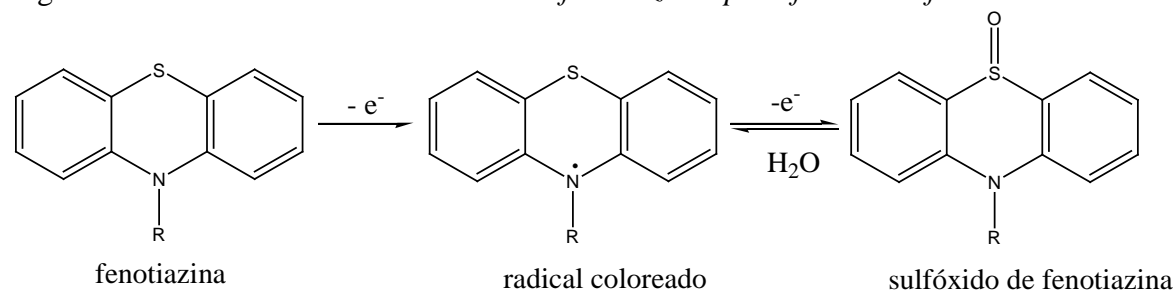
Resultaba sorprendente que la señal fuese de exaltación en lugar de atenuación puesto que al oxidarse las fenotiazinas era de esperar que redujesen la concentración local de ferricianuro y esto provocase una disminución de la línea base. Este comportamiento se ha observado igualmente con indapamida [92]. Una posible explicación la podemos encontrar en el mecanismo que sigue el luminol para emitir quimioluminiscencia en presencia de $K_3[Fe(CN)_6]$. En una etapa de la reacción general mostrada en la figura 4 se forma un radical peroxi que posteriormente, tras captar un electrón, pasa a anión peroxi (figura 18). Si no hay ningún otro reductor en el medio, la especie más favorable para suministrar ese electrón puede ser el ferrocianuro potásico, $K_4[Fe(CN)_6]$ según señalan P.B. Shevlin y H.A. Neufold [91] (Ver figura 4).

Figura 18. Formación del anión peroxi durante la oxidación del luminol con $K_3[Fe(CN)_6]$.



Por otra parte las fenotiazinas son fácilmente oxidadas por agentes como el $K_3[Fe(CN)_6]$. El mecanismo ocurre en dos etapas [93]: la primera es reversible y produce un radical coloreado, si hay un exceso de oxidante se da la segunda etapa que es irreversible y que conduce a la formación del sulfóxido que es incoloro (figura 19).

Figura 19. Mecanismo de oxidación de las fenotiazinas para formar sulfóxidos.



[92] Z. Wang, Z. Zhang, X. Zhang y Z. Fu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 35 (2004), 1-7.

[93] J. Karpinska, *Anal. Sci.*, 17 (2001), 249-253.

Es probable que el electrón necesario para pasar del radical peroxi al anión peroxi provenga de la oxidación de las fenotiazinas lo que explicaría el efecto exaltador que tienen algunas de ellas sobre la quimioluminiscencia del luminol con $K_3[Fe(CN)_6]$. El hecho de que unas exalten y otras no puede residir en la capacidad de éstas para actuar como reductores.

Puesto que esta reacción era la que mayor sensibilidad proporcionaba de todas las ensayadas, decidimos seleccionarla para establecer el método analítico. Antes de optimizar la sensibilidad era necesario conseguir la separación de promazina (PMH) de la prometazina (PTH), para lo cual se llevó a cabo un estudio de los diferentes parámetros que podían afectar a dicha resolución: pH, naturaleza, concentración y modificadores orgánicos del tampón electroforético.

5.3. Optimización de la separación electroforética de promazina y prometazina.

5.3.1. Optimización del pH y de la naturaleza del tampón.

Basándonos en nuestro conocimiento previo del sistema [94] consideramos 8'5 como pH óptimo para la separación. Esto es así porque en las proximidades del pK_a (9'4 para PMH y 9'0 para PTH) es cuando se consiguen las mayores diferencias en las movilidades electroforéticas. A pHs más básicos las fenotiazinas están mayoritariamente en su forma neutra y precipitan en disolución acuosa, y además un pH de 8'5 es adecuado para disolver el luminol. A este pH se ensayaron diferentes naturalezas de tampón:

- 20 mM tetraborato sódico a pH 8'5 con 2 mM luminol.
- 100 mM Tris(hidroximetil)aminometano a pH 8'5 con 2 mM de luminol.
- 20 mM carbonato sódico a pH 8.5 con 2 mM de luminol.
- 50 mM acetato amónico a pH 8.5 con 2 mM de luminol.

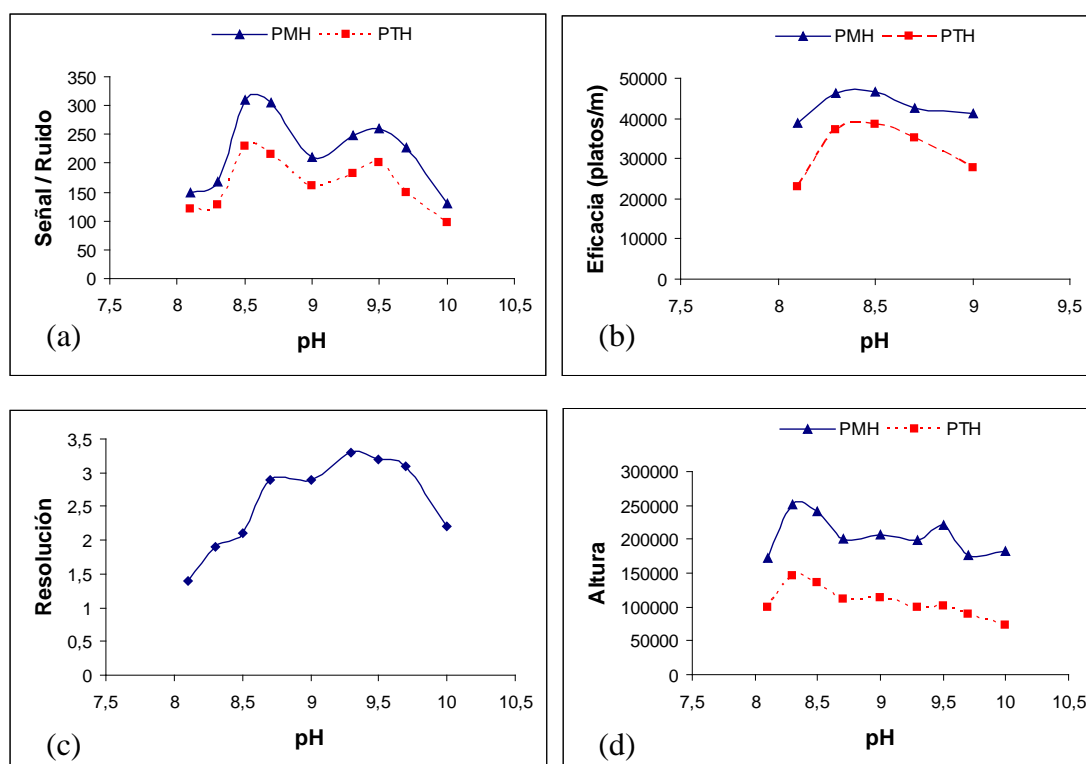
La experiencia se realizó con una muestra de 10 $\mu\text{g/mL}$ de PMH y 40 $\mu\text{g/mL}$ de PTH en agua Milli-Q. Con ello pretendíamos igualar la altura de los picos debido a la mayor señal CL de la PMH. De todos los tampones empleados, sólo se obtuvieron resultados satisfactorios con el de tetraborato. Con Tris y con acetato amónico no se

[94] Francisco J. Lara, A.M. García-Campaña, F. Alés-Barrero y J.M. Bosque-Sendra, *Anal. Chim. Acta.* 535 (2005) 101-108.

consiguió una línea base elevada, probablemente porque inhiben la reacción entre el luminol y el $K_3[Fe(CN)_6]$. En el caso del Tris puede ser debido a la presencia de grupos alcoholes fácilmente oxidables que estarían constantemente retirando el oxidante del medio. El problema con el Na_2CO_3 fue que no se consiguió estabilizar la corriente eléctrica y que se observó la aparición de burbujas, posiblemente de CO_2 , en el vial de salida. Por tanto, el tampón seleccionado para continuar con la optimización fue el de tetraborato sódico.

Aunque a pH 8'5 la separación entre PMH y PTH era satisfactoria se estudiaron otros pHs para ver su efecto sobre distintas respuestas. Con el tampón 20 mM de tetraborato sódico y 2 mM de luminol se estudiaron los siguientes pHs: 8'1, 8'3, 8'5, 8'7, 9'0, 9'3, 9'5, 9'7 y 10. Se seleccionó este rango porque fue el único con el que se consiguió buena resolución ($> 1'5$). En las siguientes figuras 20a, 20b, 20c y 20d podemos observar el efecto del pH en la relación señal/ruido, en la eficacia, en la resolución y en la altura, respectivamente, tanto para PMH como para PTH.

Figura 20. Efecto del pH en la en la relación señal/ruido (a), en la eficacia (b), en la resolución (c) y en la altura (d). Concentraciones: 10 $\mu g/mL$ PMH y 40 $\mu g/mL$ PTH.

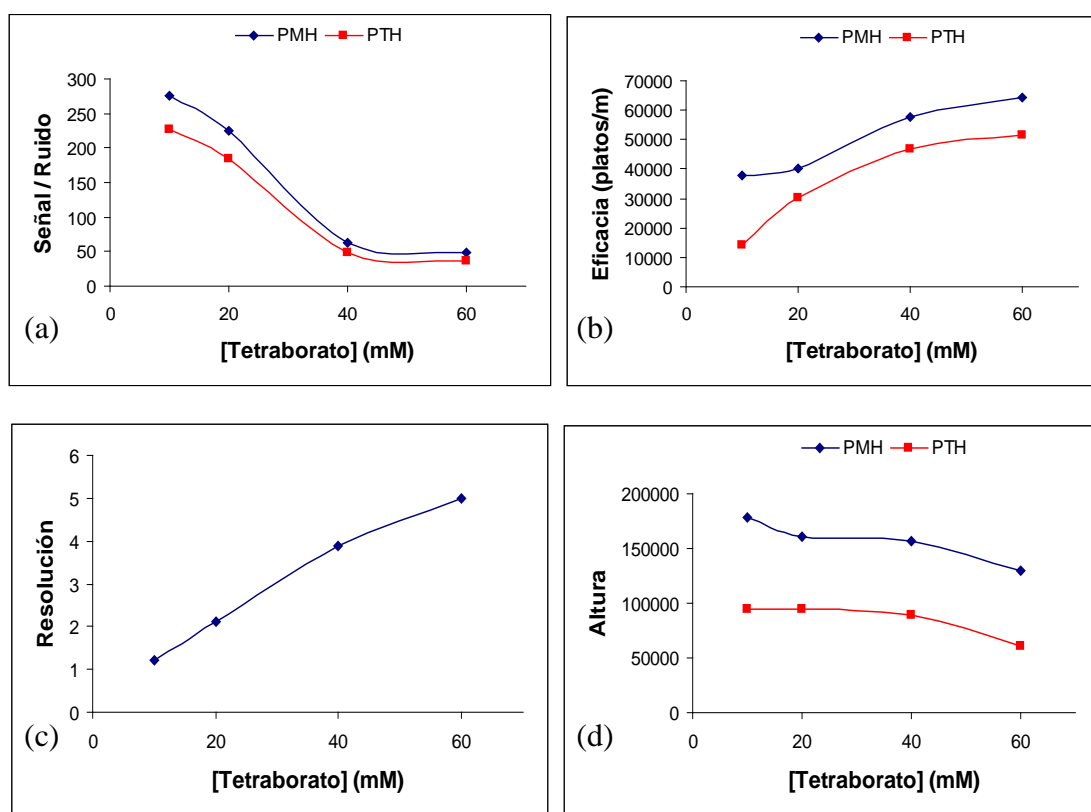


Se optó por continuar trabajando a pH 8'5 porque con el se consiguió la mejor relación señal/ruido, las mejores eficacias y la resolución fue superior a 1'5 con lo que los picos se podían considerar resueltos.

5.3.2. Optimización de la concentración de tampón.

El siguiente paso fue optimizar la concentración de tampón. Los valores ensayados fueron: 10 mM, 20 mM, 40 mM y 60 mM de tetraborato/HCl a pH 8'5 con 2 mM luminol. Los resultados obtenidos se indican en la figura 21.

Figura 21. Efecto de la concentración de tampón sobre la relación señal/ruido (a), la eficacia (b), la resolución (c) y la altura (d). Concentraciones: 10 $\mu\text{g/mL}$ PMH y 40 $\mu\text{g/mL}$ PTH.



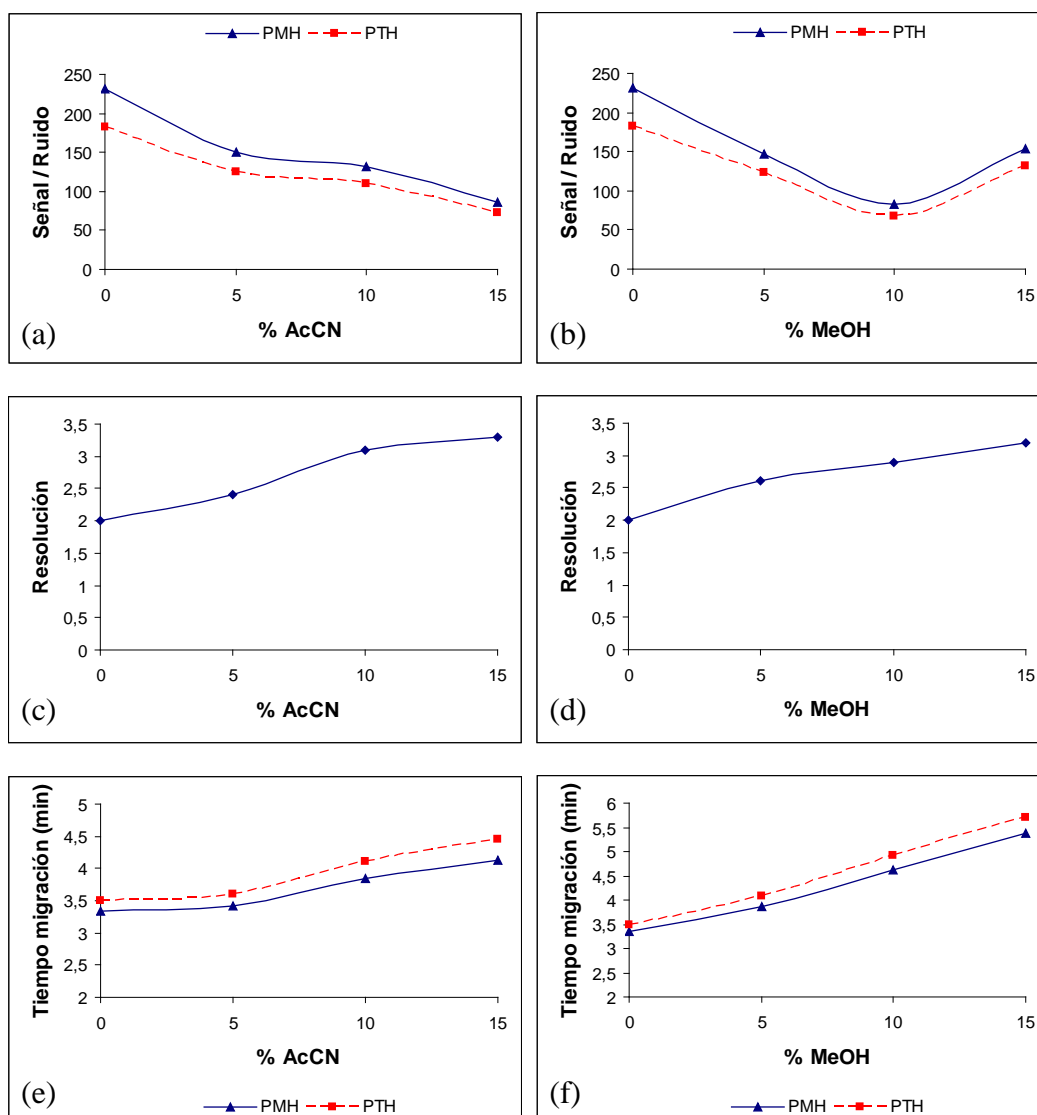
El estudio realizado demuestra que un aumento de la concentración de tampón conlleva un aumento en la resolución y en las eficacias de pico pero una disminución en la relación señal/ruido. Además se vio que con dicho aumento era necesario más tiempo para estabilizar la línea base. Como en un orden de prioridades primero interesa mejorar

la sensibilidad y luego las eficacias deberíamos seleccionar una concentración de 10 mM pero con ésta la resolución era insuficiente ($1'5$), así que el valor finalmente elegido fue 20 mM.

5.3.3. Efecto de la adición de modificadores orgánicos.

A continuación se realizó un estudio de cómo afecta a factores como la relación señal/ruido, resolución y tiempo de migración, la adición de modificadores orgánicos al tampón de separación. Para ello se adicionó acetonitrilo o metanol al tampón en porcentajes de 5, 10 y 15 %. Los resultados se muestran en la figura 22.

Figura 22. Efecto de la adición de acetonitrilo o metanol sobre la relación señal/ruido (a y b), la resolución (c y d) y el tiempo de migración (e y f). Concentraciones: 10 $\mu\text{g/mL}$ PMH y 40 $\mu\text{g/mL}$ PTH.

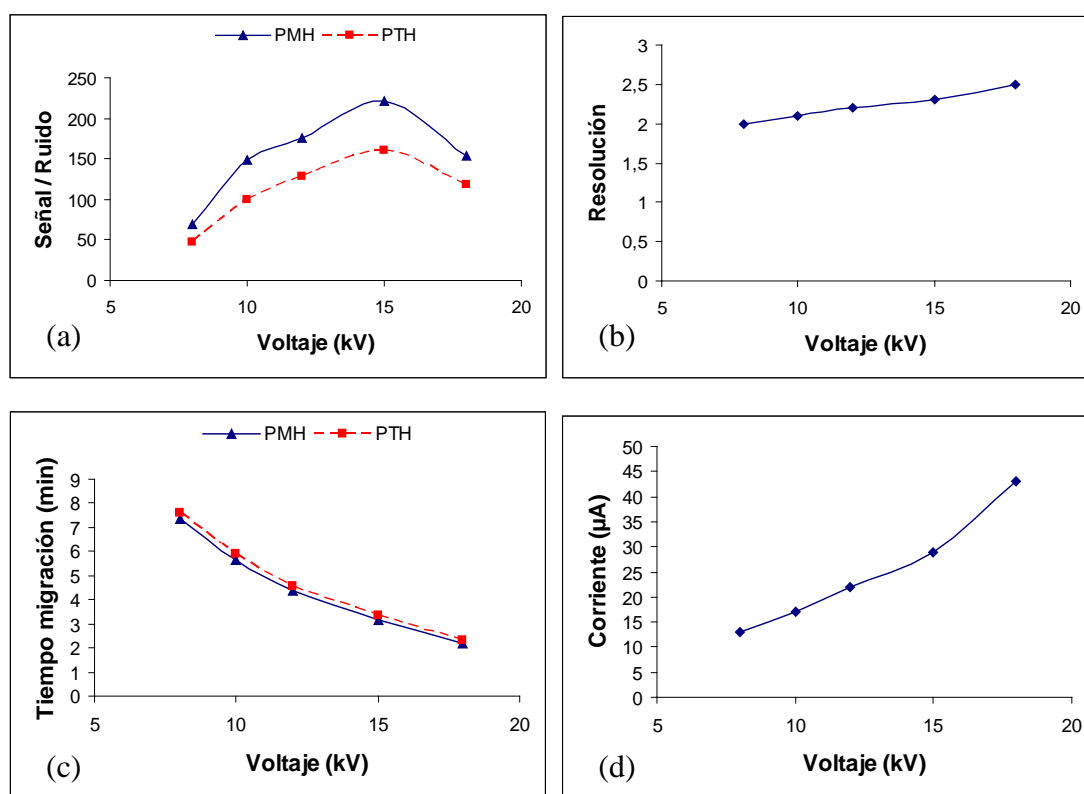


Tanto la adición de acetonitrilo como de metanol condujo a una disminución de la relación señal/ruido y a un aumento del tiempo de migración, por lo que a pesar de aumentar la resolución y teniendo en cuenta que ésta ya era satisfactoria en ausencia de éstos, no se consideró necesario adicionar ningún modificador orgánico al tampón.

5.3.4. Optimización del voltaje de separación.

Siguiendo con la optimización de todas las variables que afectan a una metodología CE-CL, se hacía necesaria en este punto la optimización del voltaje de separación. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 23.

Figura 23. Efecto del voltaje de separación sobre la relación señal/ruido (a), la resolución (b), el tiempo de migración (c) y la corriente (d). Concentraciones: 10 µg/mL PMH y 40 µg/mL PTH.



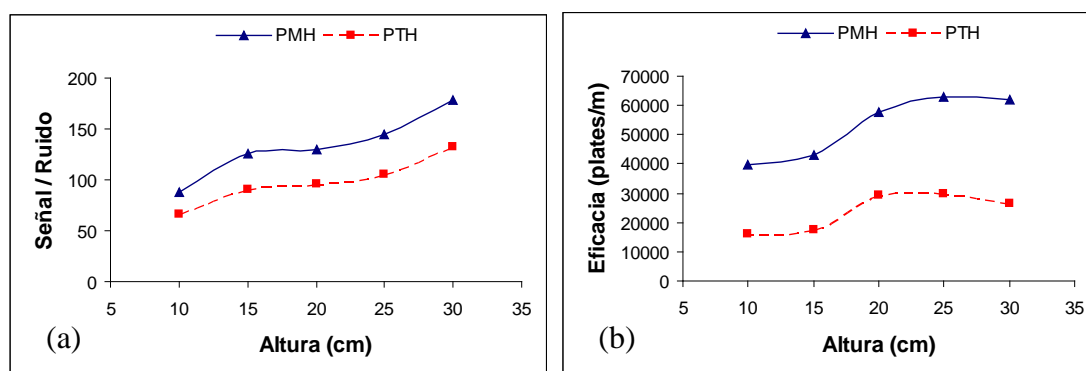
El voltaje elegido para la separación fue de 15 kV porque era el que mejor relación señal/ruido proporcionaba y el que conseguía la mejor resolución entre picos en el menor tiempo posible sin que hubiese efecto Joule. En la gráfica corriente vs. voltaje se puede ver como la relación es lineal hasta los 15 kV, lo que está en concordancia con la ley de Ohm ($\text{voltaje} = \text{intensidad de corriente} \cdot \text{resistencia}$). El que a partir de los 15

kV se pierda la linealidad podría explicarse si hay efecto Joule: un voltaje tan elevado genera una cantidad de calor que no puede ser eliminada por las paredes del capilar lo que provoca corrientes turbulentas en su interior y la consiguiente pérdida de relación señal/ruido.

5.3.5. Optimización de la incorporación del reactivo CL mediante gravedad.

La altura a la que se coloca el vial con el reactivo ($K_3[Fe(CN)_6]$) determina el flujo con el que estamos aportando dicho reactivo a la reacción CL post-separación. Este flujo es importante por dos motivos: en primer lugar, de él depende la cantidad de reactivo fresco que estemos aportando a la zona de reacción; en segundo lugar, será el responsable del tiempo de permanencia de los analitos frente al detector. Lo primero va a influir en la relación señal/ruido, y lo segundo afectará a la eficacia de los picos, puesto que si el tiempo de permanencia es demasiado alto los picos serán muy anchos y por tanto poco eficaces. Según lo dicho interesarían flujos altos (vial de reactivo a mayor altura) para tener picos eficaces, pero nunca tan altos que no se alcanzase la máxima intensidad CL dentro de la ventana de detección. En los estudios realizados se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 24.

Figura 24. Efecto de la altura del vial de reactivo sobre la relación señal/ruido (a) y sobre la eficacia (b). Concentraciones: 10 $\mu\text{g/mL}$ PMH y 40 $\mu\text{g/mL}$ PTH.



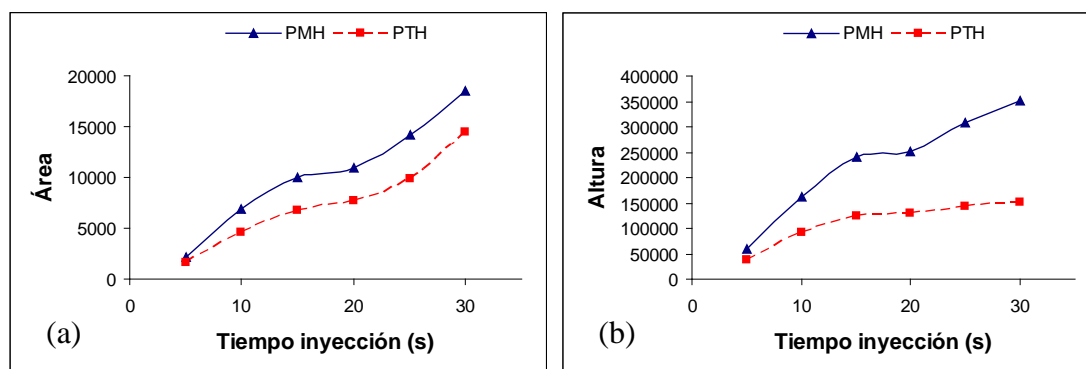
Puesto que la mejor relación señal/ruido fue obtenida a un altura de reactivo de 30 cm. este fue el valor fijado para los siguientes experimentos.

5.3.6. Optimización de la inyección de muestra.

En esta memoria se emplearon dos técnicas de inyección: por gravedad (hidrostática) y por voltaje (electrocinética). La primera es más reproducible y fue la que se empleó para las aplicaciones en fármacos, la segunda proporciona mayor sensibilidad y se utilizó para la determinación de fenotiazinas en orina. Mientras que la inyección hidrostática o por efecto sifón no es discriminativa, puesto que introduce tanto aniones como cationes, la inyección electrocinética si lo es porque no es posible inyectar aniones y cationes a la vez.

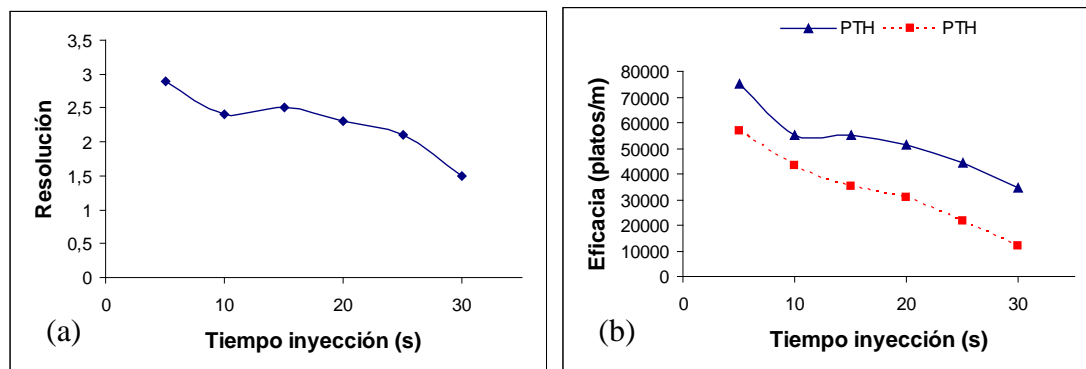
A) Inyección hidrostática: se optimizó elevando el vial de muestra 20 cm. sobre la salida del capilar de separación durante un tiempo que varió entre los 5 y los 30 s. En la figura 25 se observa el efecto del aumento del tiempo de inyección sobre el área y sobre la altura.

Figura 25. Efecto de la *variación del tiempo de inyección sobre el área (a) y sobre la altura (b)*. Concentraciones: 10 $\mu\text{g/mL}$ PMH y 40 $\mu\text{g/mL}$ PTH.



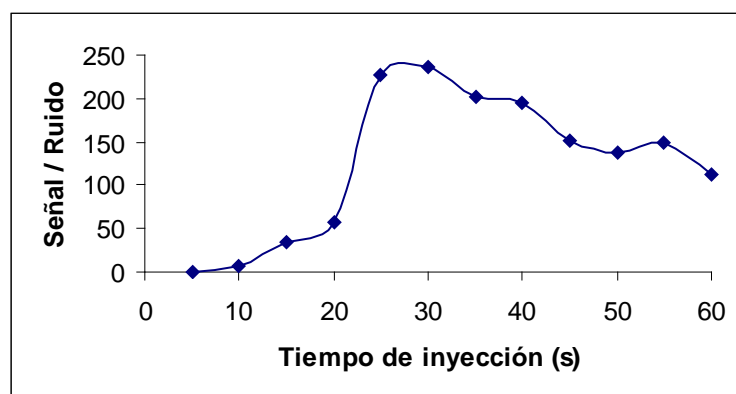
En el caso de las áreas, se observa que se mantiene un crecimiento casi lineal cuando aumenta el tiempo de inyección, en cambio para las alturas observamos que hasta 15 s el aumento es lineal pero a partir de ese tiempo decrece la pendiente. Esto es debido a que la altura es sensible a la sobrecarga de muestra en el capilar mientras el área no, es decir, a partir de los 15 s ocurre el fenómeno conocido como “ensanchamiento de bandas” que consiste en que los picos no aumentan tanto su altura como su anchura lo que redundaría en una pérdida de resolución y de eficacia (figura 26).

Figura 26. Efecto del tiempo de inyección sobre la resolución (a) y la eficacia (b). Concentraciones: 10 $\mu\text{g/mL}$ PMH y 40 $\mu\text{g/mL}$ PTH.



Aunque en CE con otros sistemas de detección como UV-Vis es más habitual trabajar con áreas porque conducen a rangos lineales en la función de calibrado más amplios, en CL es más habitual trabajar con alturas. En este trabajo la respuesta utilizada fue la altura.

B) Inyección electrocinética: se fijó el voltaje a 5 kV y se fue variando el tiempo de aplicación desde 5 a 60 s. La selección del voltaje de inyección a 5 kV se hizo teniendo en cuenta que voltajes más elevados podían ocasionar la formación de los sulfóxidos de las fenotiazinas puesto que el vial de muestra se colocaba en el ánodo. Se observó que el aumento del tiempo de inyección originaba inestabilidad en la línea base y el consiguiente aumento del ruido, por lo que para su optimización se seleccionó como respuesta la relación señal/ruido. En este caso, el disolvente de la muestra, que hasta ahora venía siendo agua Milli-Q, fue sustituido por una mezcla metanol:agua (1:1 v/v) con 32 μM de H_3PO_4 . El metanol se añadió con el objetivo de que fuese más fácil recomponer la muestra tras el secado con N_2 que se realizaría en la extracción en fase sólida al tratar muestras reales. El ácido fosfórico se añadió para asegurar que las fenotiazinas se encontraban cargadas positivamente, lo que resulta necesario de cara a la inyección electrocinética. En la figura 27 se muestra el resultado obtenido.

Figura 27. Optimización de la inyección electrocinética. Muestra: 0'4 $\mu\text{g/mL}$ de PTH.

Por tanto, la inyección electrocinética se llevaría a cabo aplicando 5 kV durante 30 s.

5.4. Optimización de las variables que afectan a la detección quimioluminiscente.

La detección CL se afecta por tres parámetros principalmente que son las concentraciones de luminol, NaOH y $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Se llevó a cabo una optimización multivariante mediante el empleo de un diseño Doehlert que se caracteriza por su alta eficacia, es decir, es capaz de ajustar una función de superficie de respuesta a los datos experimentales empleando para ello un número relativamente bajo de experiencias. Esta metodología permite igualmente considerar las posibles interacciones entre las variables en estudio. La región experimental se eligió en función de pruebas previas y de los valores habitualmente utilizados en bibliografía. Una de las ventajas de los diseños Doehlert es que permiten seleccionar el número de niveles a los que queremos estudiar cada factor. Es habitual asignar un mayor número de niveles a aquellos factores que son más significativos para así obtener un conocimiento más preciso del sistema, o bien, asignar un menor número de niveles a aquellos factores que son más difíciles de modificar. Como el luminol va disuelto en el tampón, y cambiar de tampón implica acondicionar el capilar de nuevo, este factor sólo se estudió a tres niveles. De los dos factores restantes, la $[\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]]$ se estudió a 7 niveles porque parecía más significativa que la $[\text{NaOH}]$ que se estudió a 5. En la tabla 5 se muestran los valores de los niveles seleccionados para cada factor estudiado. El resto de las variables se fijaron a los valores de los óptimos obtenidos en el estudio anterior.

Tabla 5. Factores y niveles empleados en el primer diseño Doehlert.

Variable	Nivel mínimo (-1)	Nivel máximo (+1)
(A)[NaOH] (N)	0'005	0'2
(B)[Ferricianuro] (mM)	0'05	3
(C)[Luminol] (mM)	0'1	5

Se hicieron tres réplicas del punto central distribuidas espaciadamente para asegurar que se tenía en cuenta la variabilidad temporal del sistema. El número total de experiencias en un diseño Doehlert viene determinado por la fórmula: $N = 2^k + 2k + C_0$, donde k es el número de variables y C_0 es el número de puntos centrales. Los valores reales así como los codificados (entre paréntesis) se muestran en la tabla 6.

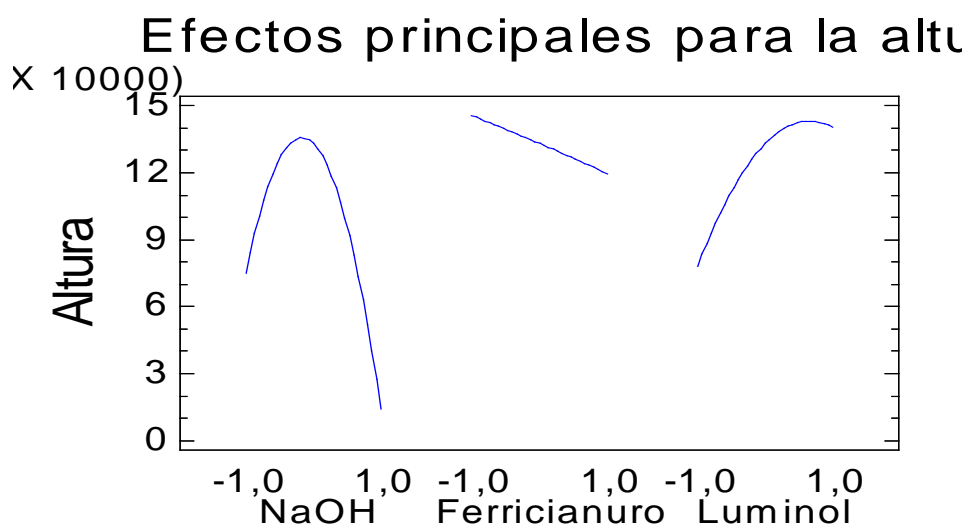
Tabla 6. Matriz del primer diseño Doehlert.

Experiencia	NaOH (moles/L)	$K_3[Fe(CN)_6]$ ($10^3 \cdot$ moles/L)	Luminol ($10^3 \cdot$ moles/L)
1	0,103 (0)	1,525 (0)	2,550 (0)
2	0,200 (1)	1,525 (0)	2,550 (0)
3	0,151 (0'5)	2,802 (0'866)	2,550 (0)
4	0,151 (0'5)	1,951 (0'289)	4,552 (0'817)
5	0,005 (-1)	1,525 (0)	2,550 (0)
6	0,054 (-0'5)	0,248 (-0.866)	2,550 (0)
7	0,054 (-0.5)	1,099 (-0.289)	0,548 (-0.817)
8	0,103 (0)	1,525 (0)	2,550 (0)
9	0,151 (0.5)	0,248 (-0.866)	2,550 (0)
10	0,151 (0.5)	1,099 (-0.289)	0,548 (-0.817)
11	0,054 (-0.5)	2,802 (0.866)	2,550 (0)
12	0,103 (0)	2,376 (0.577)	0,548 (-0.817)
13	0,054 (-0.5)	1,951 (0.289)	4,552 (0.817)
14	0,103 (0)	0,674 (-0.577)	4,552 (0.817)
15	0,103 (0)	1,525 (0)	2,550 (0)

Por condiciones óptimas entendemos aquellas que nos permitan obtener la mayor sensibilidad. Como la que menos emisión CL presenta es la PTH será en ésta en la que

nos centraremos para optimizar la sensibilidad. En principio podemos elegir como respuesta tanto la altura como la relación señal/ruido. Aunque en bibliografía es bastante habitual elegir la altura en nuestro caso sería preferible elegir la relación señal/ruido puesto que el ruido varía mucho de unas condiciones a otras. Si el ruido fuese constante daría igual elegir la altura o la relación señal/ruido. De hecho, tras realizar el diseño vemos que las condiciones del óptimo si optamos por optimizar la altura son totalmente diferentes de las que tendríamos si optáramos por optimizar la relación señal/ruido. La figura 28 muestra los efectos principales que se obtienen para la optimización de la altura.

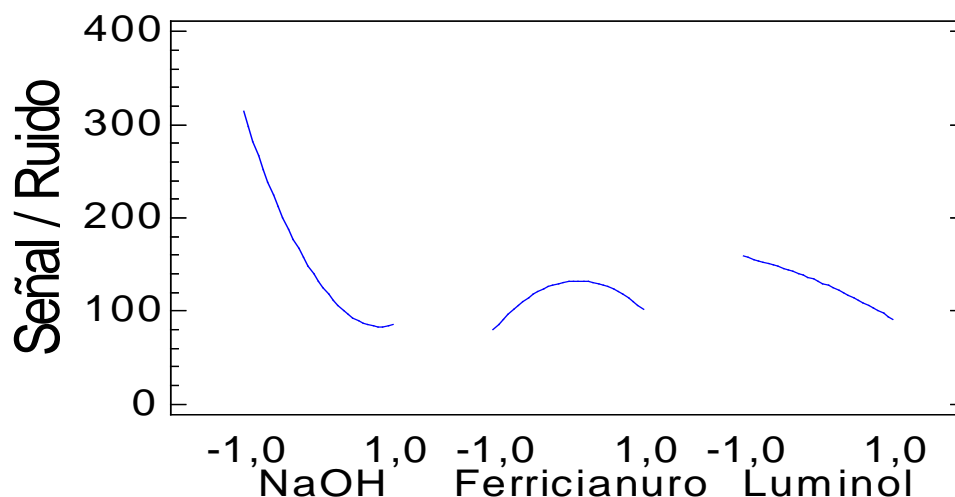
Figura 28. Efectos de la concentración de NaOH, ferricianuro y luminol sobre la altura de pico de PTH obtenidos mediante la aplicación del diseño Doehlert. Concentración de PTH: 40 $\mu\text{g/mL}$.



En cambio la que se obtiene para la relación señal/ruido es la siguiente (figura 29).

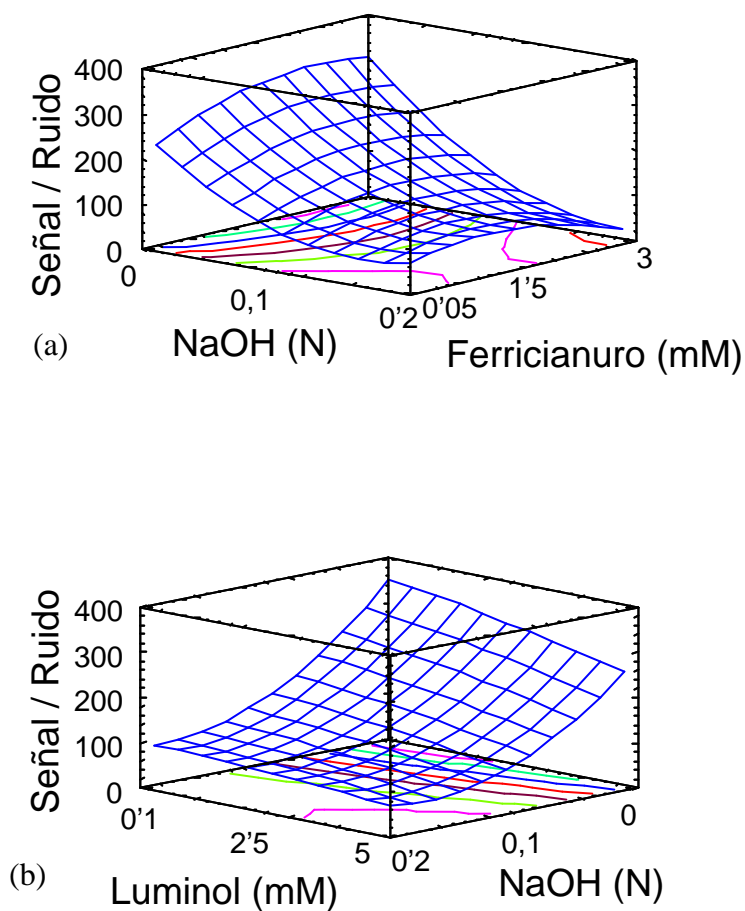
Figura 29. Efectos de la concentración de NaOH, ferricianuro y luminol sobre la relación señal/ruido para el pico de PTH, obtenidos mediante la aplicación del diseño Doehlert. Concentración de PTH: 40 $\mu\text{g/mL}$.

Efectos principales para la relación Señal / Ruido



Si lo que pretendemos es maximizar la altura tendríamos un máximo en torno a 0,05 N de NaOH pero si lo que queremos es maximizar la relación señal/ruido deberíamos disminuir la concentración de NaOH. En el caso del ferricianuro deberíamos aumentar su concentración para mejorar la relación señal/ruido pero disminuirla para aumentar la altura y justo lo contrario sucede con el luminol. Como lo que nos interesa es mejorar los límites de detección decidimos optimizar la relación señal/ruido en vez de la altura de pico, puesto que el ruido no es constante para todas las condiciones. En las figuras 30a y 30b observamos que no estamos en una región experimental óptima para alcanzar la máxima relación señal/ruido, por lo que era necesario plantear un nuevo diseño cuyo dominio experimental fuese más reducido para acercarnos más al óptimo.

Figura 30. Superficies de respuesta del primer diseño Doehlert.



La ecuación de la superficie de respuesta obtenida fue: $\text{Señal/Ruido} = 131,7 - 114,6 \cdot A + 11,0 \cdot B - 33,7 \cdot C + 67,8 \cdot A^2 - 29,5 \cdot A \cdot B + 17,8 \cdot A \cdot C - 41,21 \cdot B^2 - 42,7 \cdot B \cdot C - 6,9 \cdot C^2$

Los intervalos del segundo diseño Doehlert se recogen en la tabla 7.

Tabla 7. Factores y niveles empleados en el segundo diseño Doehlert.

Variable	Nivel mínimo (-1)	Nivel máximo (+1)
(A)[Luminol] (mM)	0,01	2
(B)[NaOH] (N)	0,0	0,1
(C)[Ferricianuro] (mM)	0,0	3

Los valores reales así como los codificados (entre paréntesis) se muestran en la tabla 8. Teniendo en cuenta la significación de los factores principales en el primer

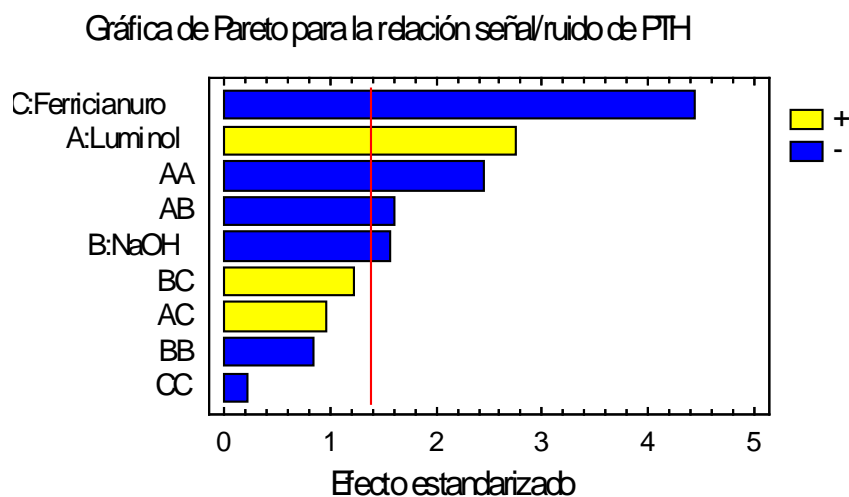
diseño Doehlert, el efecto de la concentración de ferricianuro se estudiaría a tres niveles, el del luminol a cinco y el de la NaOH a siete.

Tabla 8. Matriz del segundo diseño Doehlert.

Experiencia	Luminol (10 ³ ·moles/L)	NaOH (moles/L)	K ₃ [Fe(CN) ₆] (10 ³ ·moles/L)
1	1'005 (0)	0'05 (0)	1'5 (0)
2	2'000 (1)	0'05 (0)	1'5 (0)
3	1'5025(0'5)	0'0933(0'866)	1'5 (0)
4	1'5025(0'5)	0'06445(0'289)	2'7255(0'817)
5	0'010 (-1)	0'05 (0)	1'5 (0)
6	0'5075(-0'5)	0'0067(-0.866)	1'5 (0)
7	0'5075(-0.5)	0'03555(-0.289)	0'2745(-0.817)
8	1'005 (0)	0'05 (0)	1'5 (0)
9	1'5075(0.5)	0'0067(-0.866)	1'5 (0)
10	1'5075(0.5)	0'03555(-0.289)	0'2745(-0.817)
11	0'5075(-0.5)	0'0933 (0.866)	1'5 (0)
12	1'005 (0)	0'07885 (0.577)	0'2745(-0.817)
13	0'5075(-0.5)	0'06445 (0.289)	2'7255 (0.817)
14	1'005 (0)	0'02115(-0.577)	2'7255 (0.817)
15	1'005 (0)	0'05 (0)	1'5 (0)

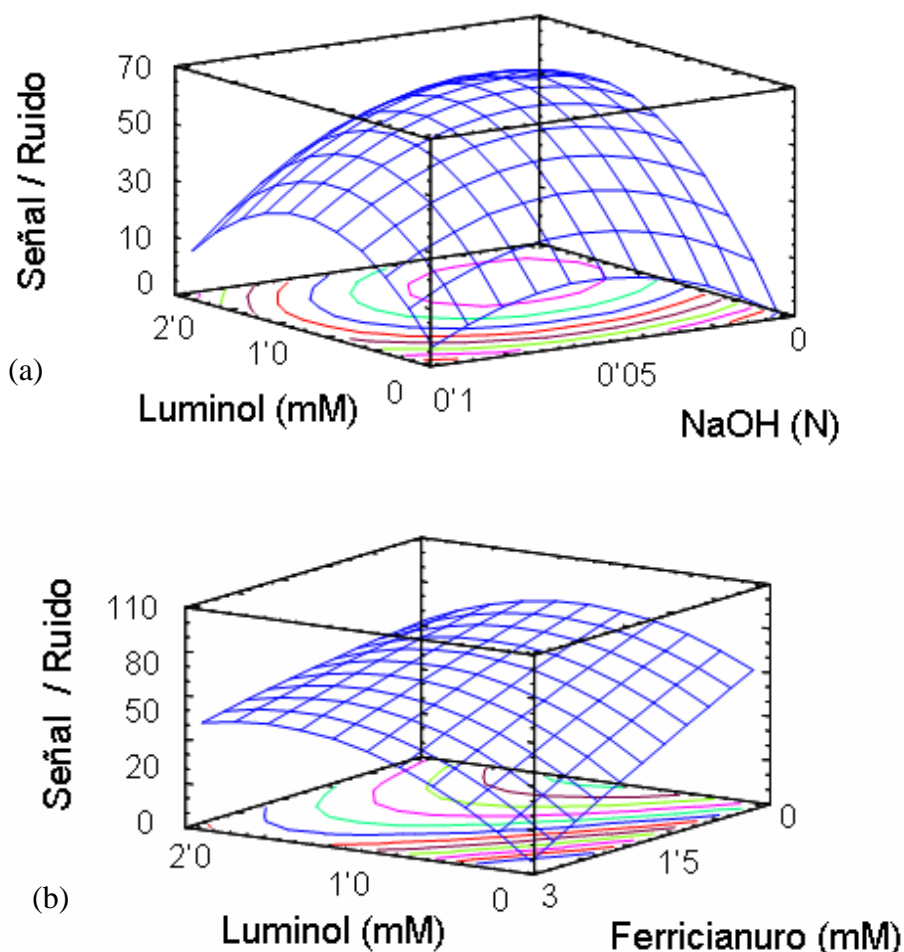
Como puede observarse en el gráfico de Pareto estandarizado (figura 31) los tres factores principales son estadísticamente significativos con una probabilidad del 95 %. Además se encontró que la interacción luminol-NaOH era significativa.

Figura 31. Gráfico de Pareto estandarizado mostrando los efectos de las variables instrumentales y de sus interacciones sobre la relación señal/ruido en el segundo diseño Doehlert. Concentración de PTH: 4 µg/mL.



Aunque en principio parece que deberíamos reducir la concentración de $K_3[Fe(CN)_6]$, cuando hacemos una optimización univariante de este parámetro vemos que el óptimo es 0'25 mM que es bastante próximo al óptimo del diseño 0'27 mM. Las superficies de respuesta obtenidas se muestran en las figuras 32a y 32b.

Figura 32. Superficies de respuesta del segundo diseño Doehlert.



Las variables estudiadas se ajustan a una ecuación cuadrática del tipo:

$$\text{Señal/Ruido} = 56,3 + 17,1 \cdot A - 9,7 \cdot B - 27,5 \cdot C - 27,8 \cdot A^2 - 12,1 \cdot A \cdot B + 15,3 \cdot A \cdot C - 18,2 \cdot B^2 + 19,7 \cdot B \cdot C - 2,3 \cdot C^2.$$

El modelo muestra un R^2 de un 83 % y un valor P para el test de fallo de ajuste de 0'33, lo que indica la bondad del ajuste de los datos experimentales al modelo. Los valores óptimos según este diseño se recogen en la tabla 9.

Tabla 9. Valores óptimos obtenidos mediante la aplicación del segundo diseño Doehlert.

Variable	Óptimo
[Luminol] (mM)	1'25
[NaOH] (N)	0'01
[Ferricianuro] (mM)	0'27

Con los resultados obtenidos consideramos optimizada la relación señal/ruido. Es de esperar un óptimo para cada variable en la región estudiada. Concentraciones bajas de luminol, NaOH o $K_3[Fe(CN)_6]$ dan lugar a bajas señales, puesto que son necesarios para la reacción. Concentraciones altas de $K_3[Fe(CN)_6]$ producen autoabsorción de la luz emitida produciendo una disminución en la señal. El mismo efecto tiene una alta concentración de NaOH pero en este caso es debido a la precipitación de las fenotiazinas en medios tan alcalinos. En cambio una alta concentración de luminol lo que produce es un aumento en el ruido al tener una línea base más alta, además entra en competencia con las fenotiazinas para ser oxidado por el $K_3[Fe(CN)_6]$.

5.5. Resumen de las variables optimizadas para la determinación de PMH y PTH mediante CE-CL.

En la tabla 10 se recogen los valores óptimos para la determinación de PMH y PTH mediante CE-CL.

Tabla 10. Resumen de los valores seleccionados para cada variable estudiada.

Naturaleza del tampón de separación	Borato
pH del tampón	8'5
Concentración de tampón	20 mM
Voltaje de separación	15 kV
Altura del reactivo	30 cm
Inyección hidrostática	15 s a 20 cm
Inyección electrocinética	30 s a 5 kV
[Luminol]	1'25 mM
[NaOH]	0'01 N
[$K_3[Fe(CN)_6]$]	0'27 mM

5.6. Robustez de las variables que afectan a la detección CL.

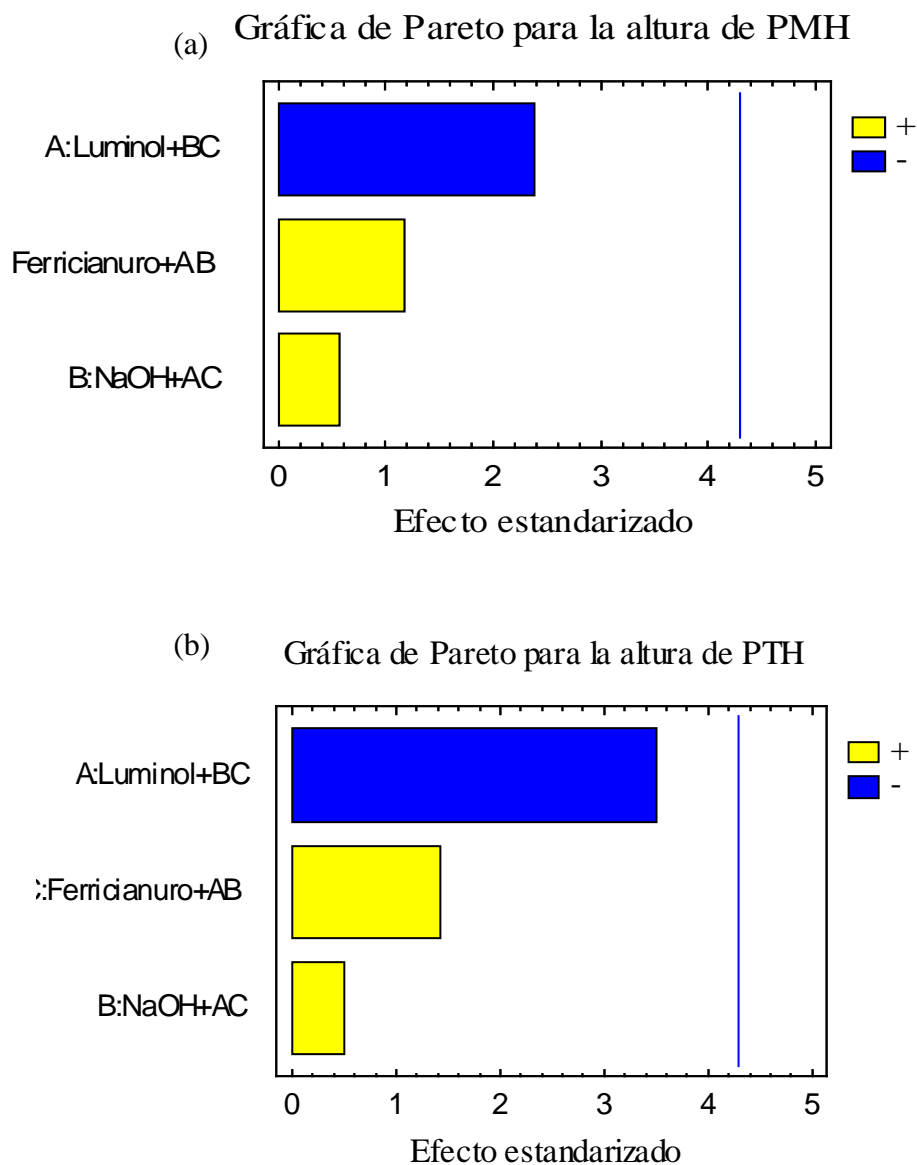
Se realizó un estudio con objeto de evaluar si la optimización realizada del sistema CE-CL para determinar PMH y PTH proporcionaba un método robusto frente a pequeñas variaciones de los parámetros que en ella influyen. Para ello se estudió el efecto de variar un 10 % las concentraciones de luminol, NaOH y ferricianuro sobre el valor óptimo. Para evaluar la robustez hay que comprobar que el resultado de variar un 10 % los parámetros elegidos no es significativo en la variación que se produce en la respuesta, o lo que es lo mismo que la variación que se produce es menor que la propia del sistema. Para evaluar el efecto de modificar los parámetros entorno a un 10 % se empleó un diseño saturado a la media fracción: 2^{3-1} que conllevaba 4 experiencias. Para evaluar la variación propia del sistema se realizaron tres réplicas del punto central de dicho diseño lo que hizo un total de 7 experiencias. La muestra consistía siempre en una mezcla de 0'75 $\mu\text{g/mL}$ de PMH y 3'0 $\mu\text{g/mL}$ de PTH. La matriz del diseño se indica en la tabla 11.

Tabla 11. Matriz del diseño 2^{3-1} empleado para evaluar la robustez del método.

Luminol mM	NaOH N	Ferricianuro mM
1'25 (0)	0'01(0)	1'27 (0)
1'125 (-1)	0'009 (-1)	1'297 (1)
1'375 (1)	0'009 (-1)	1'243 (-1)
1'25 (0)	0'01 (0)	1'27 (0)
1'125 (-1)	0'011 (1)	1'243 (-1)
1'375 (1)	0'011 (1)	1'297 (1)
1'25 (0)	0'01 (0)	1'27 (0)

En las gráficas de Pareto (figura 33a y 33b) se compara el efecto estandarizado de cada una de las variables con el efecto estandarizado calculado a partir de réplicas del punto central.

Figura 33. Gráficas de Pareto para evaluar la robustez del método en la determinación de PMH (a) y PTH (b).



Las gráficas de Pareto obtenidas demuestran que el método es robusto frente a variaciones de un 10 % en las concentraciones de luminol, NaOH y ferricianuro potásico, tanto para la determinación de PMH como de PTH. Se deduce también de dichas gráficas que el parámetro más crítico era la concentración de luminol y el que menos la concentración de NaOH.

6. RECTAS DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD.

6.1. Rectas de calibrado de PMH y PTH. Inyección por gravedad.

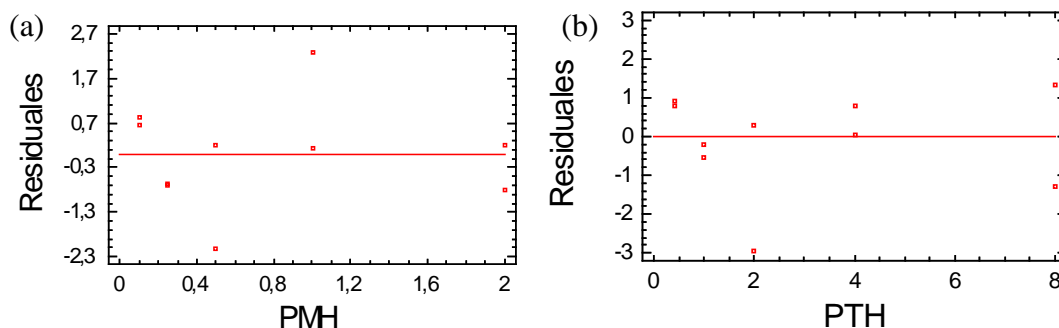
El objetivo es establecer una recta de calibrado que nos permita cuantificar PMH y PTH en preparados farmacéuticos, utilizando la inyección de los patrones por gravedad. Bajo las condiciones óptimas se prepararon patrones de PMH y PTH a seis niveles de concentración, que se inyectaron por duplicado: desde 0,1 a 5,0 µg/mL para PMH y desde 0,4 a 20 µg/mL para PTH. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. *Valores obtenidos para la recta de calibrado.*

PMH, µg/mL	Altura	PTH, µg/mL	Altura
0,1	592	0,4	413
0,1	653	0,4	428
0,25	1267	1	845
0,25	1251	1	901
0,5	2797	2	1684
0,5	3555	2	2088
1	7427	4	4231
1	8077	4	4360
2	15235	8	8773
2	14917	8	8433
5	31083	20	19107
5	31376	20	19178

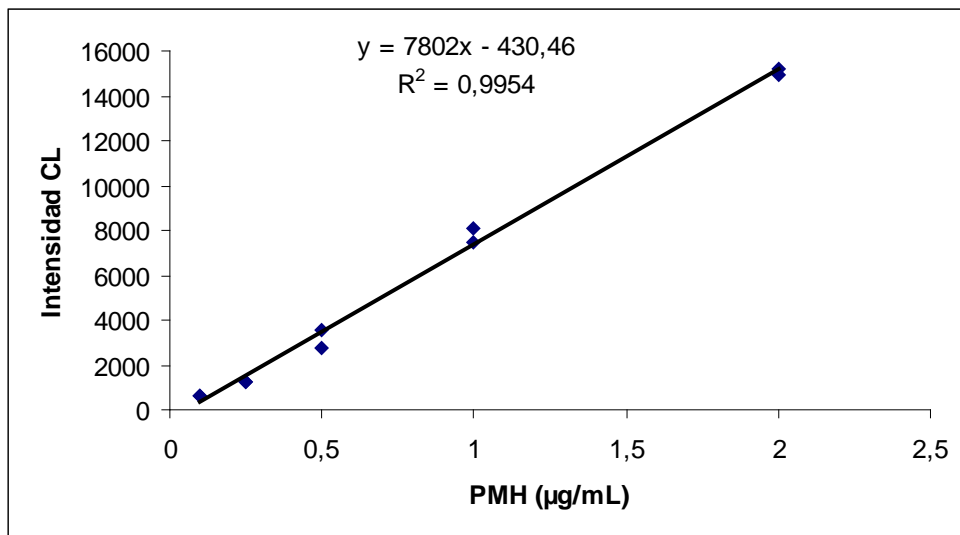
El último punto del calibrado fue eliminado debido a que aparecía curvatura. Los gráficos de residuales obtenidos se muestran en la figuras 34a y 34b.

Figura 34. *Residuales de los calibrados para PMH y PTH.*



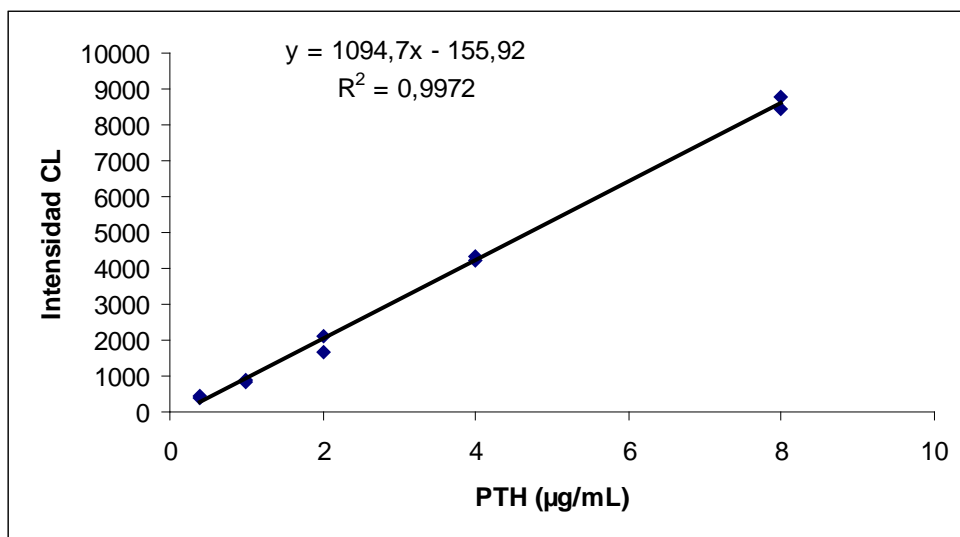
La distribución aleatoria de los residuales a ambos lados del valor teórico predicho indica que el modelo lineal es adecuado para explicar los datos experimentales, mostrando en ambos casos valores del coeficiente de determinación, R^2 , satisfactorios. Las curvas de calibrado obtenidas se muestran en las figuras 35 y 36.

Figura 35. Recta de calibrado para la PMH con inyección por gravedad.



$$\text{Intensidad quimioluminiscente} = -430'46 + 7802 \cdot \text{PMH}(\mu\text{g/mL})$$

Figura 36. Recta de calibrado para la PTH con inyección por gravedad.



$$\text{Intensidad quimioluminiscente} = -155'92 + 1094'7 \cdot \text{PTH}(\mu\text{g/mL})$$

Los parámetros de calidad del método se recogen en la tabla 13.

Tabla 13. *Parámetros de calidad del método.*

	Promazina	Prometazina
Ordenada	-430'5 u.c.	-155'9 u.c.
Pendiente	7802'0 u.c./ppm	1094'7 u.c./ppm
D. E. ordenada	192'9 u.c.	84'1 u.c.
D. E. pendiente	186'9 u.c./ppm	20'4 u.c./ppm
D. E. regresión	405'9 u.c./ppm	177'0 u.c./ppm
R ²	99'5 %	99'7 %
Fallo de ajuste (P)	19 %	42 %
Lim. detección ^a	0'080 ppm	0'334 ppm
Lim. cuantificación ^b	0'145 ppm	0'782 ppm
Lím. superior	2 ppm	8 ppm
Resolución analítica	0'052 u.c./ppm	0'162 u.c./ppm
Linealidad	97'6 %	98'1 %

D.E. = Desviación estándar.

u.c. = unidades arbitrarias de quimioluminiscencia.

a = calculado como tres veces la relación señal/ruido.

b = calculado como diez veces la relación señal/ruido.

▪ **Calibrado para la PTH con patrón interno.**

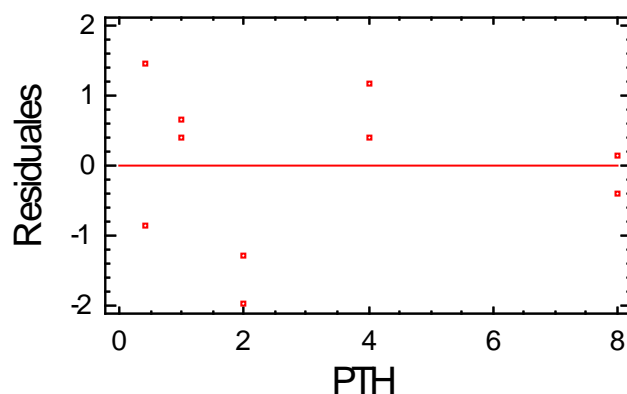
Se hizo un nuevo calibrado para la PTH pero utilizando la PMH como patrón interno. En este caso, la concentración de PMH era constante (0'5 µg/mL) mientras que se variaba la concentración de PTH (de 0'4 a 20 µg/mL). La respuesta utilizada fue el cociente de la altura (o intensidad quimioluminiscente) de la PTH entre el correspondiente para la PMH. En la tabla 14 se exponen los resultados obtenidos.

Tabla 14. *Valores obtenidos para la calibración con patrón interno.*

PTH, µg/mL	Altura relativa
0,4	0,135
0,4	0,192
1	0,331
1	0,338
2	0,558
2	0,546
4	1,164
4	1,145
8	2,208
8	2,221
20	5,029
20	4,959

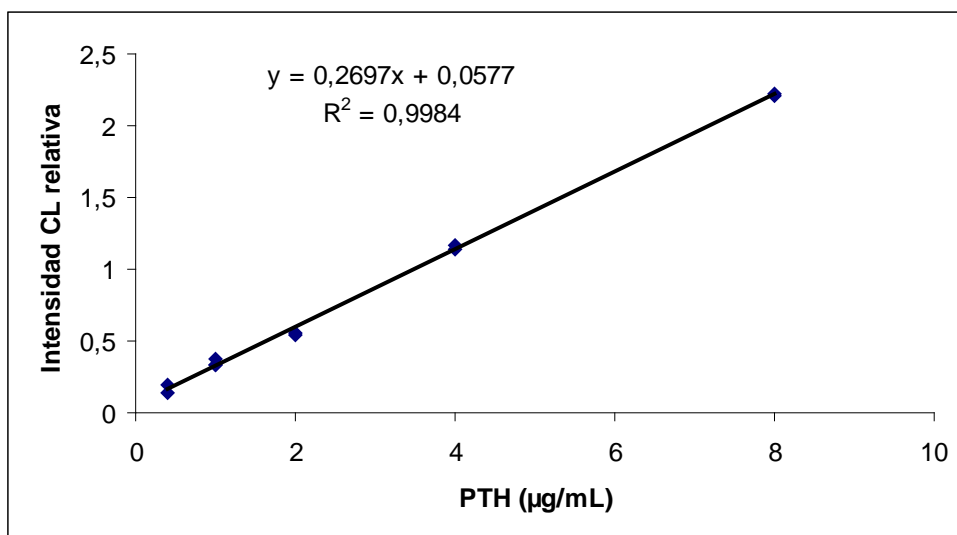
El último punto del calibrado fue eliminado debido a que aparecía curvatura. El gráfico de residuales se muestra en las figura 37.

Figura 37. Gráfico de residuales para un calibrado con patrón interno.



La distribución aleatoria de los residuales indica la conveniencia del modelo lineal. La curva de calibrado se muestra en la figura 38.

Figura 38. Recta de calibrado para la PTH empleando la PMH como patrón interno.



$$\text{Intensidad quimioluminiscente relativa} = 0,0577 + 0,2697 \cdot \text{PTH}(\mu\text{g/mL})$$

En la tabla 15 comparamos el calibrado para la PTH, sin estándar interno, con el calibrado empleando la PMH como patrón interno.

Tabla 15. Comparación numérica entre un calibrado para PTH sin patrón interno y otro con patrón interno.

	PTH sin patrón interno	PTH con patrón interno
Ordenada	-155'9 u.c.	0'0577 u.c.
Pendiente	1094'7 u.c./ppm	0'2697 u.c./ppm
D. E. ordenada	84'1 u.c.	0'0141 u.c.
D. E. pendiente	20'4 u.c./ppm	0'0035 u.c./ppm
D. E. regresión	177'0 u.c./ppm	0'0318 u.c./ppm
R ²	99'7 %	99'8 %
Fallo de ajuste (P)	42 %	7 %
Lim. detección ^a	0'334 ppm	0'040 ppm
Lim. cuantificación ^b	0'782 ppm	0'632 ppm
Lím. superior	8 ppm	8 ppm
Resolución analítica	0'162 u.c./ppm	0'118 u.c./ppm
Linealidad	98'1 %	98'7 %

D.E. = Desviación estándar.

u.c. = unidades arbitrarias de quimioluminiscencia.

a = calculado como tres veces la relación señal/ruido.

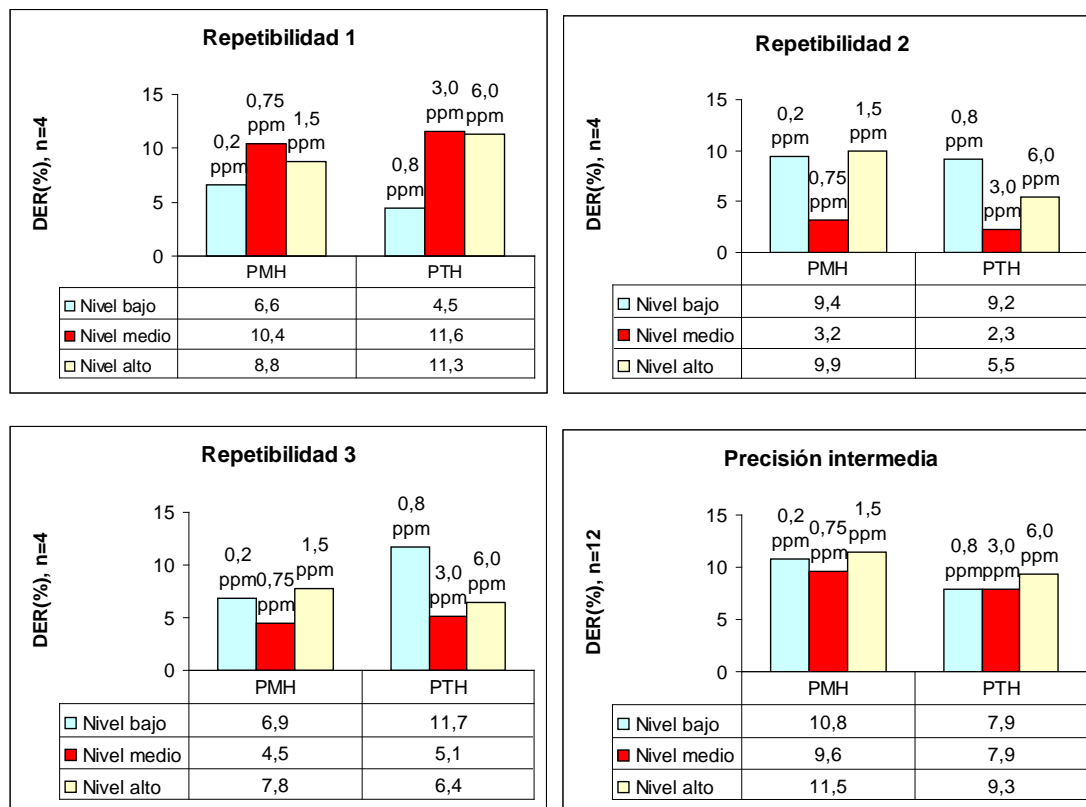
b = calculado como diez veces la relación señal/ruido.

Se observa que los parámetros de calidad del método mejoran al emplear un patrón interno.

6.2 Repetibilidad y precisión intermedia con inyección por gravedad.

El objetivo es poder determinar la repetibilidad y la precisión intermedia, a través de las desviaciones estándar relativas (DER), de los dos analitos en patrones a tres niveles de concentración, que se corresponden con un nivel bajo (0'2 µg/mL PMH y 0'8 µg/mL para PTH), uno medio (0'75 y 3'0 µg/mL respectivamente) y otro alto del calibrado (1'5 y 6 µg/mL). La repetibilidad se evaluó mediante la determinación por duplicado de dos muestras por nivel. La precisión intermedia se evaluó repitiendo el mismo proceso que para la repetibilidad durante tres días. El primer día del estudio de precisión intermedia fue empleado para evaluar la repetibilidad. La respuesta utilizada fue la altura de pico tanto para la PMH como para la PTH. Los resultados para la repetibilidad a lo largo de diferentes días y para la precisión intermedia se muestran en la figura 39.

Figura 39. Repetibilidad de los diferentes días y precisión intermedia expresadas como desviaciones estándar relativas (DER).



En virtud de los resultados obtenidos puede concluirse que el método ofrece una adecuada precisión tanto si nos referimos a la variabilidad propia de un día como si además tenemos en cuenta la variabilidad causada al medir en diferentes días. En todos los casos y para cualquiera de los analitos, la DER es inferior al 12 %.

6.3. Recta de calibrado de PMH. Inyección electrocinética.

Este calibrado se establece con el objetivo de determinar PMH en orina. Debido a que con la inyección por gravedad no se obtienen límites de detección lo suficientemente bajos como para que el método sea útil de cara a la determinación y cuantificación en orina, se decidió emplear la inyección electrocinética previamente optimizada. Igualmente se decidió comprobar la conveniencia del empleo de patrón interno. Debido a la posible influencia de la matriz se decidió establecer el calibrado en presencia de ésta. El procedimiento consistió en preparar una disolución madre de 1 µg/mL de PMH y a partir de ella dopar muestras de orina con las siguientes concentraciones: 5, 10, 15, 20 y 25 ng/mL. Se sometieron al procedimiento de tratamiento de muestra descrito para la orina en el que la PTH se añadía en una concentración de 1 µg/mL con la disolución de

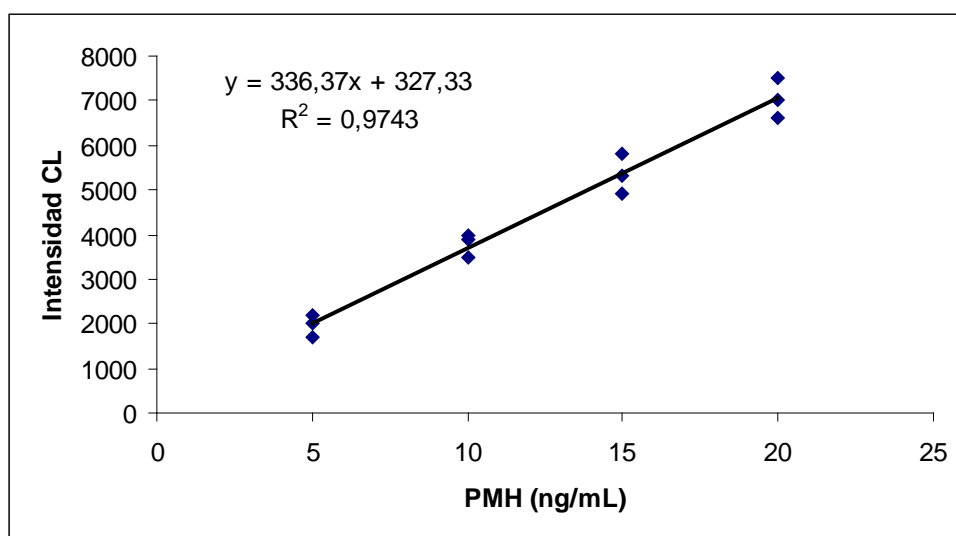
recomposición del extracto seco, compuesta por MeOH:H₂O (1:1 v/v) con 32 μM de H₃PO₄. Cada nivel se inyectó por triplicado obteniéndose los resultados expresados en la tabla 16.

Tabla 16. Resultado del calibrado para PMH con inyección electrocinética.

PMH, ng/mL	Altura	Altura relativa
5	2174	0,841
5	2017	0,736
5	1692	0,699
10	3475	1,519
10	3960	1,586
10	3887	1,563
15	5815	2,257
15	4899	2,210
15	5340	2,271
20	7509	3,049
20	7011	2,968
20	6604	2,965
25	11585	3,220
25	10927	3,501
25	9902	3,635

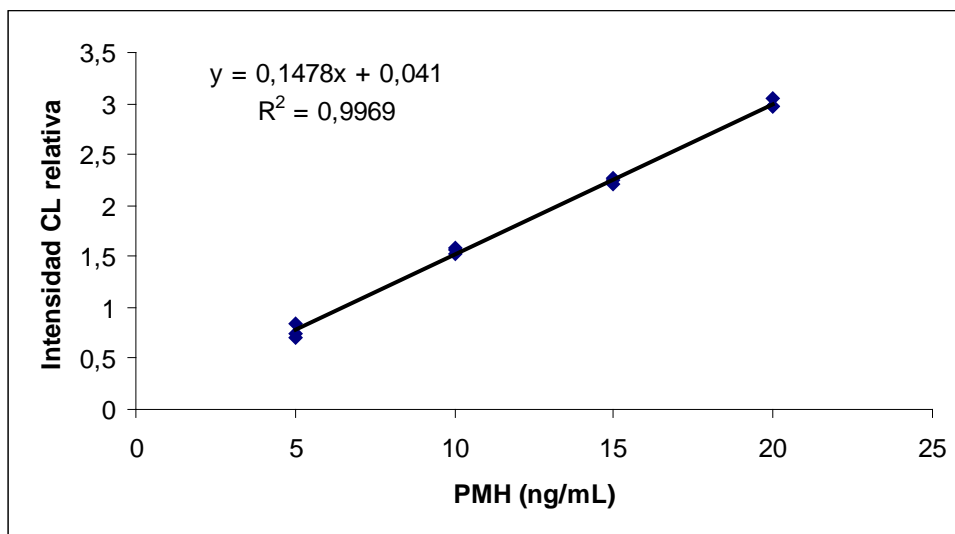
Tanto en el calibrado sin patrón interno (figura 40) como el llevado a cabo con él (figura 41) hubo que eliminar el último nivel de concentración porque aparecía curvatura.

Figura 40. Recta de calibrado para PMH con inyección electrocinética sin patrón interno.



$$\text{Intensidad quimioluminiscente} = 327'33 + 336'373 \cdot \text{PMH (ng/mL)}$$

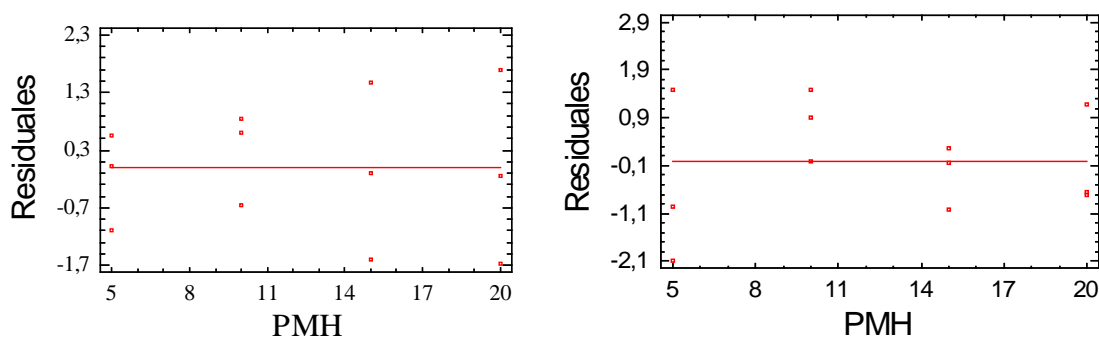
Figura 41. Recta de calibrado para PMH con inyección electrocinética y con PTH como patrón interno.



$$\text{Intensidad quimioluminiscente relativa} = 0,041 + 0,1478 \cdot \text{PMH (ng/mL)}$$

Los gráficos de los residuales se muestran en la figura 42.

Figura 42. Gráfico de residuales para un calibrado sin patrón interno (a) para otro calibrado con patrón interno (b).



a) Sin patrón interno.

b) Con patrón interno.

En la tabla 17 se comparan numéricamente los dos calibrados.

Tabla 17. Comparación numérica entre un calibrado para PMH sin patrón interno y otro con patrón interno.

	Sin patrón interno	Con patrón interno
Ordenada	327'33 u.c.	0'041 u.c.
Pendiente	336'37 u.c./ppb	0'1478 u.c./ppb
D. E. ordenada	236'4 u.c.	0'0354 u.c.
D. E. pendiente	17'3 u.c./ppb	0'0026 u.c./ppb
D. E. regresión	334'3 u.c./ppb	0'050 u.c./ppb
R ²	97'4 %	99'7 %
Fallo de ajuste (P %)	89'8 %	32'9 %
Lim. detección ^a	0'166 ppb	0'950 ppb
Lim. cuantificación ^b	2'65 ppb	3'81 ppb
Lím. superior	20 ppb	20 ppb
Resolución analítica	0'994 u.c./ppb	0'339 u.c./ppb
Linealidad	94'9 %	98'2 %

D.E. = Desviación estándar.

u.c. = unidades arbitrarias de quimioluminiscencia.

a = calculado como tres veces la relación señal/ruido.

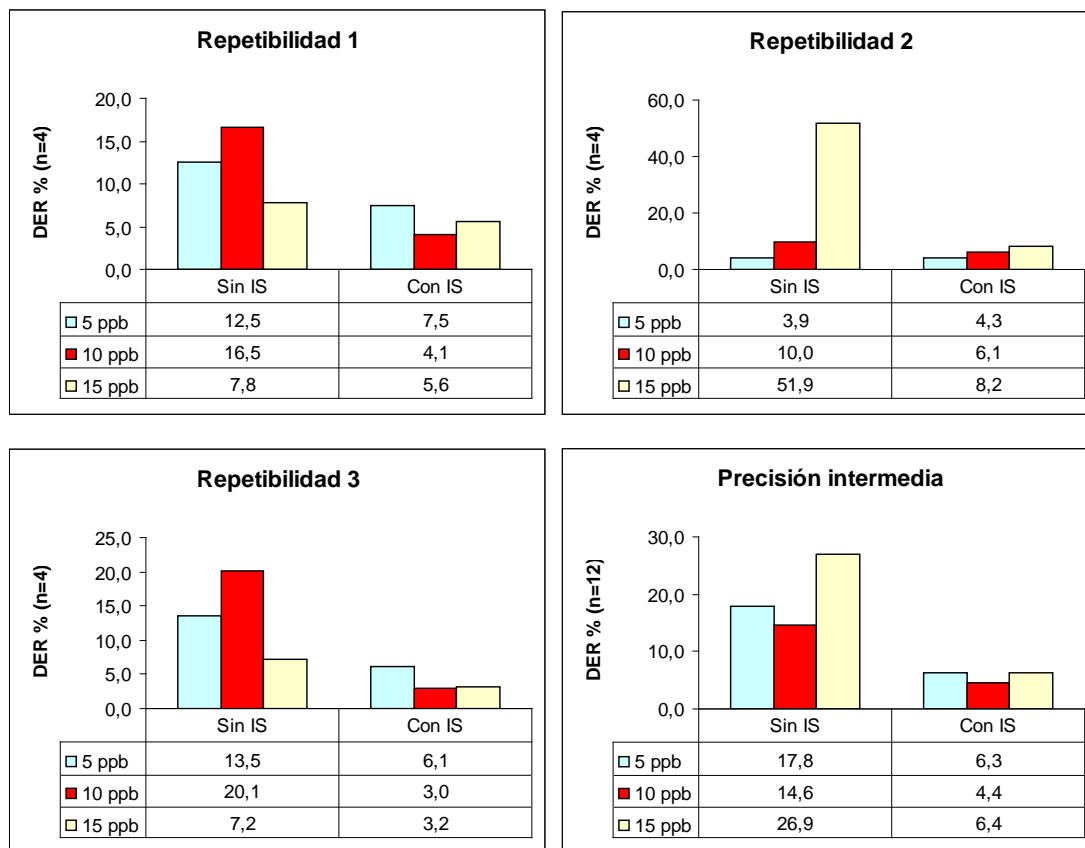
b = calculado como diez veces la relación señal/ruido.

Al emplear el patrón interno en el calibrado obtenemos una mayor precisión en las medidas lo que se traduce en una mejora en la linealidad.

6.4. Repetibilidad y precisión intermedia con inyección electrocinética.

El objetivo es poder determinar la repetibilidad y la precisión intermedia, a través de las desviaciones estándar relativas (DER), en la determinación de PMH cuando se realiza la inyección electrocinética a tres niveles de concentración que se corresponden con 5, 10 y 15 ng/mL. La repetibilidad se evaluó mediante la determinación por cuadruplicado de una muestra por nivel. La precisión intermedia se evaluó repitiendo el mismo proceso que para la repetibilidad durante tres días. Se pretende también poner de manifiesto la conveniencia de emplear un patrón interno (PTH) para mejorar la precisión del método. Los resultados se muestran en la figura 43.

Figura 43. Repetibilidad de los diferentes días y precisión intermedia para PMH, expresadas como desviaciones estándar relativas (DER).



Con los resultados obtenidos podemos afirmar que el método no sería válido si empleásemos la inyección electrocinética sin patrón interno porque la DER podría ser de hasta un 52 %, pero con el patrón interno el método es totalmente preciso puesto que la máxima DER obtenida es de un 8'2 %.

7. APLICACIONES ANALÍTICAS

7.1. Aplicación del método al control de calidad de preparados farmacéuticos.

Para demostrar la utilidad del método al análisis de fármacos se realizó la determinación de PTH en diversos preparados empleando en todos los casos PMH como estándar interno a una concentración de 0,5 µg/mL:

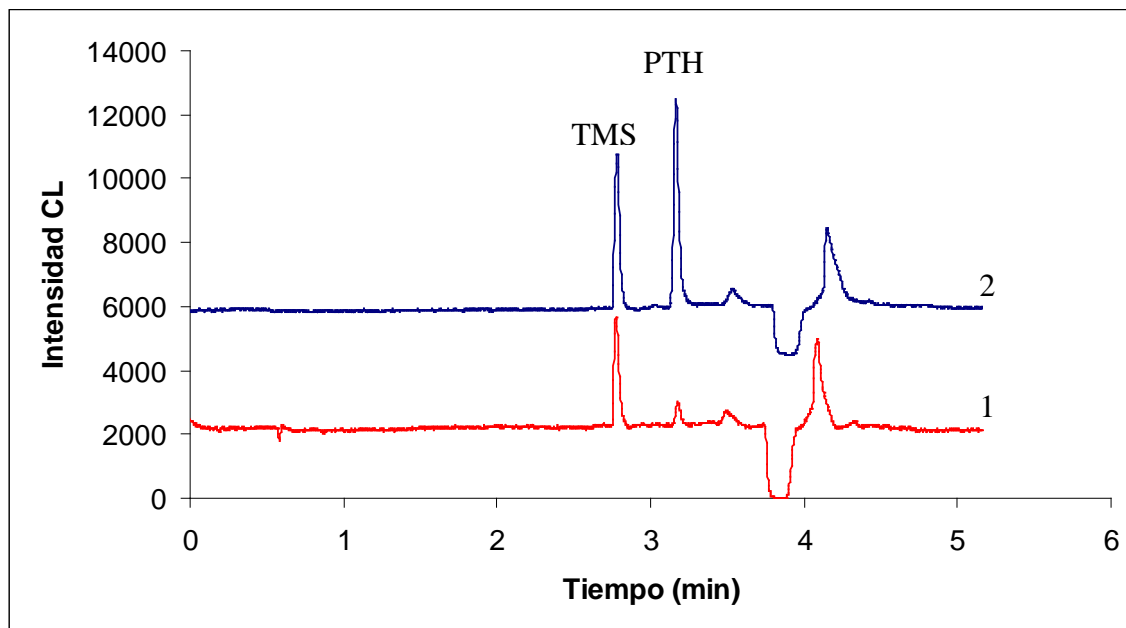
- Determinación de PTH como principio activo en el jarabe Actithiol Antihistamínico: únicamente hubo que diluir 60 µL del mismo en 10 mL de la disolución de PMH. Se prepararon dos disoluciones del mismo jarabe y cada una fue inyectada por triplicado.

- Determinación de PTH como principio activo en grageas Frinova: se homogeneizaron varias grageas en un mortero y posteriormente se tomó la masa equivalente a 1 gragea (150 mg) y se añadieron 75 mL aproximadamente de agua Milli-Q. Tras sonicar 15 min. se filtró a través de un papel de filtro y se completó el enrase hasta 100 mL. Con objeto de que la concentración de PTH quedara en la parte media del calibrado (3 µg/mL) hubo que pipetear 120 µL de la disolución anterior y diluir hasta 10 mL con disolución de patrón interno. Se repitió el proceso para tres porciones distintas que fueron inyectadas por triplicado.

- Determinación de PTH como impureza en ampollas de metilsulfato de thiazinamium (TMS): en este caso sólo hubo que pipetear 615 µL de la ampolla y diluir hasta 10 mL con la disolución de patrón interno. Se analizaron tres ampollas cada una de las cuales fue inyectada por triplicado.

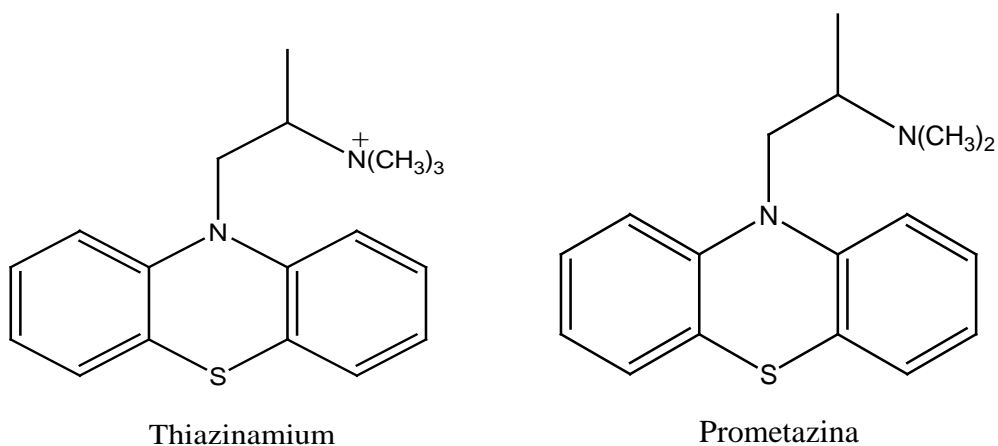
En la figura 44 se representa el electroferograma de una muestra de las ampollas de metilsulfato de thiazinamium. Se observa como al dopar con PTH hay un pico que aumenta su altura lo que puede considerarse como una prueba de que éste contiene impurezas de PTH.

Figura 44. Electroferogramas correspondientes a una muestra de una ampolla de thiazinamium (1) y a la misma muestra dopada con PTH (2).



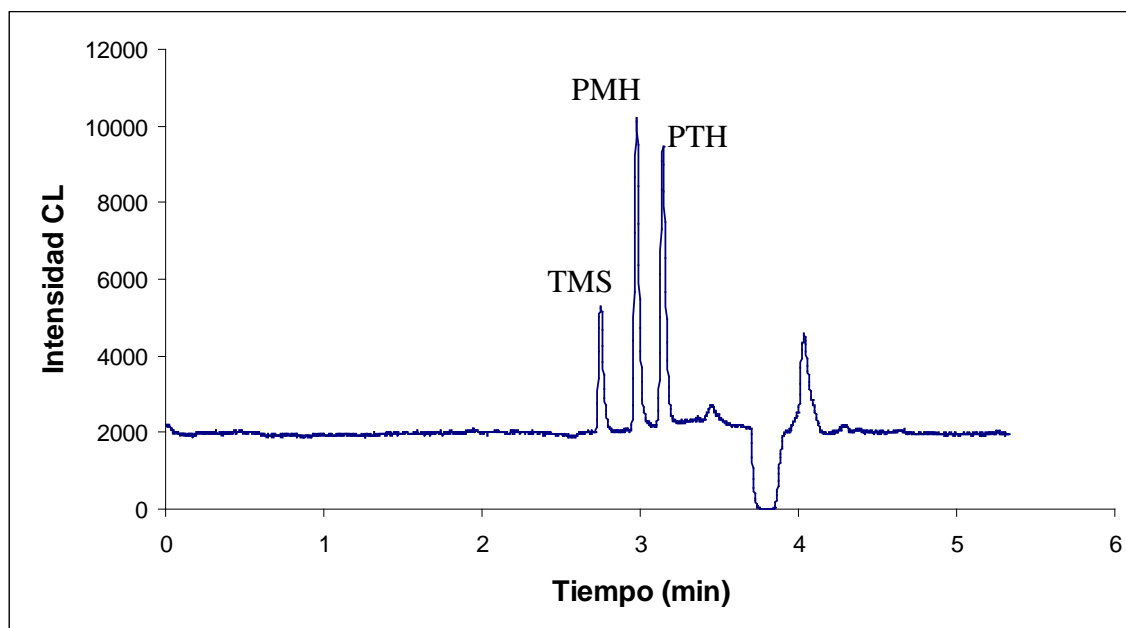
Este hecho es habitual considerando la similitud entre ambas moléculas (figura 45) y la posibilidad de que en la síntesis del thiazinamium se forme también prometazina.

Figura 45. Estructuras del TMS y de la PTH.



El siguiente electroferograma (figura 46) ilustra la separación de las tres fenotiazinas mediante CE y su posterior detección CL, poniendo de manifiesto la utilidad del sistema CE-CL propuesto en este trabajo.

Figura 46. Separación mediante el sistema CE-CL desarrollado de thiazinamium (TMS), promazina (PMH) y prometazina (PTH).



Los resultados obtenidos en las tres aplicaciones a preparados farmacéuticos se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Resultados de la determinación de PTH en fármacos.

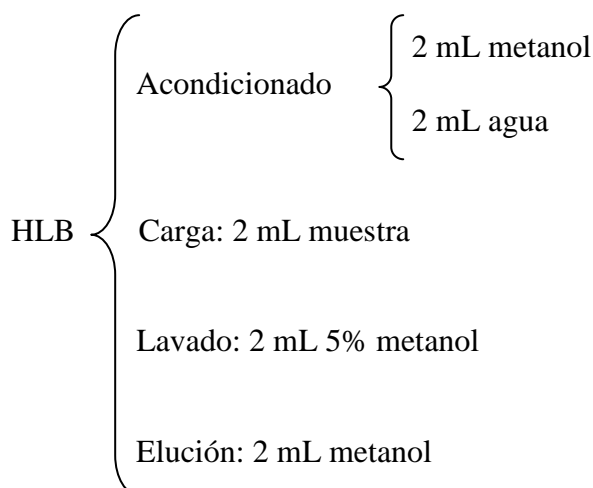
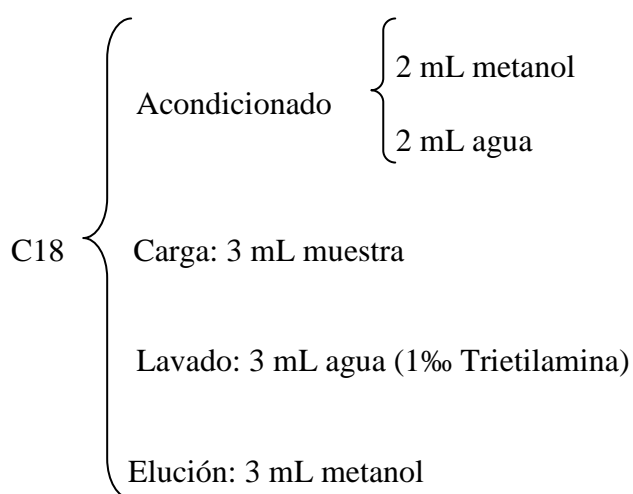
Aplicación	PTH encontrada	DER	PTH nominal
Jarabe	454 µg/mL	2'9 % (n=6)	500 µg/mL
Gragea	23'5 mg	4'9 % (n=9)	25'0 mg
Ampolla	14 µg/mL	8'3 % (n=9)	-----

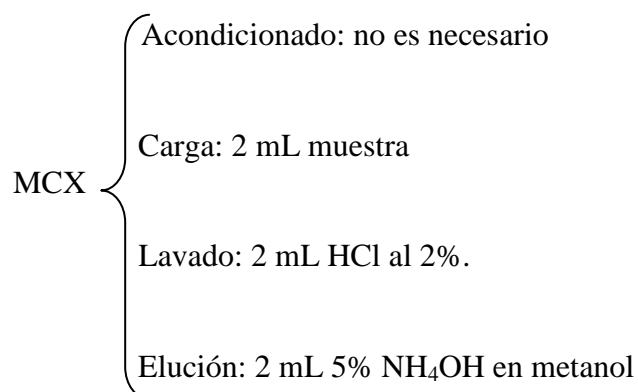
7.2. Aplicación del método a la determinación de PMH en orina.

Para poder aplicar el método de manera satisfactoria al análisis de orina hubo que introducir dos modificaciones. En primer lugar sería necesario el empleo de la inyección electrocinética si queríamos mejorar los límites de detección, y en segundo lugar era necesario llevar a cabo un procedimiento de tratamiento de la muestra con el objeto de eliminar interferentes y concentrar el analito. Para ello se aplicó un procedimiento previamente desarrollado para el análisis de fenotiazinas en orina [95]. En primer lugar

[95] Francisco.J. Lara, A.M. García Campaña, F. Alés Barrero y J.M. Bosque Sendra, *Electrophoresis*, 26 (2005) 2418.

hubo que seleccionar la fase estacionaria que se iba a emplear. Debido a la naturaleza apolar de los analitos ($\log P > 4$) se pensó en utilizar cartuchos de fase reversa y se estudiaron tres tipos distintos: C18, HLB y MCX. Los C18 se basan en una cadena lineal hidrocarbonada de 18 átomos de carbono, los HLB son polímeros con grupos fenilo y los MCX son cartuchos de fase mixta que incorporan tanto grupos fenilo como fenilsulfonato lo que les asegura una mayor retención para compuestos básicos. Tanto los HLB como los MCX se pueden utilizar en un rango de pH de 0 a 14 mientras que los C18 tienen un intervalo de pH más reducido. Los procedimientos empleados fueron los recomendados por el fabricante de cada caso y aparecen en el siguiente diagrama.





Nos decantamos por emplear los HLB porque eran los que proporcionaban los extractos más limpios puesto que las recuperaciones fueron aceptables en los tres. Aunque en principio se empleaba el método estándar recomendado por el fabricante, fue necesario hacer algunas modificaciones. En primer lugar se aumentó la carga de muestra hasta 5 mL con objeto de concentrar más los analitos y mejorar así los límites de detección. Se comprobó que con este volumen no se sobrepasaba el de rotura de los cartuchos. Posteriormente se hizo una optimización de la etapa de lavado para eliminar interferentes presentes en las muestras de orina. Este estudio se realizó aumentando el porcentaje de metanol desde 0 % hasta 90 % en una mezcla con H₂O que contenía una proporción de NH₃ constante del 2 %. Se pudo comprobar que era posible lavar con porcentajes de metanol de hasta un 50 % sin que se eluyeran los analitos. Este procedimiento de lavado se mostró eficaz para eliminar los interferentes.

Otro aspecto a optimizar fue el de la disolución con la que se reconstituía el extracto después de secar con N₂ puesto que de ella dependía que consiguiésemos recuperar los analitos y que después tuviésemos un disolvente de muestra adecuado para realizar la inyección electrocinética. Se comprobó que el metanol favorecía la redisolución de las fenotiazinas pero que el agua era más recomendable para la inyección electrocinética así que se llegó a un valor óptimo de MeOH : H₂O (1:1 v/v). Se consideró también la posibilidad de adicionar H₃PO₄ en pequeñas concentraciones porque ello favorecía que las fenotiazinas estuviesen cargadas positivamente y que por tanto la inyección electrocinética fuese más efectiva. El valor seleccionado como óptimo fue de 32 μM. Finalmente se decidió aumentar el volumen de metanol que se empleaba para eluir hasta los 3 mL y asegurarnos que habíamos eluido todo el analito.

El procedimiento de tratamiento de las muestras de orina quedó como sigue:

- 1) Dopado de 10 mL de muestra de orina con cantidades variables de PMH.
- 2) Adición de 100 μ L de HCl 5 N para desnaturalizar proteínas.
- 3) Centrifugación a 4000 rpm durante 10 min para precipitar partículas en suspensión que podrían obturar los cartuchos de extracción en fase sólida.
- 4) Cartucho Oasis HLB (3 mL/60 mg)
- 5) Acondicionado: $\left\{ \begin{array}{l} 2 \text{ mL de MeOH} \\ 2 \text{ mL de H}_2\text{O} \end{array} \right.$
- 6) Carga de 5 mL de orina
- 7) Lavado: $\left\{ \begin{array}{l} 3 \text{ mL de } 50\% \text{ MeOH} : 48\% \text{ H}_2\text{O} : 2\% \text{ NH}_3 \\ 3 \text{ mL de H}_2\text{O} \end{array} \right.$
- 8) Elución con 3 mL de MeOH.
- 9) Secado con N_2 a 40 °C.
- 10) Reconstrucción en 500 μ L de MeOH : H₂O (1:1) (v/v) con 32 μ M de H₃PO₄ y 1 μ g/mL de prometazina (IS).

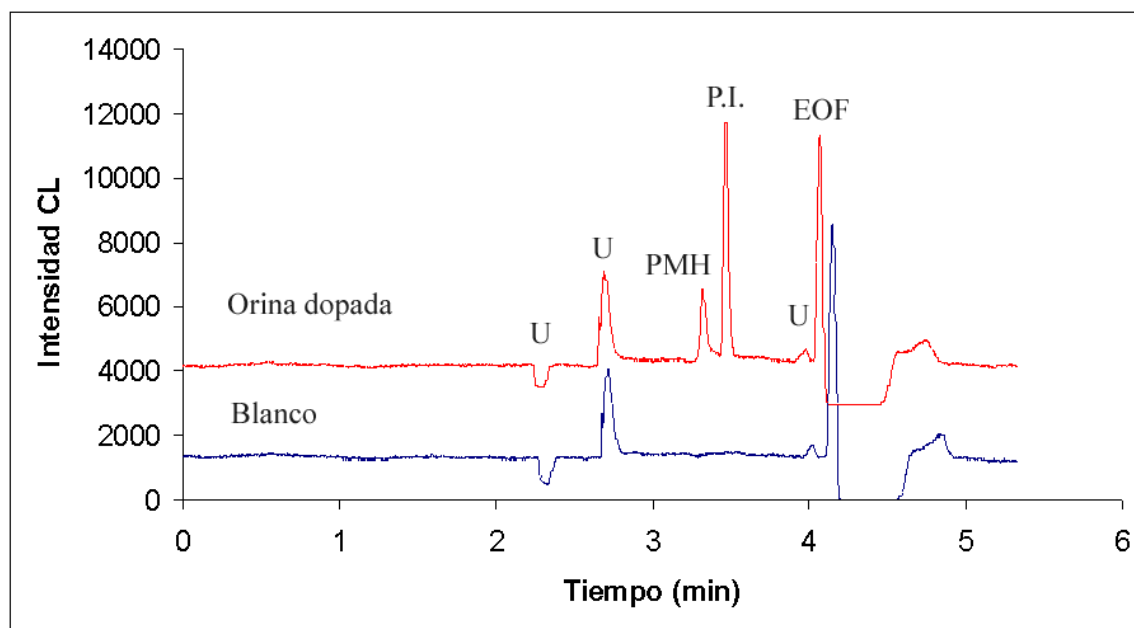
En la tabla 19 se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos para los distintos niveles de dopado en las muestras de orina.

Tabla 19. Porcentajes de recuperación para distintos niveles de dopado.

PMH añadida (ng/mL)	Recuperación %	DER % (n=3)
5	88'8	14'6
10	85'1	10'9
15	94'4	15'3

A continuación se muestra un electroferograma del blanco y otro de orina dopada con 10 ng/mL de PMH (figura 47).

Figura 47. *Electroferograma de un blanco de orina y de orina dopada con 10 ng/mL de promazina. Con “U” se indican picos desconocidos propios de la matriz, “P.I.” representa al patrón interno (PTH) y el EOF es el pico del flujo electrosmótico.*



8. CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un montaje instrumental para acoplar la detección quimioluminiscente (CL) a una técnica separativa como es la electroforesis capilar (CE).
2. Se ha llevado a cabo una búsqueda de la reacción CL más apropiada para la determinación sensible de fenotiazinas habiéndose encontrado que la más adecuada es la de exaltación por las fenotiazinas de la quimioluminiscencia de la oxidación del luminol con $K_3[Fe(CN)_6]$.
3. Se han optimizado de manera univariante las variables que afectan a la separación electroforética y de manera multivariante las que afectan a la detección CL.
4. Se ha estudiado la robustez de las variables que afectan a la detección CL demostrando que es robusto frente a variaciones del 10 % en las concentraciones de luminol, NaOH y $K_3[Fe(CN)_6]$.
5. Se han comparado dos modos de inyección de muestra habitualmente empleados en CE como son la inyección por gravedad y la inyección electrocinética.
6. Se ha puesto de manifiesto la conveniencia del empleo de un patrón interno cuando se persiguen fines cuantitativos en este tipo de metodologías.
7. Se ha desarrollado una metodología de extracción en fase sólida para la determinación de PMH en orina humana. Con ella se consigue concentrar los analitos y eliminar interferentes.
8. Se han establecido los parámetros característicos del método propuesto tanto para su aplicación en preparados farmacéuticos como para muestras de orina.
9. Se ha aplicado el método propuesto a la determinación de PTH como principio activo y como impureza en fármacos. También se ha aplicado a la determinación de PMH en muestras de orina humana.

9. VALORACIÓN DE LOS CONOCIMIENTOS ADQUIRIDOS.

Según indica la normativa vigente, una vez superados los períodos de docencia y de investigación tutelada, se realizará una valoración de los conocimientos adquiridos por el estudiante en los distintos cursos y trabajos de investigación tutelados.

Los cursos de doctorado realizados en el período de docencia están relacionados con el trabajo de investigación tutelado presentado y con las futuras investigaciones que se llevarán a cabo durante la realización de la tesis doctoral. Estos cursos de doctorado han complementado los conocimientos adquiridos en la licenciatura acerca de las diferentes técnicas, herramientas e instrumentación analítica disponible hoy día, así como alguno de los posibles campos de aplicación en los que pueden ser empleadas.

El curso **“Determinación de multicomponentes en espectrometría analítica”** aportó los conocimientos necesarios para abordar el problema del análisis de muestras que presentan más de un componente mediante técnicas quimiométricas, cuáles son las diferentes opciones y cuando es más interesante aplicar cada una de ellas.

En el curso **“Espectroscopía de luminiscencia molecular. Aplicaciones analíticas”** se profundizó en los fundamentos teóricos de dos técnicas luminiscentes como son la fluorescencia y la fosforescencia. Además se estudiaron las diferentes metodologías operatorias que pueden ser llevadas a cabo y la potencialidad que presentan frente a la determinación de analitos orgánicos e inorgánicos.

El curso **“Introducción a la química orgánica ambiental”** amplió los conocimientos acerca de los contaminantes ambientales, de cuáles son las reacciones que los producen y los tratamientos que se realizan para eliminarlos. Esto es de suma importancia si en un futuro pretendemos proponer métodos analíticos para la determinación de contaminantes ambientales.

El curso **“Quimioluminiscencia y bioluminiscencia. Aplicaciones analíticas”** es de vital importancia para el desarrollo de la parte experimental de esta memoria porque en él se adquirieron los conocimientos teóricos necesarios para emprender una metodología basada en la quimioluminiscencia. De gran ayuda es también el haber conocido las reacciones quimioluminiscentes con utilidad en química analítica y las diferentes soluciones prácticas que se han dado al acoplamiento de la

quimioluminiscencia con técnicas separativas como HPLC o CE. También fue interesante conocer diferentes sistemas sensores basados en esta técnica de detección.

El curso **“Sensores químicos”** reforzó los conocimientos que se tenían referentes a este tipo de instrumentación y se adquirieron otros nuevos relacionados con el fundamento en el que se basan, los componentes de los que constan y los diferentes tipos que existen en la actualidad.

El curso **“Aplicaciones de los sensores químicos, cromatografía de gases con detección de masas y electroforesis capilar al control de medicamentos”** fue interesante desde el punto de vista de que está íntimamente relacionado con el objeto de esta memoria, en especial la parte correspondiente a la electroforesis capilar. Especialmente fue de gran valor el conocer como estas técnicas pueden solventar los problemas más habituales que se pueden presentar en un laboratorio de control de medicamentos y de que manera pueden ser técnicas complementarias.

En el curso **“Aseguramiento de la calidad de los ensayos farmacéuticos”** se adquirieron conocimientos acerca de conceptos básicos en los sistemas de calidad, de cómo deben estar estructurados y de cómo son evaluados. También se aprendió a gestionar tanto instrumentos como muestras siguiendo las directrices que marcan estos sistemas.

Durante el **“Período de investigación tutelada”** se adquirió la habilidad para estructurar y desarrollar las diferentes fases en la elaboración de un trabajo de investigación, a llevar a cabo una metodología científica rigurosa, precisa y bien estructurada, a conjugar todos los conocimientos teóricos adquiridos hasta el momento con los resultados experimentales obtenidos en la investigación, así como a razonar, justificar y evaluar los datos experimentales.