

**APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR A LA
DETERMINACION DE CONSTANTES DE EQUILIBRIO Y A
LA CARACTERIZACION DE MUESTRAS COMPLICADAS**

**TESIS QUE PRESENTA LA
Q. DAMARIS RODRÍGUEZ BARRIENTOS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS (QUÍMICA)**

**ASESOR:
Dr. ALBERTO ROJAS HERNÁNDEZ**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA



Interdisciplina en evolución
ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA

RESUMEN	3
ANTECEDENTES GENERALES	5
1.1. INTRODUCCIÓN	5
1.2. CONCEPTOS BÁSICOS	7
1.3. DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO DE ELECTROFORESIS CAPILAR.....	14
1.3.1 CARACTERÍSTICAS DEL CAPILAR	14
1.3.2 INTRODUCCIÓN DE LAS MUESTRAS	17
1.4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	18
1.4.1. ELECTROLITO SOPORTE	18
1.4.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS	20
DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE EQUILIBRIO POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA	21
2.1. INTRODUCCIÓN	21
2.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	22
2.3. RESULTADOS	24
2.3.1 PROPIEDADES QUE TIENEN DEPENDENCIA LINEAL CON LA CONCENTRACIÓN O CON LAS FRACCIONES DE ESPECIES	35
2.3.2. ABSORBANCIA EN ESPECTROFOTOMETRÍA.....	36
2.3.3. CAMBIOS QUÍMICOS EN RMN CON INTERCAMBIO QUÍMICO RÁPIDO.....	37
2.3.4. CONDUCTIVIDAD EQUIVALENTE Y MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA	37
DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ, POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA, DE OXICAMS Y DE NUEVOS FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS	44
3.1. INTRODUCCIÓN	44
3.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	45
3.2.1 REACTIVOS	45
3.2.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	46
3.2.3 CARACTERÍSTICAS Y ACONDICIONAMIENTO DEL CAPILAR	47
3.2.4 PARÁMETROS EXPERIMENTALES.....	48
3.3. RESULTADOS	48
3.3.1 OXICAMS.....	48

3.3.2 FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS (LQM's)-----	55
DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA EL CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC) DE TENSOACTIVOS -----	63
4.1. INTRODUCCIÓN -----	63
4.2. PARTE EXPERIMENTAL-----	64
4.2.1 REACTIVOS -----	64
4.2.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES-----	65
4.2.3 CARACTERÍSTICAS Y ACONDICIONAMIENTO DEL CAPILAR -----	65
4.2.4 PARÁMETROS EXPERIMENTALES-----	65
4.3. RESULTADOS -----	66
4.3.1 MODELO PROPUESTO POR JACQUIER Y COL. [38]-----	67
4.3.2 MODELO CONSIDERANDO UN EQUILIBRIO ÚNICO DE MICELIZACIÓN -----	71
IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA EN MEZCLAS COMPLEJAS (MULTICOMPONENTES) -----	74
5.1. INTRODUCCIÓN -----	74
5.2. PARTE EXPERIMENTAL-----	77
5.2.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS -----	77
5.2.2 PARÁMETROS Y CONDICIONES EXPERIMENTALES-----	78
5.2.3 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO -----	79
5.2.4 OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS Y REPETIBILIDAD-----	79
5.3. RESULTADOS -----	80
5.3.1 REPETIBILIDAD -----	82
5.3.2 APLICACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINAR LA AUTENTICIDAD DE UNA MUESTRA DE PALO AZUL-----	84
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS-----	91
REFERENCIAS -----	94

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la determinación de constantes de equilibrio para diversos analitos mediante la técnica de Electroforesis Capilar. También se planteó el uso de esta técnica para el análisis e identificación de sistemas o mezclas de compuestos complicados como lo son los extractos herbales.

En primer lugar, se plantea una metodología para la determinación de constantes de acidez por Electroforesis Capilar, la cual se aplica posteriormente a dos familias de fármacos. Para el desarrollo de dicha metodología se determinaron las movilidades de una familia de indicadores, las sulfonftaleínas, que son analitos ionizables, para observar y analizar el comportamiento de la técnica en parámetros como repetibilidad y reproducibilidad en los datos, forma de introducción de las muestras y comportamiento de la movilidad respecto al pH y forma de realización del ajuste de los datos experimentales para determinar las constantes deseadas.

Una vez probada, la metodología se aplicó a la determinación de dos familias de fármacos: los oxicams y unos antihipertensivos de reciente creación. Los primeros tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias (del tipo no esteroidal) y para éstos se pretende corroborar los datos de constantes de acidez obtenidos en trabajos previos utilizando métodos espectrofotométricos o potenciométricos y de esta forma validar la metodología. Mientras que, para los fármacos con propiedades antihipertensivas se pretende corroborar y soportar los resultados obtenidos mediante espectrofotometría UV-Visible, que son los únicos disponibles al ser éstos son de reciente creación.

También se utilizó la técnica de Cromatografía Micelar Electrocinética (MEKC) para la determinación de la concentración micelar crítica del dodecilsulfato de sodio (SDS),

además de plantear un modelo que describe el comportamiento de la movilidad de este último en función de la concentración total de tensoactivo utilizando el programa de cómputo MEDUSA que permite calcular constantes de equilibrio.

Finalmente, se plantea una metodología para la obtención y caracterización por medio de huella digital, de sistemas complejos como los extractos herbales. En particular para extractos de *Eysenhardtia polystachya*, comúnmente conocido como palo azul, que es una corteza utilizada en tratamientos de enfermedades como cálculos en las vías urinarias, lumbago, artritis, diabetes, entre otras.

La metodología desarrollada para la obtención de los extractos se probó en una corteza proporcionada por el laboratorio de remedios herbolarios, fabricación de extractos fluidos y secos, Rosa Elena Dueñas, S.A de C.V (LRHFEFS), quienes garantizan la autenticidad de la corteza, por lo que se usó ésta como estándar para el desarrollo de la metodología.

Por último, la metodología desarrollada para la obtención y caracterización de huella digital del extracto de LRHFEFS se probó también para una madera que se sospechaba era palo azul, obteniéndose resultados satisfactorios en la aplicación del método, permitiéndonos la caracterización e identificación positiva de la misma como *Eysenhardtia polystachya*.

ANTECEDENTES GENERALES

1.1. INTRODUCCIÓN

La electroforesis capilar es una técnica de análisis que se empezó a desarrollar en los años ochenta. La base de la separación se relaciona con la aplicación de un campo eléctrico a una solución conductora contenida dentro de un tubo capilar, preferentemente buffer, de modo que los analitos se separan por diferencias en su movilidad. Las propiedades de esta técnica son, entre otras:

- alta resolución y eficiencia en las separaciones
- uso de cantidades pequeñas de reactivos
- en su mayoría se usan soluciones acuosas
- permite la aplicación de campos eléctricos altos
- tiempos cortos de análisis
- detección en línea, en tiempo real
- uso de tubos capilares en el intervalo de 25 – 100 μm de diámetro interno

Por esta técnica se pueden analizar una gran variedad de analitos, desde iones pequeños, moléculas pequeñas, péptidos, proteínas, DNA, virus, bacterias, células de sangre y hasta partículas coloidales.

La electroforesis capilar puede dividirse en varias técnicas, en el presente trabajo se utilizaron dos de ellas:

- Electroforesis Capilar de Zona (CZE)
- Cromatografía Micelar Electrocinética (MEKC)

Aunque la electroforesis capilar es usada primordialmente como una técnica de separación y análisis químico es, además, una herramienta útil para demostrar varios principios químicos y analíticos. El equilibrio químico que afecta la movilidad electroforética, así como los efectos del pH en la estructura química, pueden estudiarse por electroforesis capilar. Los conceptos de formación de micelas y equilibrio de partición pueden ser estudiados utilizando la cromatografía micelar electrocinética.

La movilidad es el parámetro por seguir en los estudios por electroforesis capilar, ya que ésta es sensible a variaciones del medio electroforético. De esta manera cambiando el pH o bien, si se adicionan modificadores como sustancias orgánicas, tensoactivos o moléculas con cavidades como ciclodextrinas o selectores quirales, se puede mejorar considerablemente el proceso de separación si es el caso, o bien estudiar el reparto de un analito entre estas moléculas; siendo esta técnica capaz de permitir el cálculo de constantes de acidez o de asociación y/o reparto.

Barbosa y colaboradores han determinado valores de constantes de acidez de quinolonas, péptidos y compuestos zwitteriónicos en medio acuoso y parcialmente acuoso (en mezclas de agua/metanol y agua/acetonitrilo) a la vez que optimizan parámetros para su separación valiéndose de métodos computacionales [1-10], todo lo anterior mediante electroforesis capilar.

Mbuna y colaboradores estudiaron la asociación de aniones inorgánicos con iones tetra- alquilamonio en soluciones acuosas mediante electroforesis capilar de zona de igual manera, a partir del cambio en la movilidad con el aumento en la concentración de los iones tetra- alquilamonio [11].

El cambio en la movilidad con respecto al pH, para calcular constantes de acidez no sigue un comportamiento lineal, sin embargo, se pueden usar programas computacionales

para encontrar los valores buscados. A continuación, se describen las generalidades y conceptos de esta técnica de análisis.

1.2. CONCEPTOS BÁSICOS

La electroforesis es una técnica de separación que se basa en la aplicación de un campo eléctrico a un medio conductor donde se introduce la muestra, los analitos presentes en la muestra se separan por diferencia en su relación carga/masa. En la electroforesis en placa el medio utilizado es, con frecuencia, un gel; sin embargo, este no es un medio lo suficientemente conductor para permitir el paso de corriente y, por lo tanto, el voltaje máximo que se puede aplicar en este tipo de electroforesis es de 1,000 Volts. Debido a esta limitante se crea la electroforesis capilar como un método de separación más eficiente ya que, cuando el medio conductor está contenido en un tubo capilar, se pueden emplear electrolitos soportes que permiten la aplicación de voltajes altos (de hasta 30,000 Volts), debido a que una solución electrolítica sí provee la suficiente conductividad y por lo tanto soporta una mayor corriente.

En solución, la corriente se transporta por medio de iones. La conductividad de una solución está determinada por dos factores:

- la concentración de las especies iónicas
- la velocidad de movimiento o movilidad de las especies iónicas en un campo eléctrico

Las especies con gran movilidad son altamente conductoras y viceversa. La movilidad de los iones en una solución está gobernada por su razón carga/tamaño; el tamaño de la molécula se determina con respecto a su peso molecular, su estructura tridimensional y su grado de solvatación, por ejemplo, el orden para las movilidades de iones metálicos es inverso al tamaño basado sólo en el radio iónico, esto se debe a que los iones más pequeños

están más solvatados que sus contrapartes más grandes en radio. La corriente generada es proporcional a la movilidad iónica del catión. Este hecho se vuelve importante en la selección apropiada del contraión para preparar el buffer [12].

La condición que tiene una influencia significativa dentro de las separaciones en electroforesis capilar es el **flujo electroosmótico (eof)**; este flujo se debe al movimiento de separación del buffer a través del capilar de sílice, como resultado de la existencia de un potencial zeta que ocurre en la interfase solvente/sílice. La intercara de la sílice está cargada negativamente como resultado de la desprotonación de los grupos silanol y ejerce una atracción sobre los cationes del buffer y del medio electroforético, formándose entonces una doble capa. La doble capa consiste en una capa, que se denomina interna, de cationes inmóviles y una capa externa, o difusa, de iones móviles, como se muestra en la Figura. 1.1.

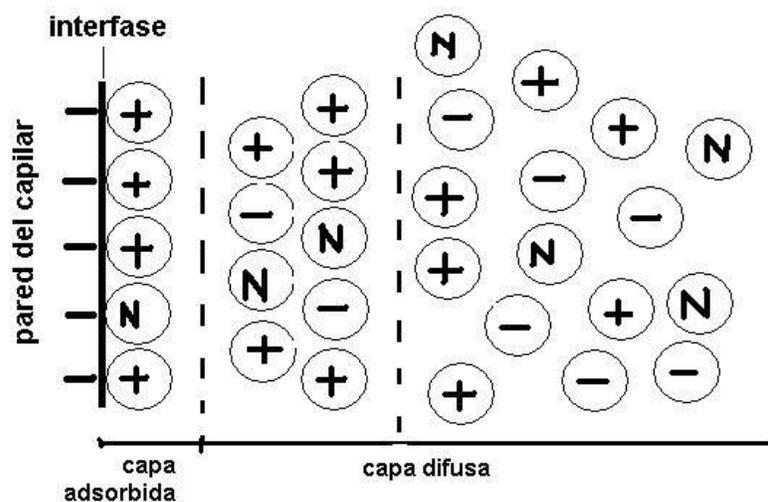


Figura 1.1. Representación de la doble capa en un capilar de sílice.

Cuando se aplica un campo eléctrico, los cationes (que en su mayoría son contraiones del buffer) migran hacia el cátodo y como estos se encuentran solvatados, transportan líquido desde el seno de la solución, en la misma dirección. Aunque la doble capa no es más que de

unos nanómetros de espesor, el flujo electroosmótico se transmite a través de todo el diámetro del capilar, presumiblemente mediante los puentes de hidrógeno que existen entre las moléculas de agua o por las interacciones de van der Waals que existen entre los constituyentes del buffer [12,14]. Debido a la presencia de este flujo de solvente, todos los iones migrarán en la misma dirección siempre que la velocidad del flujo electroosmótico sea mayor en magnitud, pero opuesta en dirección para todos los aniones presentes en la solución (Figura 1.2). Los analitos neutros serán también transportados por este flujo electroosmótico.

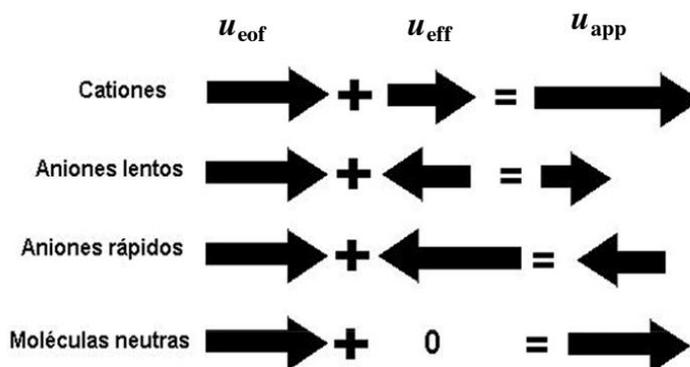


Figura 1.2. Movilidad de cationes, aniones y moléculas neutras bajo la influencia del flujo electroosmótico [12]

En la Figura 1.2. se observa que en todas las separaciones realizadas en electroforesis capilar debe tenerse en consideración la presencia del flujo electroosmótico, ya que la movilidad (u) que se obtendrá para los analitos es aparente (u_{app}), es decir, los analitos con carga positiva (cationes) presentarán una movilidad aparente más grande que su movilidad efectiva (u_{eff}) debido a que el flujo electroosmótico los “ayuda” a migrar más rápido. Por otro lado, los analitos con carga negativa (aniones), tienen una movilidad aparente menor, ya que su tendencia natural será a migrar hacia el ánodo, pero si el flujo electroosmótico es lo suficientemente grande, los “empuja” hacia el cátodo. Los analitos neutros, por su parte, aunque no sienten la presencia del campo eléctrico aplicado, serán “arrastrados” junto con el flujo electroosmótico.

Por lo tanto, el flujo electroosmótico permite:

- que los analitos neutros migren o se muevan junto con el flujo electroosmótico
- que los cationes y aniones migren hacia el cátodo
- en una sola corrida separar cationes y aniones

El flujo electroosmótico puede ser *controlado*, modificando el pH de trabajo para obtener picos simétricos o bien, para reducir el tiempo de análisis; puede ser *disminuido*, trabajando a valores de pH menores de 4, agregando un disolvente orgánico, adicionando un tensoactivo catiónico al electrolito soporte, por debajo de su concentración micelar crítica. También puede ser *eliminado*, esto para evitar la adsorción de moléculas cargadas positivamente o para permitir la separación de aniones con gran movilidad; la eliminación de este flujo puede entonces, ser temporal, si se recubre la pared del capilar con algún polímero o tensoactivo catiónico adicionado al electrolito soporte, o bien permanente, si se modifica la pared del capilar uniendo dicho polímero de manera covalente.

Debido a la importancia del flujo electroosmótico, se debe poner un marcador de éste, es decir, una sustancia que permita medir su velocidad. Para esto se pide que dicha sustancia sea neutra a cualquier valor de pH y de preferencia que tenga un coeficiente de absorptividad lo suficientemente grande, de manera que sea detectable una cantidad mínima, esto con el fin de que dicha sustancia solo sirva para determinar el valor de la velocidad del flujo electroosmótico y no sea necesariamente parte del sistema. En la mayoría de los experimentos realizados en el presente trabajo, la sustancia utilizada como marcador fue acetona, aunque se puede utilizar acetonitrilo, metanol e inclusive etanol [14,15].

Existen dos parámetros significativos en electroforesis: ***el tiempo de migración (t_m) y la movilidad electroforética (u)***. El tiempo de migración es el tiempo que le toma al soluto recorrer el capilar, desde su inicio, hasta la ventana al detector. La reproducibilidad en el tiempo de migración puede depender de varios factores operacionales: fuerza iónica del

buffer, tratamientos previos hechos al capilar, así como la frecuencia de éstos, el voltaje aplicado y la temperatura [15].

La movilidad electroforética es directamente proporcional a la carga del ion e inversamente proporcional a su radio iónico, es una propiedad característica de cada especie iónica presente en la solución y representa la velocidad de movimiento del ion. Para el cálculo de las movilidades electroforéticas es importante considerar el grado de ionización de los analitos en la solución como en el caso de los ácidos o bases débiles, por ejemplo, su grado de ionización depende del pH de la solución.

En el curso de la separación, el factor determinante es, si ésta procede en un sistema de electrolito continuo o discontinuo. Cuando se usa un sistema continuo, el electrolito soporte se encuentra igual a lo largo de la ruta de migración. Este continuo no cambia con el tiempo y provee un medio conductor de corriente, asegurando así, el flujo de la corriente y la formación de un campo eléctrico, a través de la ruta de migración. El electrolito soporte debe tener las propiedades amortiguadoras apropiadas, así como una influencia sobre las movilidades efectivas.

Cuando se varían las propiedades del electrolito soporte a lo largo de la ruta de migración el resultado de la separación puede ser un proceso cinético. Si la composición del electrolito soporte es constante a lo largo de la ruta de migración, el campo eléctrico, así como las movilidades efectivas de las sustancias separadas, también serán constantes.

Si la composición del electrolito soporte no es constante, entonces el campo eléctrico y las movilidades efectivas cambiarán a lo largo de la ruta de migración, afectando fuertemente el proceso de separación. Desde el punto de vista macroscópico, la migración de varias especies puede detenerse en los diferentes lugares de la ruta de separación. En un medio discontinuo, la muestra migra entre dos diferentes electrolitos. Aquí la conducción de

la corriente eléctrica en la zona de la muestra es soportada exclusivamente por la sustancia analizada y el sistema contra- iónico [13].

Existen diversas modalidades dentro de la técnica de Electroforesis Capilar, de acuerdo con las necesidades de separación, las dos más comúnmente empleadas son la **Electroforesis Capilar de Zona** (*CZE*, por sus siglas en inglés) y la **Cromatografía Micelar Electrocinética** (*MEKC*, por sus siglas en inglés).

La Electroforesis Capilar de Zona (*CZE*) se caracteriza por la migración de la muestra en un electrolito soporte, el cual conduce prácticamente toda la corriente. La composición del electrolito se mantiene constante a lo largo de la ruta de migración y no cambia con el tiempo. La conductividad del electrolito dentro del capilar es prácticamente constante antes y durante el proceso de separación y cualquier desviación de la conductividad en las posiciones de las zonas de migración es despreciable. Obviamente la intensidad del campo eléctrico es también constante a lo largo del capilar. La separación se lleva a cabo de tal manera que los analitos contenidos en la muestra (la cual se introduce en un extremo del capilar), después de sentir la presencia del campo eléctrico aplicado comienzan a migrar, separándose debido a la diferencia en sus movilidades [13].

Con la modalidad de *CZE*, únicamente se pueden separar completamente los analitos que posean carga, ya que los analitos neutros migrarán todos juntos arrastrados por el flujo electroosmótico.

La Cromatografía Micelar Electrocinética, *MEKC*, es una técnica de separación que combina algunos de los principios operacionales de la Cromatografía Líquida Micelar y la Electroforesis Capilar de Zona. Fue propuesta por Terabe y colaboradores en 1984 [16]; esta técnica puede ser considerada como un tipo de cromatografía con una fase pseudo-estacionaria micelar y una fase móvil que es impulsada electroosmóticamente. La fase

pseudo-estacionaria micelar la provee un tensoactivo que se encuentre por encima de su concentración micelar crítica [13,16], es decir, cuando forma micelas.

La técnica *MEKC*, a diferencia de la *CZE*, permite la separación de solutos neutros ya que el centro hidrofóbico de la micela puede servir como una cavidad para retener compuestos no polares que se introduzcan en la solución. Debido a esto, la solubilidad de muchas sustancias insolubles en agua se puede incrementar hasta en varios órdenes de magnitud. Si la micela posee carga eléctrica, la estabilidad de los complejos formados por solubilización micelar provee diferencias en las movilidades efectivas y permite entonces su separación electroforética [13,16].

Para especies neutras, el equilibrio entre la micela y el electrolito soporte rige su movilidad electroforética y por lo tanto sus posibilidades de separación. La mayoría de los analitos interaccionan de una u otra forma con la micela. Los compuestos hidrofóbicos en general interaccionan fuertemente con la micela y son retenidos en mayor proporción que los hidrofílicos [13].

Un soluto que es altamente polar no se solubiliza en las micelas y por lo tanto migrará con el flujo electroosmótico, marcando además el valor de movilidad de este (en general se usa metanol). Por otro lado, un soluto que se solubilice por completo en las micelas migrará con la misma velocidad que éstas y, por lo tanto, siguiendo este compuesto se puede obtener la movilidad de las micelas (para este caso se usa, en general, Sudan III). Estos tiempos, el del flujo electroosmótico y la micela, proveen una ventana de migración dentro de la cual se observará la separación de los solutos neutros [16].

La distribución de los analitos y los equilibrios que resultan dependen de la polaridad de éstos. Con los analitos polares se favorece la permanencia en la disolución acuosa mientras que los compuestos no polares prefieren el medio constituido por las cadenas de hidrocarburo de las micelas [13,16].

Cuando se emplea un tensoactivo aniónico las micelas tienen una movilidad electroforética hacia el ánodo. Sin embargo, dado que la mayor parte de las disoluciones reguladoras utilizadas en *MEKC* presentan un flujo electroosmótico alto hacia el cátodo, esto provoca que las micelas aniónicas sean arrastradas hacia dicho electrodo, con una velocidad menor a la del flujo electroosmótico [13]. Esto significa que las muestras introducidas del lado del ánodo pueden ser detectadas en el cátodo que es donde se encuentra el detector. Por otro lado, cuando se emplea un tensoactivo catiónico este se adsorbe en las paredes del capilar haciendo que el flujo electroosmótico se invierta y que todo migre hacia el ánodo, por lo tanto, se debe invertir la polaridad en los electrodos para observar los analitos analizados [13,16].

1.3. DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO DE ELECTROFORESIS CAPILAR

El equipo de electroforesis capilar utilizado en el presente trabajo es el modelo P/ACE MDQ de Beckman, el cual puede aplicar voltajes de hasta 30 kV y permite corrientes de hasta 300 μ A. El cartucho (o cassette) que soporta el capilar cuenta con un sistema de enfriamiento que permite trabajar en un intervalo de temperatura desde 4 °C hasta 60 °C. Como sistemas de detección cuenta con dos módulos intercambiables; el primero con cuatro filtros en la región UV de 200, 214, 254 y 280 nanómetros. El segundo módulo tiene un arreglo de diodos, éste proporciona más información ya que permite monitorear longitudes de onda desde 190 hasta 600 nanómetros, con lo que se pueden obtener los espectros de los picos que aparecen en los electroferogramas y de esta forma, asignar a que analito corresponden.

1.3.1 CARACTERÍSTICAS DEL CAPILAR

Idealmente, los capilares utilizados en electroforesis capilar deben cumplir con las siguientes características:

- deben disipar bien el calor
- ser química y eléctricamente inertes
- transparentes a la región UV-Visible, ya que con esto se facilita la detección en línea

Los capilares de sílice fundida son los que mejor cumplen estas condiciones y por ello son los más ampliamente utilizados. Para aumentar su flexibilidad y resistencia se recubren de una capa de poliimida. Con el propósito de llevar a cabo la detección, se elimina una pequeña sección del recubrimiento, este segmento se conoce como ventana del capilar.

Los grupos silanol, contenidos en el capilar, son los responsables de la presencia del flujo electroosmótico, que se mencionó con anterioridad, estos grupos silanol se encuentran protonados a valores de pH ácidos, y conforme el pH aumenta se desprotonan (ver Figura 1.3), favoreciendo la formación de la doble capa esquematizada en la Figura 1.1.

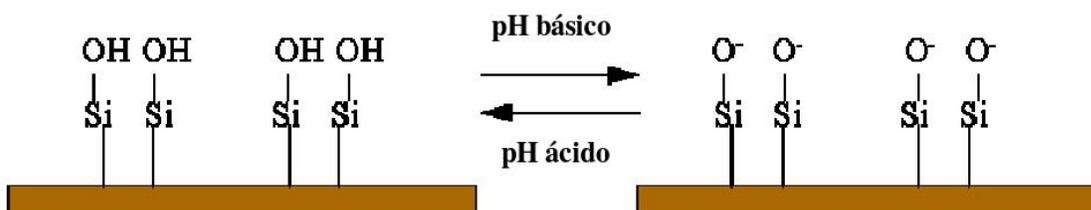


Figura 1.3. Protonación y desprotonación, de acuerdo con el pH, de los grupos silanol presentes en la pared de un capilar de sílice.

En este proyecto se utilizaron capilares de sílice fundida de 75 μm y 50 μm de diámetro interno, variando las longitudes, según el experimento.

El acondicionamiento del capilar es importante si se quiere obtener buena reproducción en los tiempos de migración, por lo que este es un paso obligado al inicio de

cada experimento. Los tiempos de cada lavado dependerán, por supuesto de la longitud y diámetro interno del capilar, a fin de reemplazar el fluido contenido en el capilar

Para el trabajo realizado en el presente proyecto, los capilares nuevos se acondicionaron mediante la introducción de diferentes soluciones, por presión, según la siguiente secuencia:

- agua desionizada a 30 *psi* por 5 minutos, 25 °C
- solución de hidróxido de sodio 0.1 M, a 30 *psi*, durante 10 minutos, 25 °C
- solución de hidróxido de sodio 0.1 M a 30 *psi*, durante 10 minutos, 40 °C
- agua desionizada a 30 *psi* durante 10 minutos, 25 °C
- 15 minutos a 20 *psi* con el buffer de trabajo, 25 °C

En general, para las repeticiones en los experimentos realizados en el presente trabajo, antes de introducir la muestra y aplicar la diferencia de potencial, se hacía la siguiente secuencia de acondicionamiento (manteniendo la temperatura del capilar a 25°C):

- NaOH (0.1 M), a 20 *psi* durante 2 minutos
- H₂O desionizada, a 20 *psi* por dos minutos
- aproximadamente 3 minutos a 20 *psi* con el buffer de trabajo

Con esto se obtiene una buena reproducibilidad en los tiempos de migración de los analitos estudiados [17]. El capilar se guardaba lleno de agua para evitar que se pudiera llegar a tapar.

1.3.2 INTRODUCCIÓN DE LAS MUESTRAS

La introducción de la muestra puede hacerse de forma hidrodinámica (aplicando presión o haciendo vacío por un tiempo determinado) o bien, aplicando una diferencia de potencial durante un cierto tiempo. Se utiliza la aplicación de voltaje cuando se quiere enriquecer la muestra introducida en algún tipo de ion, ya sea cationes o aniones.

En general, se prefiere la introducción de forma hidrodinámica ya que la muestra introducida es homogénea, es decir contiene todo tipo de analitos en cualquier forma que se encuentren, ya sean iones o neutros.

Para los experimentos realizados en el presente trabajo la introducción de la muestra se hizo de forma hidrodinámica, aplicando presiones entre 1.0 *psi* y 5.0 *psi* durante 5 o 10 segundos, dependiendo del analito y del solvente en el que se encontraba.

En general, la introducción de la muestra se hace por el lado del ánodo, de modo que los analitos recorren una cierta distancia hasta el detector (dependiendo de la longitud del capilar); a esta distancia se le conoce como *longitud efectiva* (L_{eff}).

Cuando el flujo electroosmótico es pequeño, es decir a valores ácidos de pH, si se tiene un analito cargado negativamente, rara vez se observará su salida por el detector, ya que no hay un flujo lo suficientemente fuerte que lo arrastre hacia el cátodo dentro de un intervalo de tiempo razonable. Cuando esto sucede, se puede introducir la muestra por el cátodo e invertir la polaridad de los electrodos (polaridad invertida o inversa), de esta manera el analito introducido recorre una menor longitud efectiva y así el intervalo de tiempo se reduce y puede ser que se observe la salida del analito.

1.4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

1.4.1. ELECTROLITO SOPORTE

En electroforesis capilar se emplea una extensa variedad de electrolitos soporte o buffers (ver Tabla 1.1). Como se mencionó con anterioridad, el propósito de éstos es mantener el control del pH y proveer la conductividad suficiente para llevar a cabo la separación.

Las concentraciones que se manejan varían en un intervalo de entre 10 y 100 mM, aunque puede haber excepciones. Si bien, los electrolitos más diluidos pueden producir separaciones más rápidas, se debe reducir la concentración de la muestra a inyectar y por otro lado un buffer muy concentrado produce un aumento significativo en la corriente y esto genera problemas de calentamiento del capilar y por lo tanto gradientes de temperatura a lo largo de la separación.

Tabla 1.1. Electrolitos soportes comúnmente usados para electroforesis capilar [12].

ELECTROLITO SOPORTE	pK _A
Fosfato	2.12 (pK _{A1})
Citrato	3.06 (pK _{A1})
Formiato	3.75
Citrato	4.74 (pK _{A2})
Acetato	4.75
Citrato	5.40 (pK _{A3})
MES*	6.15
Fosfato	7.21 (pK _{A2})
TRIS**	8.30
Borato	9.24
CAPS***	10.24
Fosfato	12.32 (pK _{A3})

*MES: ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico; **TRIS: 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol; ***CAPS: ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico

En la selección de la concentración del electrolito soporte cabe recordar que éste debe resistir cambios de pH para una dilución o ante una adición de ácidos o bases, y que la capacidad amortiguadora se limita a ± 1 unidades de pH de su valor de pK_A; la operación fuera de ese intervalo requiere el reemplazo frecuente del buffer para evitar cambios en el pH.

En el presente trabajo se seleccionó como electrolito soporte el buffer de fosfatos ya que, al ser un ácido poliprótico tiene la ventaja de que puede utilizarse en un intervalo amplio de pH, además tiene una baja absorbancia en el intervalo de UV-Visible. Las concentraciones fueron: 100 mM y 50 mM. Los amortiguadores para cada valor de pH se preparaban a partir de soluciones estándar de concentración 0.1 M de H₃PO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ y NaPO₄, según el pH requerido.

1.4.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los límites de detección en electroforesis capilar, en teoría, pueden ser del orden de 10^{-5} M, sin embargo, cuando se tiene un detector óptico se debe recordar que la absorbancia (A), que es la respuesta que se obtiene, sigue la ley de Beer y que, en este caso, la longitud de paso óptico es el diámetro del capilar que se esté usando (a diferencia de la espectrofotometría UV-Visible donde la celda, que es la longitud de paso óptico, es de un centímetro), por lo que, en ocasiones, las muestras introducidas deben ser preparadas del orden de 10^{-3} y 10^{-4} M, pero eso claro, depende de la absortividad que tengan los analitos presentes en la muestra que se introducirá.

En el presente trabajo las muestras se preparaban en concentraciones en el orden de 10^{-4} o 10^{-5} M, en buffer, a partir de soluciones stock de concentración aproximadamente 1 mg/mL; cabe resaltar que la solución stock podía ser de un solvente no acuoso (o mezcla parcialmente acuosa) como metanol o etanol; esto último porque algunos analitos estudiados no eran muy solubles en medio acuoso. Sin embargo, es deseable que la muestra se encuentre en el buffer de trabajo para asegurar un perfil plano en la corriente y con esto una buena reproducibilidad en los experimentos.

Por último, a la muestra a introducir se le agregaba un cierto volumen de acetona (casi siempre al 3%), como marcador del flujo electroosmótico.

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE EQUILIBRIO POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA

2.1. INTRODUCCIÓN

La determinación de constantes de equilibrio, en específico constantes de acidez, puede realizarse por varios métodos como: espectrofotometría UV-Visible, cromatografía líquida o métodos potenciométricos [2,19-22].

La determinación de los valores de pK_A, mediante UV-visible depende en gran medida, de que las especies ácido-base involucradas, presenten diferentes espectros de absorción, además de la necesidad casi obligada de que el soluto analizado sea de alta pureza o bien que las impurezas, de existir, no absorban en el intervalo de longitudes de onda estudiado ya que podrían traslaparse con los espectros del soluto de interés.

En el caso de cromatografía líquida como técnica para la determinación de los valores de pK_A de un soluto los problemas aumentan ya que se debe trabajar en medio no acuoso o modificando el mismo para mejorar la selectividad y los tiempos de retención [23,24].

Por último, en el caso de las valoraciones potenciométricas, la concentración del analito debe ser lo suficientemente alta, entre 10⁻³ y 10⁻² M, para obtener una determinación confiable.

Por todo lo anterior, la electroforesis capilar puede considerarse como un método alternativo que puede resolver estos inconvenientes, ya que, como se mencionó antes, es posible trabajar en concentraciones hasta 10⁻⁵ M, además de hacer las determinaciones en un sistema

acuoso, o bien, utilizando algún modificador orgánico para aumentar la resolución, sin que esto afecte en gran medida los tiempos de migración de las especies analizadas [3,14].

En el capítulo anterior se mencionó que algunos autores habían determinado constantes de acidez de diversos analitos usando electroforesis capilar, siguiendo la movilidad que es una propiedad característica de cada especie. También se mencionó que dicha propiedad no sigue un comportamiento lineal con el cambio en el pH pero que es posible utilizar programas de cómputo para hacer este ajuste y encontrar así, los valores buscados.

Con base en lo anterior, el objetivo de este capítulo consiste en explicar el desarrollo de la metodología planteada para la determinación de constantes de acidez usando electroforesis capilar. Esta metodología se desarrolló utilizando como analitos, una familia de compuestos indicadores de pH denominados sulfonftaleínas, los cuales son compuestos con valores de constantes de acidez determinados y reportados [17], algunos estudiados inclusive, en el grupo de trabajo del área de química analítica. La posterior aplicación de esta metodología a fármacos de reciente creación se explica en el siguiente capítulo.

2.2. PARTE EXPERIMENTAL

Los fosfatos utilizados para preparar los buffers fueron: NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 de Fluka (99% de pureza), el Na_3PO_4 de Aldrich (96% de pureza); el H_3PO_4 fue proporcionado por J.T. Baker (85.4% de pureza). El agua utilizada, para preparar soluciones, se obtuvo de un desionizador MilliQ de Millipore, con una resistividad de 18.2 $\text{M}\Omega$ cm.

Los indicadores seleccionados fueron el *rojo de fenol (rf)*, *rojo de cresol (rc)*, *azul de timol (at)* y *azul de bromotimol (abt)*, los cuales, como se mencionó en la sección anterior

son una familia de sulfonftaleínas y difieren entre sí por algunos grupos funcionales, siendo el rojo de fenol el primer miembro de esta familia de compuestos. En la Figura 2.1 se representan los cuatro indicadores.

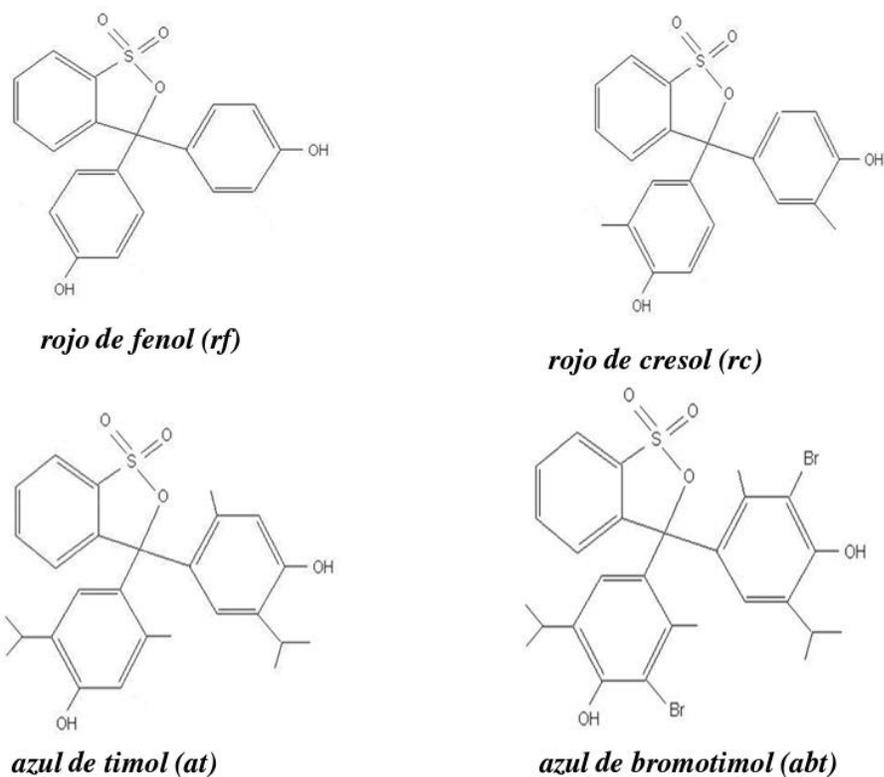


Figura 2.1. Representación de los cuatro indicadores

El buffer utilizado fue de fosfatos en concentración 100 mM, a valores de pH entre 5 y 11, preparados a partir de soluciones estándar de concentración 0.1 M de H_3PO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 y NaPO_4 , según el pH requerido, ajustando este último con soluciones de NaOH ó HCl.

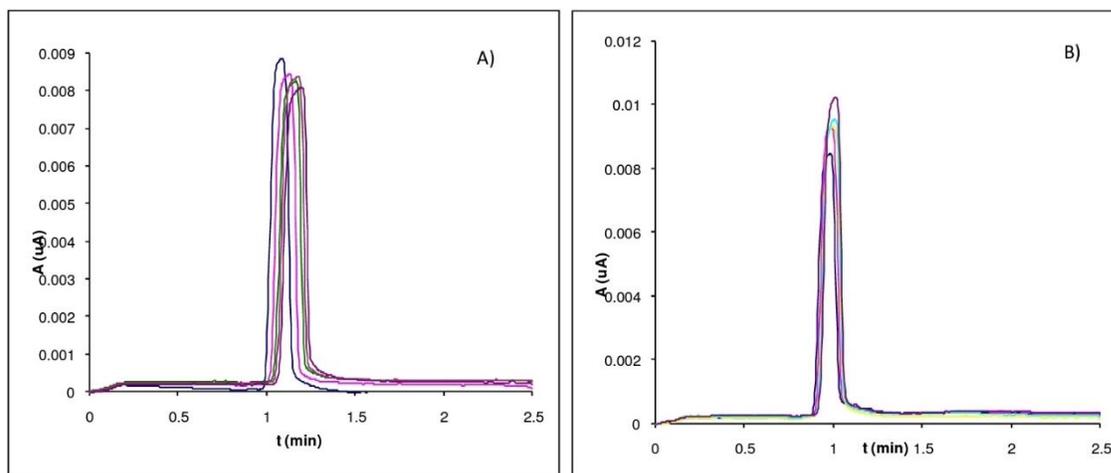
Las soluciones de indicadores se prepararon en concentración 10^{-3} M, disolviendo primero el indicador en 1.0 mL de etanol y aforando a 10 mL con agua desionizada (solución stock).

La muestra se preparaba en un vial de 2.0 mL, se ponía una alícuota de 50 μL de la solución stock de indicador y 1500 μL de buffer, adicionando además 20 μL de acetona como marcador del flujo electroosmótico. La muestra se introdujo de forma hidrodinámica a 1.0 *psi* por 5 segundos.

El capilar utilizado tenía una longitud total de 60 cm (longitud efectiva de 50 cm, o bien 10 cm si se inyectaba por el cátodo) y se aplicó un voltaje de 20 kV.

2.3. RESULTADOS

En primer lugar, se hicieron inyecciones de *azul de bromotimol (abt)*, para observar cómo se afectaba la reproducibilidad en el tiempo de migración a diferentes valores de pH y se obtuvieron los electroferogramas que se muestran en la Figura 2.2.



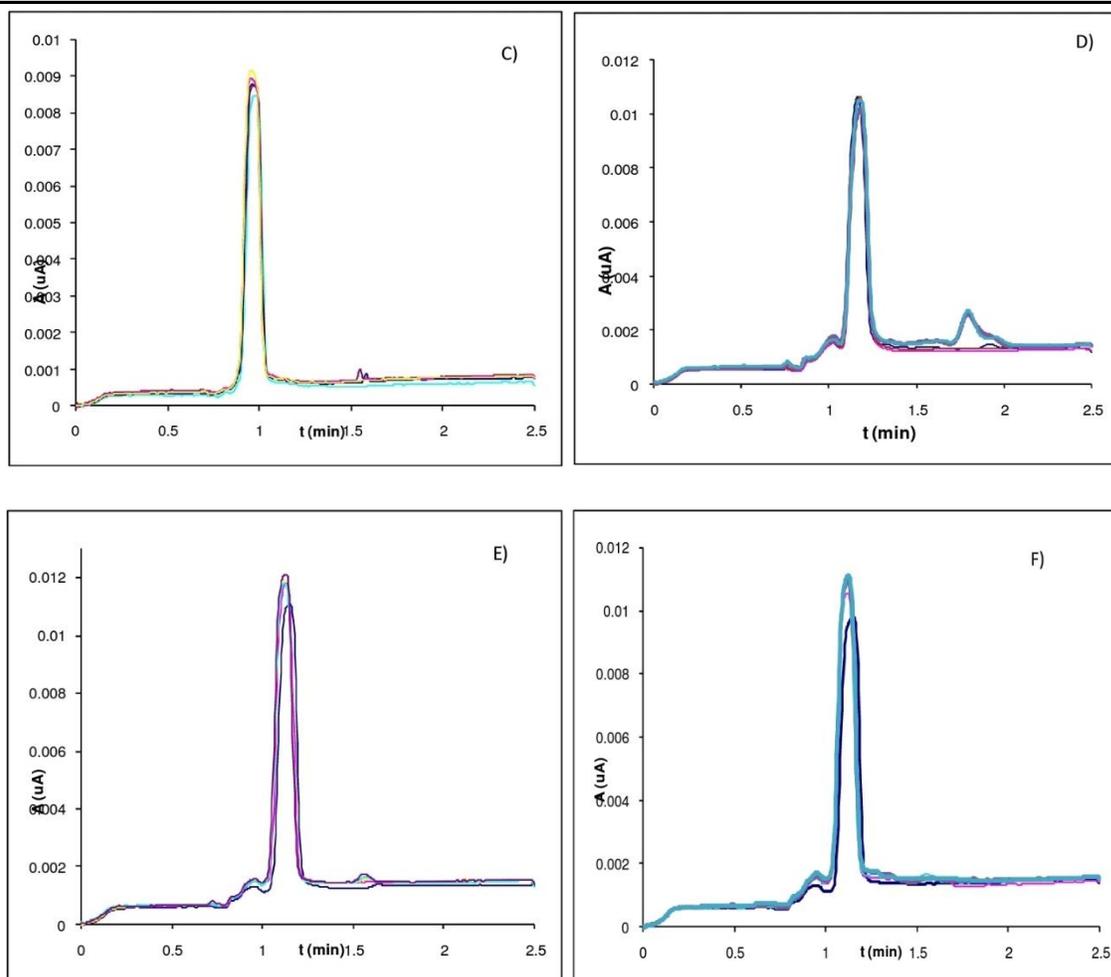


Figura 2.2. Electroferogramas del azul de bromotimol (abt), obtenidos a diferentes valores de pH: A) 4.17, B) 5.90, C) 6.86, D) 7.84, E) 9.17 y F) 10.38

En los electroferogramas anteriores (Figura 2.2), se puede apreciar que la reproducibilidad en el tiempo de migración es mejor cuando se trabaja a valores de pH entre neutros y básicos, esto es porque, el flujo electroosmótico en estos valores de pH es mayor y más reproducible, permitiendo a su vez que el tiempo de migración del azul de bromotimol sea prácticamente el mismo en el intervalo de pH ya mencionado. Esto no solo afecta al tiempo de migración, sino también a la simetría del pico, ya que se observa una mejor simetría cuando el flujo electroosmótico es más reproducible.

Una vez que se adiciona acetona al sistema, como esta marca la movilidad del flujo electroosmótico y junto con ella salen los compuestos neutros, se puede observar en los

electroferogramas, la carga promedio que tiene el azul de bromotimol a cada pH, según sale antes o después de la acetona. Esto se aplica a todos los analitos (cargados o no) ya que, si la señal del analito sale antes que la acetona podemos decir que se trata de un compuesto cargado positivamente, cuando la señal de la acetona y del analito no se distinguen (salen juntas) significa que éste se encuentra neutro y finalmente, para las señales que se observan después de la acetona, la carga que se asigna a estos analitos es negativa.

En la Figura 2.3 se presentan los electroferogramas del *abt* obtenidos para valores de pH 5 y 8. Como se puede observar, el azul de bromotimol tiene carga negativa en este intervalo estudiado de pH, ya que su señal se observa después de la acetona.

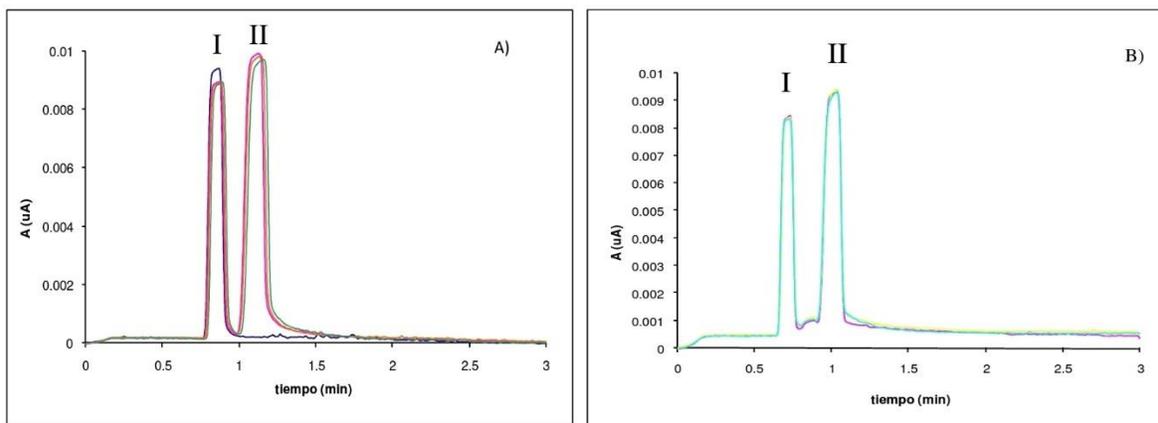


Figura 2.3. Electroferogramas obtenidos para el azul de bromotimol (*abt*) condiciones: A) pH= 5; B) pH= 8. El pico I corresponde a la acetona y el pico II al *abt*.

A partir de los electroferogramas se obtienen los tiempos de migración de cada analito (acetona y azul de bromotimol), los cuales se muestran en la Tabla 2.1, con su incertidumbre asociada.

Tabla 2.1. Tiempos de migración, con su respectiva incertidumbre, obtenidos para la acetona y el azul de bromotimol a diferentes valores de pH.

pH	tiempos de migración (min)	
	acetona	azul de bromotimol
5	0.879 ± 0.010	1.142 ± 0.019
6	0.744 ± 0.002	0.926 ± 0.002
7	0.721 ± 0.000	0.904 ± 0.007
8	0.730 ± 0.002	1.036 ± 0.003
9	0.729 ± 0.000	1.083 ± 0.000
10	0.729 ± 0.000	1.095 ± 0.002
11	0.727 ± 0.007	1.098 ± 0.010

Con los tiempos de migración se calcula la movilidad (u), de acuerdo con la siguiente relación [12-14]:

$$u = \frac{L_T L_{eff}}{V t_m} \quad (2.1)$$

Donde L_T es la longitud total del capilar; L_{eff} es la longitud al detector (o longitud efectiva); V es la magnitud del campo eléctrico aplicado y t_m es el tiempo de migración del analito.

Los valores para los parámetros L_T y L_{eff} se especificaron en la sección experimental, así que se calculan las movilidades aparentes (u_{app}) del indicador para cada valor de pH. En los electroferogramas de la Figura 2.3 se deduce que el azul de bromotimol se encuentra predominantemente como anión en el intervalo de pH estudiado. Esto implica que las movilidades calculadas serán de un anión, y por convención tendrán signo negativo.

Cabe mencionar que las movilidades calculadas con la relación (2.1), son movilidades aparentes, ya que no se debe olvidar el efecto del flujo electroosmótico el cual, en este caso, obliga al azul de bromotimol a moverse hacia el cátodo. Entonces a la movilidad aparente del indicador debe restarse el efecto del flujo electroosmótico (u_{eof}), de acuerdo con la siguiente expresión:

$$u_{eff} = u_{app} - u_{eof} \quad (2.2)$$

Estas movilidades efectivas del azul de bromotimol se presentan en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Movilidades efectivas de la acetona y el azul de bromotimol.

pH	movilidad (m^2/Vs)	
	acetona	azul de bromotimol
5	5.82E-08	-1.34E-08
6	6.88E-08	-1.35E-08
7	7.10E-08	-1.44E-08
8	7.01E-08	-2.07E-08
9	7.02E-08	-2.29E-08
10	7.02E-08	-2.34E-08
11	7.04E-08	-2.38E-08

Cuando se grafica el comportamiento de la movilidad del indicador azul de bromotimol en función del pH (ver Figura 2.4), se observa que para valores de pH menores a 7, la movilidad es prácticamente constante, esto se debe a que la especie presente en mayor cantidad es el mono- anión (con un protón menos). Lo mismo ocurre para valores de pH mayores a 9, donde la fracción predominante es el di-anión (dos protones menos); mientras que en el intervalo comprendido entre valores de pH de 7 a 9, se observa un cambio marcado en la movilidad. Esto puede indicar la presencia de un valor de pK_A en esta zona, ya que la movilidad efectiva es un promedio ponderado de las especies presentes para el analito a cada valor de pH.

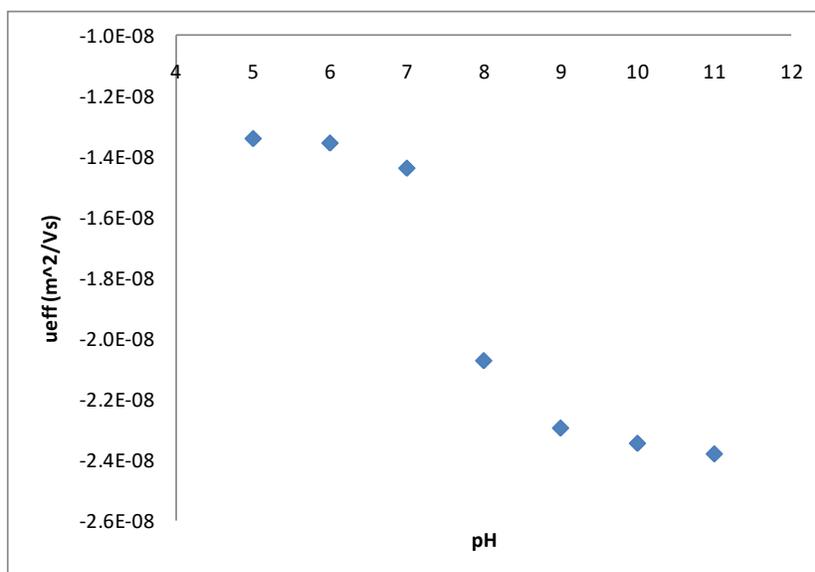


Figura 2.4. Movilidad efectiva del azul de bromotimol en función del pH

Para corroborar esta idea, en la Figura 2.5 se presenta el diagrama de distribución de especies con el valor de pK_A reportado para el azul de bromotimol, que es de 8.16 [17] y estas fracciones se comparan con la movilidad efectiva obtenida en el intervalo de pH.

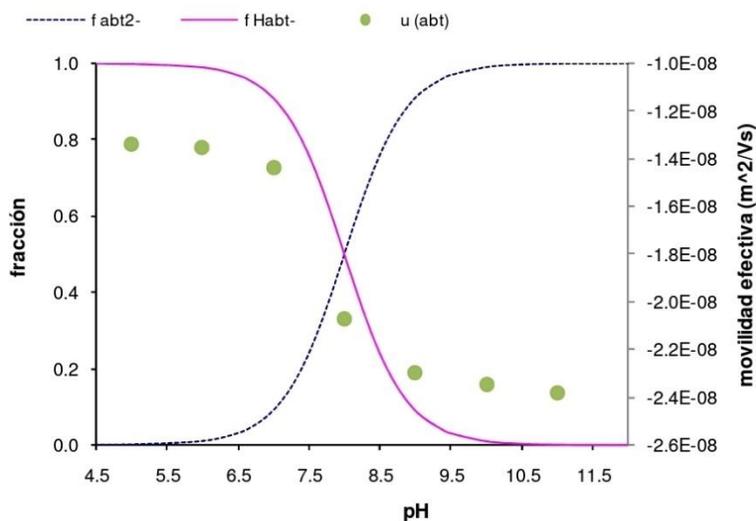


Figura 2.5. Comparativo del comportamiento de la movilidad efectiva (marcadores) y la fracción de la distribución de especies (línea) del azul de bromotimol con respecto al pH. La movilidad está referida al eje secundario.

En una gráfica de distribución de fracciones de especies, el cruce entre éstas indica la presencia de una constante de equilibrio entre dos especies, en este caso particular, la especie mono-aniónica del azul de bromotimol ($Habt^-$), está en la misma fracción que la especie di-aniónica (abt^{2-}), el valor de pH de este cruce se asocia al valor de la constante de equilibrio. En la Figura 2.5 se puede observar que el cambio marcado en la movilidad (marcadores) se tiene, precisamente en la zona donde se observa también el cruce de las fracciones de las especies, por lo que se puede afirmar que a partir del comportamiento de la movilidad efectiva con respecto al pH de un analito ionizable se pueden observar la presencia de valores de constantes de acidez.

Un estudio similar se realizó para los indicadores: rojo de fenol (rf), rojo de cresol (rc) y azul de timol (at), los cuales, como ya se mencionó, pertenecen junto con el azul de bromotimol (abt), a las sulfonftaleínas y que difieren entre ellos por los grupos funcionales que se van adicionando a los anillos fenólicos.

Los valores de constantes de acidez reportados son: **7.69 para el rojo de fenol, 7.87 para el rojo de cresol, 9.50 para el azul de timol y 8.16 para el azul de bromotimol [17]** como se muestra en la Tabla 2.3. Adicionalmente se muestra la carga en cada pH, de acuerdo con el valor de pK_A para cada indicador.

Tabla 2.3. Valor de la carga eléctrica para cada indicador en el intervalo de pH estudiado, también se muestra el valor del pK_A de cada uno; rf (rojo de fenol), rc (rojo de cresol), at (azul de timol) y abt (azul de bromotimol).

Valor de la carga eléctrica promedio de acuerdo al pH				
pH	Rf	rc	at	abt
5	-1	-1	-1	-1
6	-1	-1	-1	-1
7	-1	-1	-1	-1
8	-2	-2	-1	-1
9	-2	-2	-1	-2
10	-2	-2	-2	-2
11	-2	-2	-2	-2
pK_A	7.69	7.87	9.50	8.00

Los datos de carga se corroboran con los electroferogramas obtenidos ya que, la señal correspondiente a los indicadores, se observa después de la acetona y esto indica que se encuentran predominantemente en forma aniónica en estos valores de pH (Ver Figura 2.6).

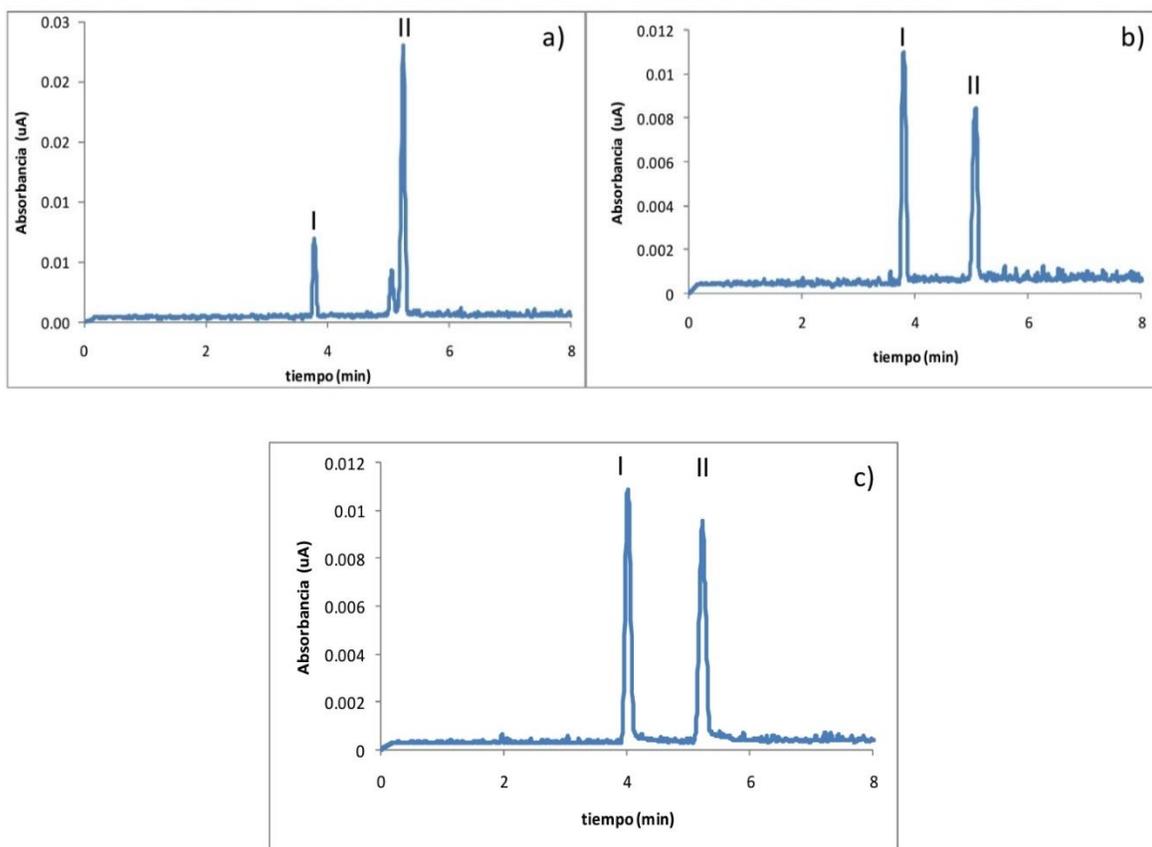


Figura 2.6. Electroferogramas obtenidos para cada uno de los indicadores a pH 7: a) rojo de fenol, b) rojo de cresol, c) azul de timol. El pico I corresponde a la acetona, el pico II al indicador correspondiente.

De igual manera que se hizo con el azul de bromotimol, se calcularon las movilidades efectivas de los demás indicadores; en la Tabla 2.4 se resumen dichas movilidades a cada valor de pH en el intervalo estudiado. Aquí se observa la tendencia en la relación carga/masa, es decir, la movilidad del rojo de fenol que es el indicador de menor masa es mayor que la del azul de timol y del azul de bromotimol, que son compuestos con mayor masa y por lo tanto son más lentos; y comparable con la del rojo de cresol, cuya masa es similar, lo anterior tomando en cuenta el intervalo donde todos tienen una carga negativa. Además, se observa que cuando han perdido un protón más, es decir cuando ganan dos cargas negativas, su movilidad aumenta casi al doble.

Tabla 2.4. Movilidades efectivas (u_{eff}) obtenidas para los cuatro indicadores en el intervalo de pH estudiado; rf (rojo de fenol); rc (rojo de cresol), at (azul de timol), abt (azul de bromotimol).

$u_{eff} \times 10^8 \text{ (m}^2\text{/Vs)}$				
pH	rf	rc	at	abt
5	-1.777	-1.764	-1.448	-1.339
6	-1.836	-1.687	-1.440	-1.340
7	-1.859	-1.749	-1.448	-1.437
8	-2.369	-2.213	-1.558	-2.072
9	-2.372	-2.738	-1.648	-2.294
10	-2.459	-2.978	-2.357	-2.345
11	-2.486	-2.982	-2.682	-2.380

Esta tendencia se observa en general para todos los analitos ionizables, es decir, la magnitud de la movilidad de un catión comparada con el anión de un mismo analito será la misma (aunque con signo contrario) y aumentará al doble cuando la carga aumente en una unidad.

También se graficó la distribución de fracciones de especies para cada indicador, de acuerdo con los valores de pK_A mencionados con anterioridad (Tabla 2.3) y, de igual manera que con azul de bromotimol, se compararon con el comportamiento de la movilidad efectiva en función del pH, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 2.7.

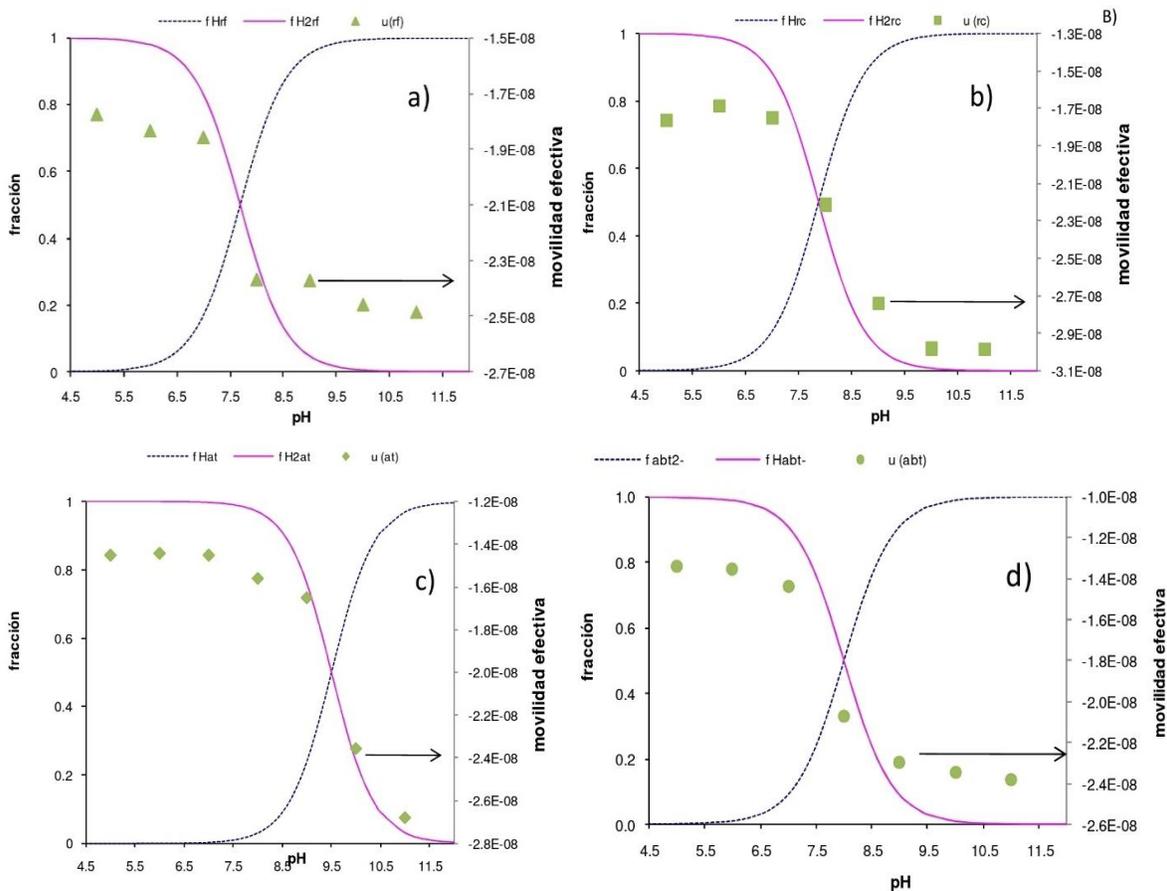


Figura 2.7. Comparativo del comportamiento de la movilidad efectiva (marcadores) y la fracción de la distribución de especies (línea) de: a) rojo de fenol (rf), b) rojo de cresol (rc), c) azul de timol (at) y d) azul de bromotimol (abt), con respecto al pH. La movilidad está referida al eje secundario.

Analizando esta Figura 2.7 se pueden hacer conclusiones similares a las obtenidas en la Figura 2.4 para el indicador azul de bromotimol, ya que, para el resto de los indicadores se observa un cambio marcado en la movilidad efectiva cuando se tiene el cruce en las fracciones de las especies, permitiendo aseverar nuevamente que este cambio en el comportamiento de la movilidad se debe a la presencia de una constante de equilibrio entre dos especies.

Hasta aquí se ha demostrado que cambios marcados en el comportamiento de la movilidad efectiva con respecto al pH, indican la presencia de constantes de equilibrio, con esto surge la necesidad de plantear una forma de hacer un ajuste de los datos experimentales para determinar el valor de dichas constantes. Sin embargo, también se ha observado que dicho comportamiento de la movilidad con respecto al pH no es lineal. Este comportamiento

se debe a que la movilidad es un parámetro que está ponderado por la fracción de las especies del analito presentes en el sistema de acuerdo con la relación [13]:

$$u_{eff} = \sum_i \chi_i u_i \quad (2.3)$$

Cuando se tiene un sistema con un equilibrio de acidez, como en el caso de los indicadores mostrados, se puede plantear el siguiente equilibrio:



Donde I^{2-} y HI^- son las especies del indicador di-anión y mono-anión, respectivamente.

Este equilibrio tiene una constante asociada que está dada por:

$$k = \frac{[H^+][I^{2-}]}{[HI^-]} \quad (2.5)$$

Por otro lado, al sustituir en la ecuación (2.3), las especies de los indicadores y sus movilidades respectivas tenemos que:

$$u_{eff} = \frac{[HI^-]}{[HI^-] + [I^{2-}]} u_{HI^-} + \frac{[I^{2-}]}{[HI^-] + [I^{2-}]} u_{I^{2-}} \quad (2.6)$$

Donde u_{HI^-} y $u_{I^{2-}}$ son las movilidades asociadas a la especie monoaniónica y di-aniónica, respectivamente.

Sustituyendo la concentración de la especie HI^- , que se encuentra a partir de la ecuación (2.5), en la relación anterior (2.6), se obtiene la ecuación:

$$u_{eff} = \frac{[H^+]u_{HI^-} + ku_{I^{2-}}}{[H^+] + k} \quad (2.7)$$

La k en la relación (2.7) es la constante de acidez buscada y como se observa se tiene la dependencia en el pH mediante la concentración de iones hidronio, $[H^+]$.

Esta ecuación (2.7) puede programarse en un método computacional que permita el ajuste de los parámetros que se tienen en ella; es decir, el programa de cómputo debe ser capaz de proporcionar, además del valor de k , las movilidades de las especies, en este caso u_{HI^-} y $u_{I^{2-}}$.

La determinación de constantes de acidez, usando espectrofotometría, también puede requerir del uso de programas que realizan refinamientos de varios parámetros experimentales y que realizan ajustes no lineales. En el área de trabajo de Química Analítica se utiliza el programa SQUAD [29,30] con este fin. Si bien, SQUAD es un programa que se alimenta con valores de absorbancia y pH se pensó que las ecuaciones de la Ley de Aditividad (para Absorbancias) y la de movilidad efectiva, son matemáticamente parecidas, y por tanto podría funcionar para el refinamiento de datos de movilidad en función del pH como se describe a continuación.

2.3.1 PROPIEDADES QUE TIENEN DEPENDENCIA LINEAL CON LA CONCENTRACIÓN O CON LAS FRACCIONES DE ESPECIES

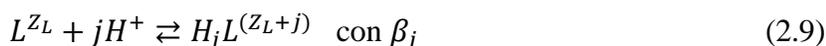
Existen varias propiedades fisicoquímicas las cuales, en condiciones controladas muestran un comportamiento lineal con la concentración de las especies que producen una respuesta, R . este comportamiento lineal puede representarse mediante la ecuación (2.8).

$$R = R_1 + R_2 + \dots + R_n = k_1 C_1 + k_2 C_2 + \dots k_n C_n \quad \dots\dots\dots(2.8)$$

Donde R es la respuesta total del sistema, R_i , es la contribución de cada especie a la respuesta, mientras que C_i y k_i son las contribuciones de cada especie a la respuesta total del factor de respuesta y la concentración de la i -ésima especie respectivamente.

Si las especies están relacionadas a través de un equilibrio químico rápido, o bien un intercambio cinético, debe entenderse que la respuesta total es una media ponderada por la contribución de todas las especies presentes en el sistema y dicha ponderación está dada por una fracción de las especies.

Por ejemplo, si las especies L^{Z_L} , $HL^{(Z_L+1)}$, ..., $H_jL^{(Z_L+j)}$, ..., $H_nL^{(Z_L+n)}$, están relacionadas mediante el equilibrio de formación global, definido por la ecuación (2.9):



donde $j \in \{1, 2, \dots, n\}$

Es posible calcular las fracciones molares de las especies, de acuerdo a [27]:

$$f_0 = f_L \equiv \frac{[L^{Z_L}]}{[L']} = \left(\frac{1}{1 + \beta_1[H^+] + \beta_2[H^+]^2 + \dots + \beta_j[H^+]^j + \dots + \beta_n[H^+]^n} \right) \quad (2.10)$$

Además:

$$f_j = f_{H_jL} \equiv \frac{[H_jL^{(Z_L+j)}]}{[L']} = f_0 \beta_j [H^+]^j$$

Donde L' representa la suma de las concentraciones de la especie (n+1) del componente L en el sistema. Las fracciones de las especies dadas por la ecuación (2.10) pueden ser ponderadas por la media (también ponderada) de algunas propiedades.

2.3.2. ABSORBANCIA EN ESPECTROFOTOMETRÍA

Los estudios que se realizan por espectroscopia requieren que el analito estudiado observe la ley de la Aditividad que idealmente, establece que la absorbancia total se debe a la suma de la absorbancia de cada especie química presente en el sistema. Entonces, la absorbancia del sistema a una determinada longitud de onda ($A^{(\lambda)}$) y una longitud de paso óptico, (ℓ) sigue la relación:

$$\begin{aligned}
 A^{(\lambda)} &= A_L^{(\lambda)} + A_{HL}^{(\lambda)} + \dots + A_{H_jL}^{(\lambda)} + \dots + A_{H_nL}^{(\lambda)} = \\
 &= \epsilon_L^{(\lambda)} \ell [L^{z_L}] + \epsilon_{HL}^{(\lambda)} \ell [HL^{(z_L+1)}] + \dots + \epsilon_{H_jL}^{(\lambda)} \ell [H_jL^{(z_L+j)}] + \dots + \epsilon_{H_nL}^{(\lambda)} \ell [H_nL^{(z_L+n)}] = \\
 &= \epsilon_L^{(\lambda)} \ell f_L [L'] + \epsilon_{HL}^{(\lambda)} \ell f_{HL} [L'] + \dots + \epsilon_{H_jL}^{(\lambda)} \ell f_{H_jL} [L'] + \dots + \epsilon_{H_nL}^{(\lambda)} \ell f_{H_nL} [L'] = \\
 &= \left(\epsilon_L^{(\lambda)} f_L + \epsilon_{HL}^{(\lambda)} f_{HL} + \dots + \epsilon_{H_jL}^{(\lambda)} f_{H_jL} + \dots + \epsilon_{H_nL}^{(\lambda)} f_{H_nL} \right) \ell [L'] = \epsilon_{L'}^{(\lambda)} \ell [L']
 \end{aligned} \tag{2.11}$$

Por tanto, la ecuación (2.11) demuestra que la absorbancia o el coeficiente de absorptividad molar de L' puede escribirse como la media ponderada de las fracciones molares de todas las especies en el sistema.

2.3.3. CAMBIOS QUÍMICOS EN RMN CON INTERCAMBIO QUÍMICO RÁPIDO

Cuando en Resonancia Magnética Nuclear (RMN), se encuentra presente un intercambio rápido de H^+ (u OH^-) en el equilibrio (ecuación 2.9), los cambios químicos del mismo núcleo (N_i , diferente de H) en L' , también muestran un comportamiento lineal que está dado por la ecuación (2.12).

$$N_i \delta_{L'} = N_i \delta_L f_L + N_i \delta_{HL} f_{HL} + \dots + N_i \delta_{H_jL} f_{H_jL} + \dots + N_i \delta_{H_nL} f_{H_nL} \tag{2.12}$$

Esto se debe a que los cambios químicos están ponderados por la abundancia relativa de las especies, debido a que el núcleo responde al ambiente químico que lo rodea.

2.3.4. CONDUCTIVIDAD EQUIVALENTE Y MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA

La movilidad electroforética (u_{H_jL}) de una especie eléctricamente cargada ($L^{Z_{H_jL}}$) está dada por la ecuación 2.13 [34]:

$$Z_L \lambda_L = F u_L \quad (2.13)$$

Donde Z_{H_jL} es la carga de las especies $H_jL^{Z_{H_jL}}$, λ_{H_jL} es equivalente a la conductividad y F es la constante de Faraday.

Ahora bien, para un conjunto de especies definido por la ecuación (2.9), cuyo equilibrio es más rápido que su movimiento debido al campo eléctrico aplicado, la movilidad electroforética seguirá una relación del tipo [28]:

$$u_{L'} = u_L f_L + u_{HL} f_{HL} + \dots + u_{H_jL} f_{H_jL} + \dots + u_{H_nL} f_{H_nL} \quad (2.14)$$

Sustituyendo la ecuación (2.13) en la (2.14), se puede demostrar que:

$$u_{L'} = \frac{Z_L \lambda_L}{F} f_L + \frac{Z_{HL} \lambda_{HL}}{F} f_{HL} + \dots + \frac{Z_{H_jL} \lambda_{H_jL}}{F} f_{H_jL} + \dots + \frac{Z_{H_nL} \lambda_{H_nL}}{F} f_{H_nL} \quad (2.15)$$

Esta relación (2.15), prueba que la movilidad electroforética de L' es, igual que las propiedades anteriores, una media ponderada de las movilidades electroforéticas de las especies, cuya ponderación es igual (o está dada) por las fracciones molares de las especies.

Más aún, si las conductividades equivalentes de cada una de las especies son lo suficientemente cercanas entre ellas, entonces se tiene:

$$\frac{\lambda_L}{F} \approx \frac{\lambda_{HL}}{F} \approx \dots \approx \frac{\lambda_{H_jL}}{F} \approx \dots \approx \frac{\lambda_{H_nL}}{F} = \frac{\lambda}{F} \dots \dots \dots (2.16)$$

La ecuación anterior acepta la aproximación dada en la ecuación (2.17):

$$u_{L'} \approx \left(Z_L f_L + Z_{HL} f_{HL} + \dots + Z_{H_j L} f_{H_j L} + \dots + Z_{H_n L} f_{H_n L} \right) \frac{\lambda}{F} \approx \bar{Z} \frac{\lambda}{F} \quad (2.17)$$

La relación (2.17) presenta la movilidad electroforética de L' como una media ponderada cuya ponderación está dada por la carga eléctrica de la fracción de las especies y además demuestra que es, en principio, directamente proporcional al promedio de la carga eléctrica \bar{Z} .

Debido al isomorfismo entre las ecuaciones (2.11), y (2.12) con la relación (2.14), se pretende hacer el ajuste de los datos experimentales de movilidad con la ayuda del programa SQUAD [31].

En vista de que el programa está hecho para que sea alimentado con espectros de absorbancia a diferentes valores de pH, se deben tener algunas consideraciones para lograr un buen ajuste de los datos de movilidad.

Primeramente, las magnitudes de las movilidades, como se observó en el caso de los indicadores, están en el orden de 10^{-8} , mientras que las absorbancias experimentales se mantienen en el orden de 10^{-1} o bien, llegan a las unidades; por lo tanto, los datos de movilidad introducidos deben de multiplicarse por un factor de 10^8 (o 10^9 si se requiere), para que el orden de magnitud que permite el programa en las absorbancias se conserve.

En segundo lugar, se debe considerar que un espectro de absorbancia consta de muchos puntos, por lo que, al introducir los valores de movilidad en lugar de un espectro de absorbancia completo, se deben especificar, al menos dos valores, los cuales se tomarán de las repeticiones que se hagan para cada valor de pH.

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores, los datos de movilidad obtenidos para los indicadores se alimentaron al programa SQUAD para obtener los valores de las constantes de acidez buscadas los cuales se muestran en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Valores de las constantes de acidez encontradas con SQUAD para los cuatro indicadores estudiados. S es la desviación estándar asociada.

Indicador	pK_A	S
Rojo de fenol (rc)	7.5166	0.1409
Rojo de cresol (rc)	8.2332	0.0523
Azul de timol (at)	9.6696	0.0549
Azul de bromotimol (abt)	7.6735	0.0573

Tabla 2.6. Valores obtenidos por el refinamiento con SQUAD para las movilidades de las especies de cada uno de los indicadores, con su correspondiente desviación estándar (S).

Indicador	u_{HI^-}	$S(u_{HI^-})$	$u_{I^{2-}}$	$S(u_{I^{2-}})$
Rojo de fenol	-1.77E-08	3.82E-10	-2.46E-08	3.26E-10
Rojo de cresol	-1.71E-08	2.42E-10	-2.97E-08	2.62E-10
Azul de timol	-1.46E-08	1.85E-10	-2.75E-08	3.39E-10
Azul de bromotimol	-1.32E-08	2.36E-10	-2.36E-08	2.12E-10

Tabla 2.7. Comparativo de los valores de pK_A de los cuatro indicadores. (*) Obtenidos con el ajuste por SQUAD, (**) Reportados [18].

Indicador	pK_A (*)	pK_A (**)
Rojo de fenol (rc)	7.5166	7.69
Rojo de cresol (rc)	8.2332	7.87
Azul de timol (at)	9.6696	9.50
Azul de bromotimol (abt)	7.6735	8.00

Con los valores de constantes de acidez obtenidos, más los valores de movilidades de las especies I^{2-} y HI^{-} (ver Tabla 2.6), los cuales también proporciona SQUAD, se hace el ajuste de los datos experimentales obtenidos para cada indicador y éstos se muestran en la Figura 2.8.

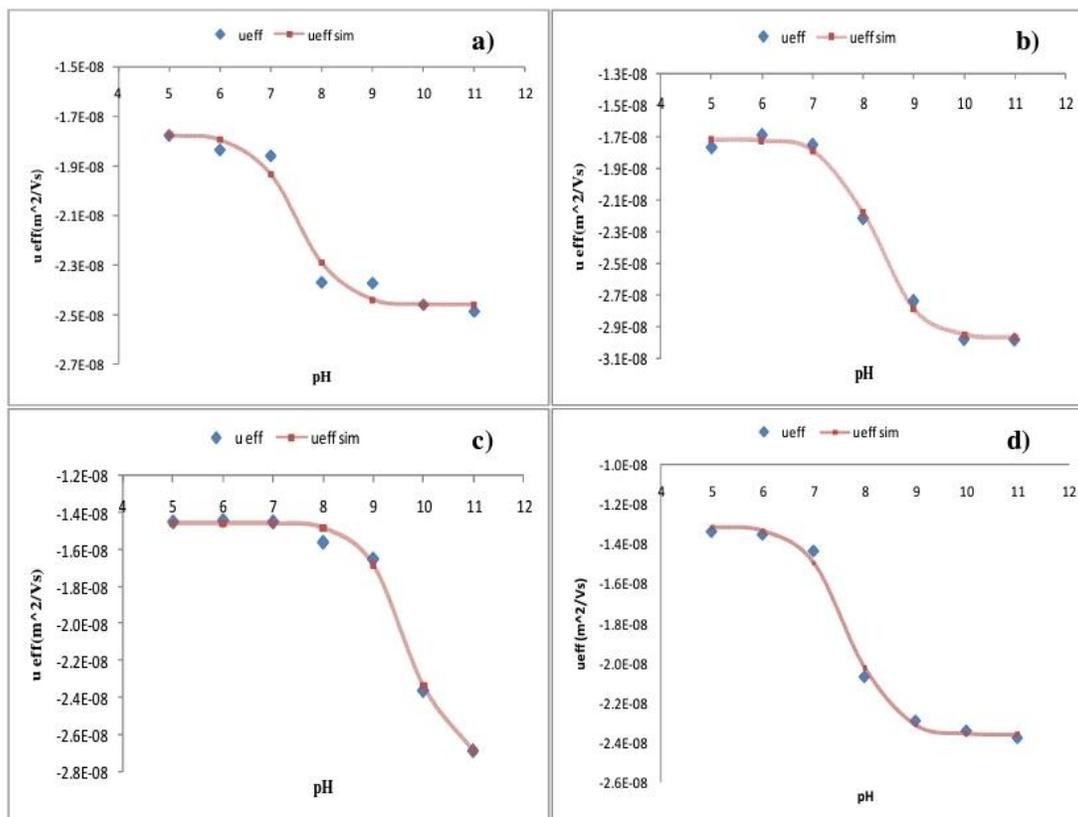


Figura 2.8. Ajuste de los datos experimentales de movilidad (marcadores) con los valores simulados a partir de los parámetros obtenidos con SQUAD (línea), para cada uno de los indicadores: a) rojo de fenol, b) rojo de cresol, c) azul de timol, d) azul de bromotimol.

Con los datos de la Tabla 2.5, se obtienen los límites de confianza asociados a estos valores de pK_A , obtenidos al 95% de confianza, para cada uno de los indicadores. Los resultados se muestran en la Tabla 2.8

Tabla 2.8. Valores de pK_A obtenidos con SQUAD, para los indicadores estudiados, con su intervalo de confianza (al 95%), para dos grados de libertad.

Indicador	pK_A
Rojo de fenol (rc)	7.5166 ± 0.3498
Rojo de cresol (rc)	8.2332 ± 0.1298
Azul de timol (at)	9.6696 ± 0.1363
Azul de bromotimol (abt)	7.6735 ± 0.1423

También se realizó una prueba t [37], para comparar los valores obtenidos con esta metodología, con los reportados (ver Tabla 2.7); considerando dos grados de libertad (ya que $n=3$), se obtienen los valores mostrados en la Tabla 2.9.

Tabla 2.9. Valores de $|t|$ para contrastar los valores de las constantes obtenidas comparadas con los valores reportados, considerando dos grados de libertad.

Indicador	$ t $
Rojo de fenol (rc)	0.86
Rojo de cresol (rc)	4.85
Azul de timol (at)	2.16
Azul de bromotimol (abt)	3.98

El valor crítico de t para un intervalo de confianza del 95% y dos grados de libertad es $t_{2}=4.30$ [37], entonces, de acuerdo a los datos mostrados en la Tabla 3.9, la prueba se rechaza únicamente para el indicador rojo de cresol, lo que nos indica que con la metodología propuesta se pueden determinar valores de constantes de acidez y éstos pueden ser comparables con los obtenidos por otros métodos.

Sin embargo, en los ajustes mostrados en la Figura 2.7 se puede observar que, en la zona del cambio en la movilidad, en ocasiones la curva modelada cambia de pendiente antes (o después), que los valores experimentales, lo que se puede decir sobre esto es que se deben,

por supuesto hacer más experimentos (más valores de pH y más puntuales) justo en esta zona de cambio de pendiente. Esto con el fin de aseverar que se estará observando el cambio correcto de pendiente entre los valores experimentales y la simulación; y con esto, claro, se obtendrá un valor de pK_A más preciso.

Por todo lo anterior, en el capítulo siguiente se muestra la aplicación de esta metodología a dos familias de fármacos.

DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ, POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA, DE OXICAMS Y DE NUEVOS FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS

3.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo en este capítulo es la aplicación de la metodología desarrollada para el cálculo de constantes de acidez mediante electroforesis capilar, que se detalló en el capítulo anterior, con la finalidad de determinar las constantes de equilibrios de acidez de fármacos.

Las propiedades ácido-base de los fármacos son de gran importancia en farmacología ya que de esto depende su biodisponibilidad en el organismo, así como la cinética y respuesta clínica que generaran.

Para la aplicación de la metodología se seleccionaron dos familias de fármacos; unos ya conocidos y con algunas propiedades ácido-base ya determinadas: los *oxicams*. La otra familia de fármacos son antihipertensivos de reciente creación, sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC), a cargo del Dr. Enrique Angeles; a estos fármacos, en adelante se les denominará como **LQM's**, por las siglas del laboratorio donde se han sintetizado.

Los *oxicams* son una familia de fármacos de los llamados AINE (Antiinflamatorios No Esteroidales) que tienen tres efectos principales: antiinflamatorio, analgésico y antipirético, en general se usan para reducir el dolor en diferentes tipos de artritis y en condiciones post- operatorias. Fueron introducidos para reducir la toxicidad gastrointestinal relacionada con la inhibición de prostaglandinas.

Esta familia de fármacos fue diseñada según el concepto de reemplazo isoestérico, es decir que se reemplazan grupos o fragmentos del compuesto inicial con grupos de características estereoelectrónicas similares, con el fin de mejorar las propiedades del fármaco [25]. Estos fármacos no solo son importantes por su gran potencial terapéutico sino también por sus propiedades químicas, que son interesantes en virtud de sus características estructurales dinámicas, las cuales los hacen extremadamente sensibles a su microambiente [26]. La familia que se estudió en el presente trabajo está compuesta por: *piroxicam*, *tenoxicam*, *meloxicam*, *lornoxicam* e *isoxicam*.

Los *LQM's* son una familia de derivados de compuestos piperidínicos y tiomorfolínicos los cuales, como ya se mencionó, presentan propiedades antihipertensivas y menor toxicidad que los fármacos prescritos actualmente para la hipertensión arterial. Como en la mayoría de los fármacos creados en la actualidad, se sintetizaron varios compuestos con diferentes grupos funcionales que se adicionan al esqueleto piperidínico o tiomorfolínico. En el presente trabajo se determinaron las constantes de acidez de cuatro *LQM's* derivados de compuestos piperidínicos cuyas claves son: *LQM344*, *LQM345*, *LQM346* y *LQM351*. Se pretende corroborar y sustentar los valores determinados por electroforesis capilar con los ya obtenidos por espectrofotometría UV-Visible [35].

3.2. PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 REACTIVOS

Los fosfatos utilizados para preparar los buffers fueron: NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 de Fluka (99% de pureza), el Na_3PO_4 de Aldrich (96% de pureza); el H_3PO_4 fue proporcionado por J.T. Baker (85.4% de pureza). El agua utilizada, para preparar soluciones, se obtuvo de un desionizador MilliQ de Millipore, con una resistividad de 18.2 $\text{M}\Omega$ cm.

El piroxicam, el tenoxicam y el isoxicam utilizados fueron de grado reactivo proporcionados por Sigma, el meloxicam fue proporcionado por los laboratorios Boehringer Ingelheim;

El lornoxicam no se encontró disponible en grado reactivo por lo que se extrajo de unos comprimidos (Bosporón, 8 mg) de los laboratorios Tedec-Meiji Farma, S.A. El proceso de extracción consistió en moler un comprimido en el mortero y este polvo se disolvió en aproximadamente 5 mL de una solución de NaOH (0.1 M), con agitación durante 10 minutos. Esta solución se dejó decantar toda la noche. Al día siguiente se procedió a la filtración (por vacío), con papel filtro #40 y la solución obtenida se filtró nuevamente con papel filtro #42. Finalmente, de esta última solución filtrada se tomó una alícuota de 1.0 mL y se aforó a 5 mL con agua desionizada.

El *LQM344*, *LQM345*, *LQM346* y *LQM351* fueron proporcionados por el Dr. Enrique Angeles.

3.2.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

El electrolito soporte utilizado en este estudio fue buffer de fosfatos en concentración 0.05 M (50 mM), el cual se preparó a partir de soluciones patrón de NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Na_3PO_4 y H_3PO_4 de concentración 0.1 M. Para cada valor de pH requerido se mezclaron los volúmenes adecuados del par ácido/base apropiado, aforando a 25 mL con agua desionizada. El pH se ajustó con soluciones de NaOH y HCl, según fuera necesario.

Las soluciones de los *oxicams* (con excepción del lornoxicam), se prepararon disolviendo aproximadamente 5 miligramos del fármaco en 1.0 mL de solución de NaOH (0.1 M) y se aforaron después a 25 mL con agua desionizada. Para el lornoxicam, la solución

usada como muestra de inyección es la última que se menciona en el proceso de extracción descrito en la sección anterior.

Las soluciones de *oxicams* descritas se utilizaron como muestras de inyección, poniendo en un vial 200 μ L de dicha solución con 20 μ L de acetona como marcador del flujo electroosmótico. Cada *oxicam* se inyectó por separado.

Las soluciones de los *LQM's* se prepararon disolviendo aproximadamente 5 miligramos del fármaco en 1.0 mL de metanol y se aforaron a 5.0 mL con buffer de fosfatos (0.05 M, pH=6.8). La muestra inyectada consistía en 200 μ L de esta solución con 20 μ L de acetona como marcador del flujo electroosmótico. Cada fármaco se inyectó por separado.

3.2.3 CARACTERÍSTICAS Y ACONDICIONAMIENTO DEL CAPILAR

El acondicionamiento hecho al capilar, tanto para capilares nuevos, como el acondicionamiento requerido antes de la introducción de la muestra, se describe en la sección 1.3.1 correspondiente al capítulo I de esta tesis.

En cuanto a las características; para el caso de los *oxicams* se empleó un capilar de sílice de 50 μ m de diámetro interno con una longitud total de 50 cm y una longitud efectiva de 40 cm; para los *LQM's* el capilar de sílice, empleado tenía 50 μ m de diámetro interno con una longitud total de 31 cm y una longitud efectiva de 20 cm.

3.2.4 PARÁMETROS EXPERIMENTALES

La inyección de las muestras se hizo de forma hidrodinámica a 1.0 *psi* durante 5 segundos, del lado del ánodo, excepto para valores de pH menores a 4, donde la inyección se hizo por el cátodo (lado corto del capilar), para todos los fármacos analizados. Todos los experimentos se realizaron con el capilar a una temperatura de 25 °C

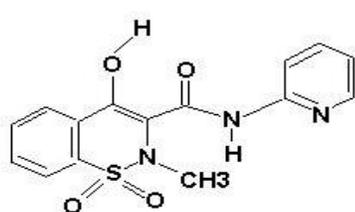
El voltaje aplicado fue de 20 kV, utilizando polaridad invertida sólo para valores de pH menores a 4. Las longitudes de onda monitoreadas se seleccionaron de acuerdo a los máximos que presentaba cada fármaco en su espectro de absorción.

Se hicieron, al menos, tres repeticiones para cada valor de pH, en cada uno de los fármacos. Las movilidades electroforéticas efectivas (u_{eff}) se calcularon como la diferencia entre la movilidad aparente (u_{app}) de cada compuesto y la movilidad del marcador neutro (u_{eof}), tomando en cuenta las longitudes total y efectiva del capilar, (descritas en la sección anterior), así como el voltaje aplicado. Cuando se aplicó el voltaje con polaridad inversa, se consideró una longitud efectiva de 10 cm.

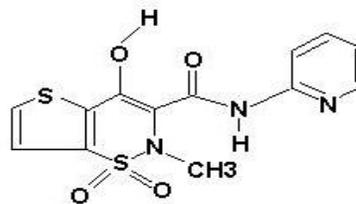
3.3. RESULTADOS

3.3.1 OXICAMS

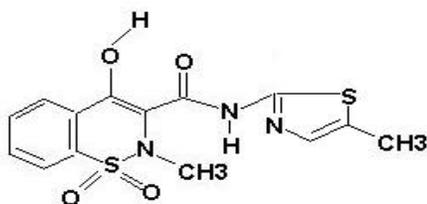
De acuerdo con su estructura química, (Figura 3.1), se puede elucidar la presencia de dos valores de pKA, para cada *oxicam*.



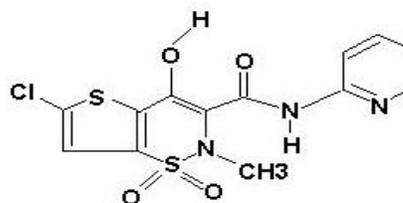
piroxicam



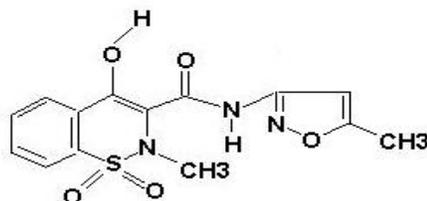
tenoxicam



meloxicam



lornoxicam



isoxicam

Figura 3.1. Estructura de los oxicams

En la Figura 3.2 se presentan las movilidades efectivas obtenidas para cada *oxicam* y su comportamiento con el pH.

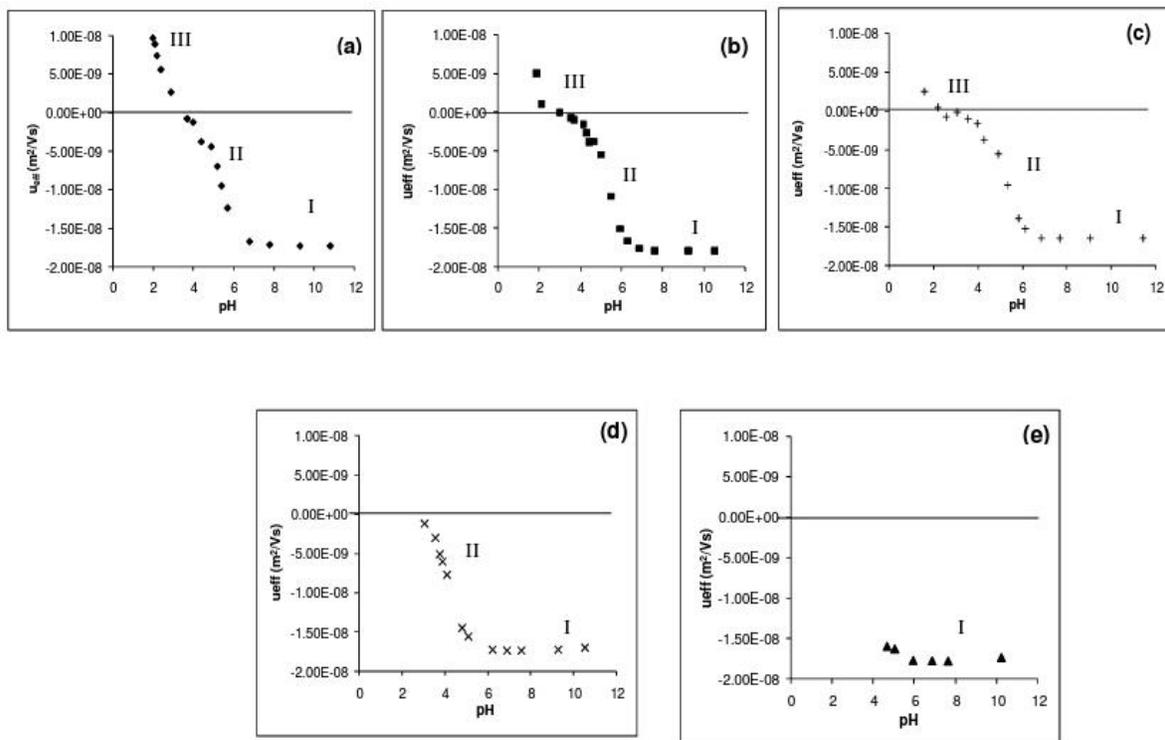


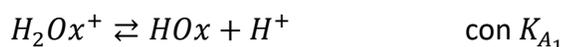
Figura 3.2. Movilidad efectiva (u_{eff}) como función del pH para: a) piroxicam, b) tenoxicam, c) lornoxicam, d) meloxicam, e) isoxicam.

En esta Figura 3.2 se observan dos puntos de inflexión en el comportamiento de la movilidad con el pH; de acuerdo con lo analizado en el capítulo II de este trabajo, cada una de estas inflexiones indica la presencia de un valor de pK_A . Entonces, se observa que cuando la especie predominante es el anión, a valores altos de pH, la movilidad es prácticamente constante (zona I). Cuando se acerca el pH al primer valor de pK_A , la movilidad empieza a cambiar debido a que ya no predomina una sola especie, sino que se tiene un promedio entre ambas que afecta la movilidad efectiva hasta hacerse prácticamente constante en el valor de cero (zona II). Por último, se observa un último cambio marcado en la movilidad a valores ácidos en el pH (zona III), lo que indica la presencia de otro valor de pK_A . Si pudiéramos ver más en la zona ácida, se observaría la movilidad hacerse prácticamente constante, indicando el predominio de la especie catiónica.

Entonces, debido al comportamiento de la movilidad en el intervalo de pH estudiado, se puede suponer que efectivamente existen dos valores de pK_A para cada *oxicam*, como se había considerado previamente por su estructura química, sin embargo, el isoxicam y el meloxicam son poco solubles, de manera que sólo se determinará un valor de pK_A para estos compuestos ya que en la Figura 3.2, incisos *d)* y *e)*, sólo es posible observar el primer punto de inflexión, que corresponde a la zona de valores de pH entre neutros y básicos.

Para los otros tres fármacos se plantea un modelo con dos valores de pK_A para la descripción del comportamiento de la movilidad obtenido, esto implica la descripción de los equilibrios presentes en cada sistema. Dado que los compuestos son estructuralmente parecidos, se describirá a continuación el tratamiento general.

El primer equilibrio de acidez se tiene cuando se desprotona el grupo piridínico y la molécula queda neutra; el segundo equilibrio se tiene cuando se desprotona el grupo enol y la molécula se carga negativamente, entonces se tiene:



Ahora bien, tomando en cuenta, como ya se mencionó, que la movilidad está ponderada por las fracciones de las especies presentes, en este caso:

$$u_{eff} = f_{H_2Ox^+}u_{H_2Ox^+} + f_{HOx}u_{HOx} + f_{Ox^-}u_{Ox^-} \quad (3.1.1)$$

Donde u_{Ox^-} , u_{HOx} y $u_{H_2Ox^+}$ son las movilidades de la especie desprotonada, de la neutra y de la protonada, respectivamente. Se debe hacer notar que la movilidad de la especie neutra

(u_{HOx}) se considera igual a cero, ya que la fracción presente de esta especie migra junto con el flujo electrosmótico.

De acuerdo con esto, en la Figura 3.3 se presenta el ajuste de los datos experimentales (marcadores) mediante el modelo matemático de la ecuación 3.1.1 (línea continua), los parámetros de movilidad se determinaron con el programa SQUAD.

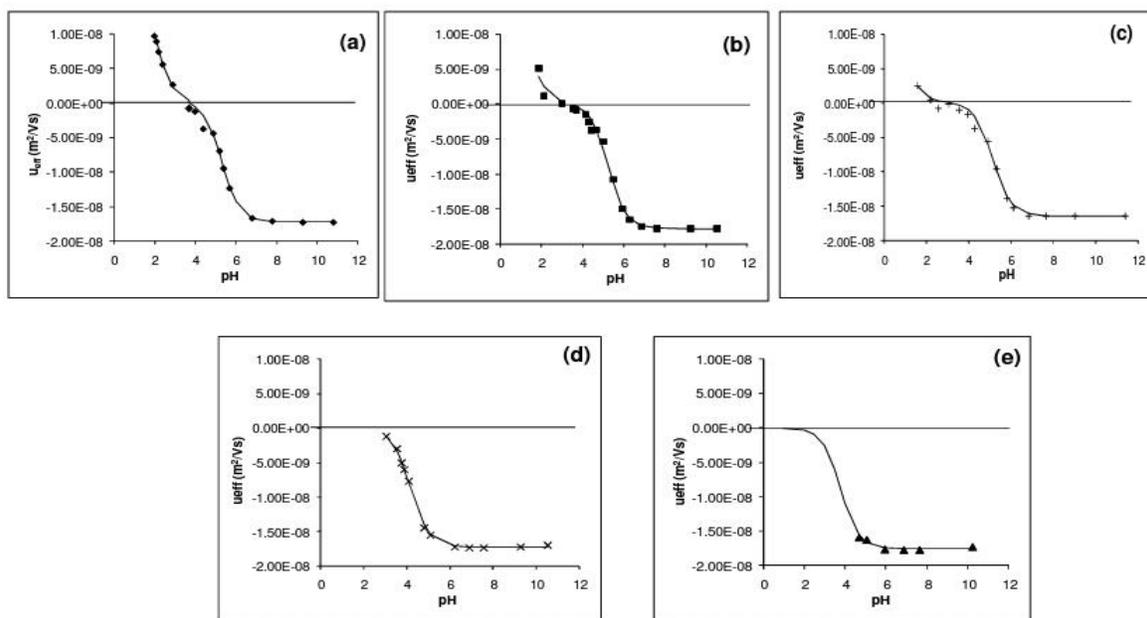


Figura 3.3 Comparación del comportamiento experimental de la movilidad (marcadores), con el simulado (línea); para a) piroxicam, b) tenoxicam, c) lornoxicam, d) meloxicam, e) isoxicam.

Se puede observar que el comportamiento modelado está de acuerdo al comportamiento experimental. Los valores de las constantes obtenidas mediante este ajuste de regresión no lineal se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Valores de pK_A obtenidos para los oxicams estudiados, de acuerdo a los refinamientos realizados con el programa SQUAD.

	pK _{A1}	pK _{A2}
Piroxicam	2.119 ± 0.030	5.309 ± 0.025
Tenoxicam	1.342 ± 0.059	5.268 ± 0.026
Lornoxicam	0.980 ± 0.117	5.131 ± 0.034
Meloxicam	-----	4.170 ± 0.011
Isoxicam	-----	3.781 ± 0.062

Las movilidades efectivas calculadas para las especies aniónicas en el proceso de refinamiento se muestran en la Tabla 3.2. En todos los casos se asume que la movilidad efectiva de las especies catiónicas es igual al correspondiente valor aniónico, tal como se asume en la relación (2.16) del capítulo II del presente trabajo.

Tabla 3.2. Valores de movilidad de las especies de los oxicams (10^8) en unidades del SI ($m^2 V^{-1} s^{-1}$), de acuerdo a los refinamientos realizados con el programa SQUAD. * este parámetro se estimó a partir de la ecuación (2.16, capítulo II) y se mantuvo constante durante los refinamientos por SQUAD.

	H ₂ Ox ⁺	HOx	Ox ⁻
Piroxicam	1.72 *	0 *	-1.724 ± 0.073
Tenoxicam	1.78 *	0 *	-1.789 ± 0.075
Lornoxicam	1.65 *	0 *	-1.650 ± 0.102
Meloxicam	---	0 *	-1.730 ± 0.021
Isoxicam	---	0 *	-1.757 ± 0.275

En la Tabla 3.3 se muestran resultados encontrados en la literatura en condiciones similares (medio acuoso) o bien en mezclas de solventes, pero utilizando diferentes métodos de análisis.

Tabla 3.3. Comparativo de los valores de constantes de acidez reportadas para los oxicams utilizando diferentes métodos de análisis. UV= Valoración espectrofotométrica, P= Valoración potenciométrica, (*)Valores encontrados en el presente trabajo mediante el ajuste de la movilidad efectiva hecho con SQUAD.

	pK _{a1}	pK _{a2}	Método	Condiciones	Referencia
Piroxicam	1.86	5.46	UV	H ₂ O	[32]
		5.26 ± 0.01	P	H ₂ O/EtOH 1:1(v/v)	[25]
	2.119	5.309	CZE	H ₂ O	*
Tenoxicam	1.07	5.34	UV	H ₂ O	[32]
		4.95 ± 0.02	P	H ₂ O/EtOH 1:1(v/v)	[25]
	1.342	5.268	CZE	H ₂ O	*
Lornoxicam	0.85 ± 0.06	5.59	UV	H ₂ O	[25]
		4.69 ± 0.01	P	H ₂ O/EtOH 1:1(v/v)	[25]
	0.980	5.131	CZE	H ₂ O	*
Meloxicam	1.09	4.18	UV	H ₂ O	[33]
		4.24 ± 0.01	P	H ₂ O/EtOH 1:1(v/v)	[25]
	---	4.170	CZE	H ₂ O	*
Isoxicam		3.93	UV	H ₂ O	[32]
		4.85 ± 0.01	P	H ₂ O/EtOH 1:4(v/v)	[25]
	---	3.781	CZE	H ₂ O	*

Comparando los valores de la Tabla 3.3 para piroxicam, tenoxicam e incluso lornoxicam, ambos valores de las constantes de acidez son similares aun cuando el método usado es espectrofotométrico [25] o bien, las condiciones sean de un solvente menos polar como la mezcla de H₂O/EtOH, usando valoración potenciométrica [32]. Para el caso de isoxicam y meloxicam, tanto Bernhard y Zimmermand [25] así como Tsai y Carrupt [32], reportan sólo un valor de pK_A, usando métodos espectrofotométricos, los primeros y potenciométricos, los segundos; en este trabajo se determina también solo un valor de pK_A para estos oxicams, ya que presentan baja solubilidad en medio ácido, especialmente el isoxicam, como ya se discutió anteriormente.

A partir de las movilidades obtenidas para cada especie, se pueden obtener las conductividades iónicas equivalentes, de acuerdo con lo planteado en la ecuación (2.13) del capítulo II. La Tabla 3.4 muestra dichas conductividades, las cuales son razonables para iones cargados monovalentemente, comparando el valor con las conductividades de iones conocidos como el Na⁺ (50.11 cm²Ω⁻¹equiv⁻¹) [34].

Tabla 3.4. Valores de las conductividades iónicas equivalentes (λ_i) para la especie catiónica y aniónica de cada oxicam, obtenidas a partir de la ecuación (2.13) (ver capítulo II).

	$\lambda \times 10^3$ ($\text{m}^2\Omega^{-1}\text{equiv}^{-1}$)		λ ($\text{cm}^2\Omega^{-1}\text{equiv}^{-1}$)	
	H_2Ox^+	Ox^-	H_2Ox^+	Ox^-
Piroxicam	1.660	1.663 ± 0.070	16.60	16.63 ± 0.70
Tenoxicam	1.717	1.697 ± 0.071	17.17	16.97 ± 0.71
Lornoxicam	1.592	1.565 ± 0.096	15.92	15.65 ± 0.96
Meloxicam	---	1.641 ± 0.020	---	16.41 ± 0.20
Isoxicam	---	1.670 ± 0.260	---	16.70 ± 2.60

Cabe hacer notar que para las conductividades de las especies catiónicas no se reporta en la Tabla 3.4 su desviación estándar asociada, debido a que las movilidades a partir de las que se calculan fueron parámetros que se introdujeron y mantuvieron constantes durante el refinamiento hecho por SQUAD.

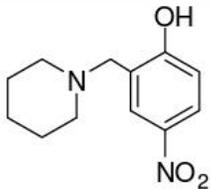
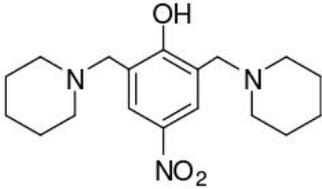
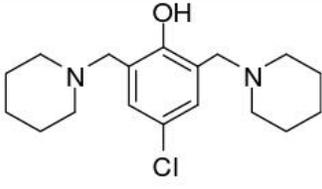
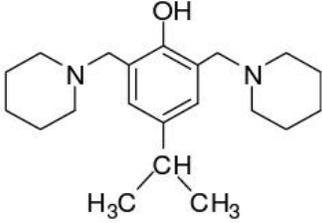
La presentación de estos resultados ha sido poco realizada y documentada en la literatura de las técnicas de electroforesis, y se obtiene de manera natural una vez que se conocen las movilidades de cada especie, además es un parámetro importante ya que indica la facilidad (o dificultad) con la que un equivalente de iones en particular puede transportar sus cargas eléctricas [34].

3.3.2 FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS (LQM's)

De acuerdo a la estructura química de cada compuesto se puede elucidar el número de constantes de acidez presentes, entonces, para el *LQM345*, el *LQM 346* y el *LQM351* se

observa la presencia de tres posibles valores de pK_A , mientras que para el **LQM344** solo se tendrían dos valores.

Tabla 3.5. Nombre, clave y estructura química de los compuestos denominados **LQM's**.

Nombre	Clave	Estructura
4-nitro-2-(piperidin-1-ylmetil)fenol	LQM344	
4-nitro-2,6-bis(piperidin-1-ylmetil)fenol	LQM345	
4-chloro-2,6-bis(piperidin-1-ylmetil)fenol	LQM346	
4-isopropyl-2,6-bis(piperidin-1-ylmetil)fenol	LQM351	

El comportamiento de la movilidad efectiva obtenida, contra el pH se muestra en la Figura 3.4 para los cuatro fármacos.

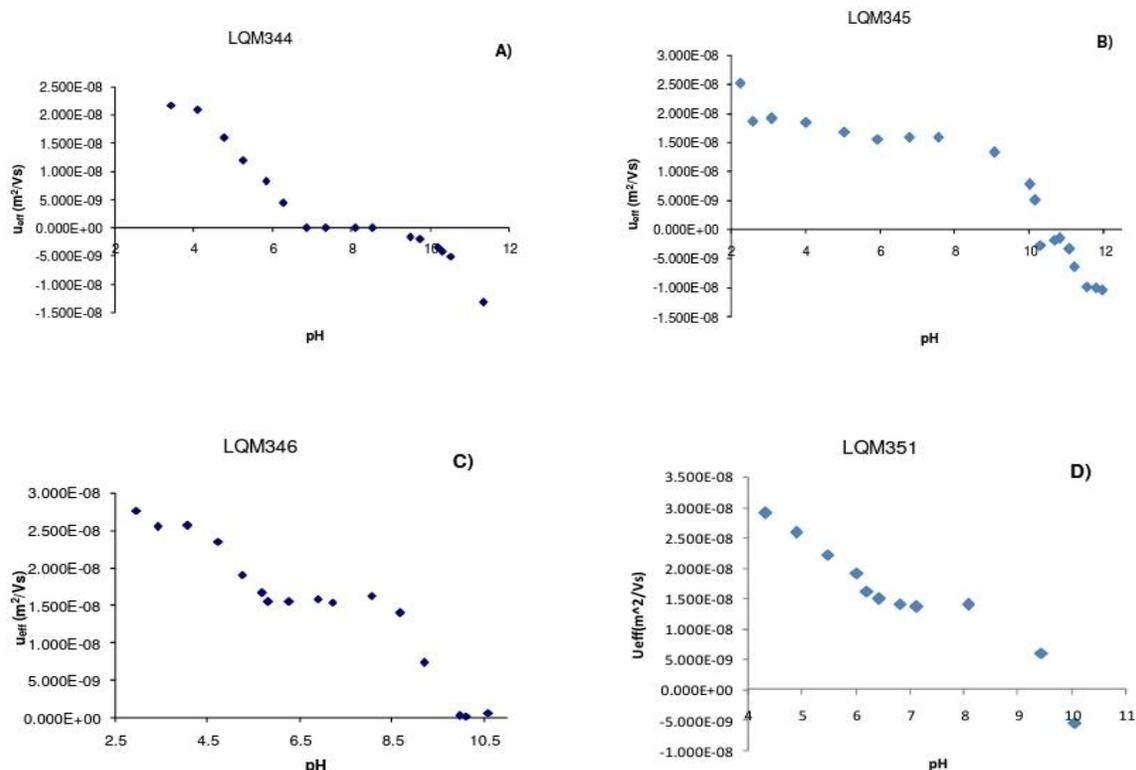


Figura 3.4. Movilidad efectiva (u_{eff}) obtenida como función del pH para: A) LQM344, B) LQM345, C) LQM346 y D) LQM351.

En la Figura 3.4 A) se observa que, en efecto, el LQM 344 presenta solo dos puntos de inflexión en valores de pH entre 5 a 6 y en el intervalo de pH entre 10 a 12; los cuales se pueden asociar a dos constantes de acidez. De manera análoga en 3.4 B) se observa para LQM 345 la presencia de tres valores de pKa en valores de pH alrededor de 2, 10 y 11, respectivamente. En 3.4 C) sólo se observan dos cambios marcados en la movilidad debido a que éste compuesto, el **LQM346**, no se puede observar a valores de pH mayores a 10.5; al parecer disminuye su solubilidad ya que se deja de observar la señal correspondiente y en cambio se observan muchos picos pequeños (todos con espectro similar). Finalmente, en 3.4 D) se observan solo dos cambios marcados en la movilidad ya que, igual que el **LQM346**, el **LQM351** no se pudo observar a valores de pH mayores a 10.

Con base en lo anterior, se pretende determinar tres valores de constantes de acidez para el compuesto **LQM345** y dos constantes para el **LQM344**, tal y como se había supuesto; sin embargo, para los fármacos **LQM346** y **LQM351** únicamente se determinarán los valores de dos de sus tres constantes de acidez.

Para cada uno de los compuestos por ejemplo para el **LQM344** se tiene [36]:

$$u_{L'} = u_{L^-} f_{L^-} + u_{HL} f_{HL} + u_{H_2L^+} f_{H_2L^+} \quad (3.2.1)$$

Donde f_{L^-} , f_{HL} y $f_{H_2L^+}$, son las fracciones molares de las especies de **LQM344** y u_{L^-} , u_{HL} y $u_{H_2L^+}$ son sus correspondientes movilidades.

Para cada **LQM** se puede plantear una ecuación similar, en general:

$$u_{LL'} = u_{LL^-} f_{LL^-} + u_{HLL} f_{HLL} + u_{H_2LL^+} f_{H_2LL^+} + u_{H_3LL^{2+}} f_{H_3LL^{2+}} \quad (3.2.2)$$

La relación (3.2.2) está en términos de fracciones y movilidades de cada especie para el caso en que se tienen tres valores de constantes de equilibrio.

Nuevamente, se utilizó SQUAD para realizar el ajuste de las movilidades efectivas experimentales mostradas en la Figura 3.4 dicho ajuste se muestra en la Figura 3.5, donde se considera la movilidad total efectiva como función del pH como la mostrada en la relación (3.2.2).

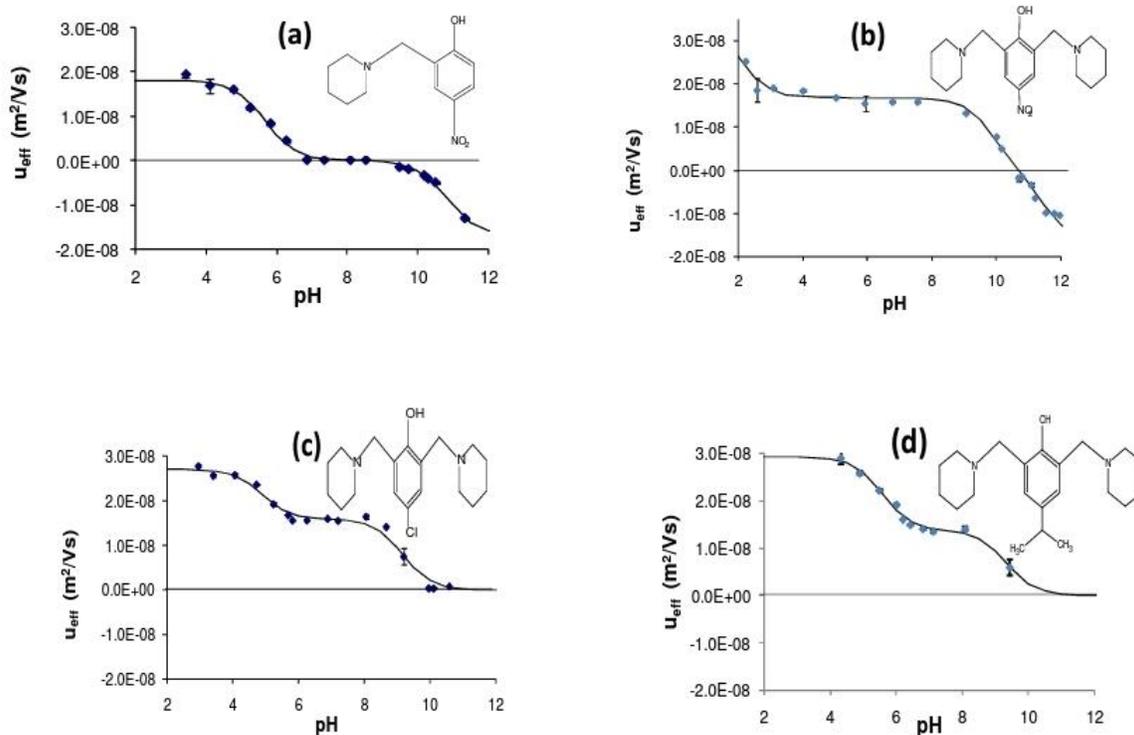


Figura 3.5. Ajuste de las curvas de movilidad en función del pH para: a) LQM344, b) LQM345, c) LQM346 y d) LQM351. Los marcadores representan los datos experimentales y la línea el ajuste hecho con SQUAD.

Asimismo, en la Tabla 3.5 se muestran los valores de constantes de acidez obtenidos para estos compuestos.

Tabla 3.5. Valores de pK_A obtenidos para los compuestos usando SQUAD. También se presenta el valor de la movilidad iónica y la conductividad equivalente, obtenidos con el refinamiento.

* La conductividad iónica se obtiene a partir de la relación (2.13) del capítulo anterior

** σ_{reg} representa la desviación estándar de la regresión

***este parámetro se mantuvo constante durante el refinamiento

Compuesto y equilibrios asociados	pK_{ai}	Movilidad iónica efectiva ($U_{Hj}(lqm3XX)^-$) ($\times 10^8$) $m^2 V^{-1} s^{-1}$	Conductividad equivalente* ($\lambda_{Hj}(lqm3XX)^-$) $cm^2 \Omega^{-1} eq^{-1}$
-----------------------------------	-----------	--	--

LQM 344 $\sigma_{reg}=0.0.80^{**}$

$H_2L^+ \rightleftharpoons HL + H^+$	5.669 ± 0.053		
$HL \rightleftharpoons L^- + H^+$	10.803 ± 0.039		
H_2L^+		1.806 ± 0.104	17.13 ± 0.99
L^-		-1.677 ± 0.099	15.9 ± 0.94

LQM345 $\sigma_{\text{reg}} = 0.150^{**}$

$H_3LL^{2+} \rightleftharpoons H_2LL^+ + H^+$	2.125 ± 0.099		
$H_2LL^+ \rightleftharpoons HLL + H^+$	9.806 ± 0.073		
$HLL \rightleftharpoons LL^- + H^+$	11.440 ± 0.039		
H_3LL^{2+}		3.360^{***}	15.94^{***}
LL^-		1.681 ± 0.111	15.9 ± 1.1

LQM346 $\sigma_{\text{reg}} = 0.126^{**}$

$H_3LL^{2+} \rightleftharpoons H_2LL^+ + H^+$	4.882 ± 0.153		
$H_2LL^+ \rightleftharpoons HLL + H^+$	9.184 ± 0.064		
H_3LL^{2+}		2.702 ± 0.123	12.82 ± 0.58
H_2LL^+		1.584 ± 0.083	15.02 ± 0.79

LQM351 $\sigma_{\text{reg}} = 0.097^{**}$

$H_3LL^{2+} \rightleftharpoons H_2LL^+ + H^+$	5.577 ± 0.141		
$H_2LL^+ \rightleftharpoons HLL + H^+$	9.351 ± 0.077		
H_3LL^{2+}		2.927 ± 0.119	13.88 ± 0.56
H_2LL^+		1.365 ± 0.075	12.95 ± 0.71

Los valores de las constantes de acidez obtenidos se muestran comparados en la Tabla 3.6, con los obtenidos por espectroscopia UV-Visible (Tesis de maestría de Islas J.M [35]).

Tabla 3.6. Comparativo de los valores de pK_A obtenidos mediante espectroscopia UV y electroforesis capilar de zona (CZE.)

COMPUESTO	MÉTODO	pK_{A1}	pK_{A2}	pK_{A3}
LQM344	UV	5.559	10.185	----
	CZE	5.669	10.803	----
LQM345	UV	2.615	10.193	11.449
	CZE	2.125	9.806	11.440
LQM346	UV	5.480	9.887	----
	CZE	4.882	9.184	----
LQM351	UV	6.154	10.624	10.975
	CZE	5.577	9.351	----

Aunque en la Tabla 3.6 se observa que los datos encontrados para ambos métodos difieren, se debe tener en cuenta que en los datos calculados por electroforesis no se está imponiendo la fuerza iónica, a diferencia del trabajo realizado por Islas J.M. [35]. Esta diferencia es más notoria para el fármaco con clave **LQM351**, de hecho, Islas J.M. reporta tres constantes de valores mientras que en el caso de electroforesis sólo fue posible refinar dos valores, debido a que, como se mencionó con anterioridad, la señal correspondiente a dicho fármaco se pierde para valores de pH mayores a 10 (ver Figura 3.4).

Además, como se puede apreciar en la Figura 3.5 d), el refinamiento hecho en la zona correspondiente al segundo valor de pK_A , contempla muy pocos puntos para el ajuste de este segundo valor y esto se refleja en una diferencia de más del 10% del valor esperado para el pK_A . Para el resto de los fármacos, la diferencia entre los valores encontrados por ambas técnicas no es mayor al 7%.

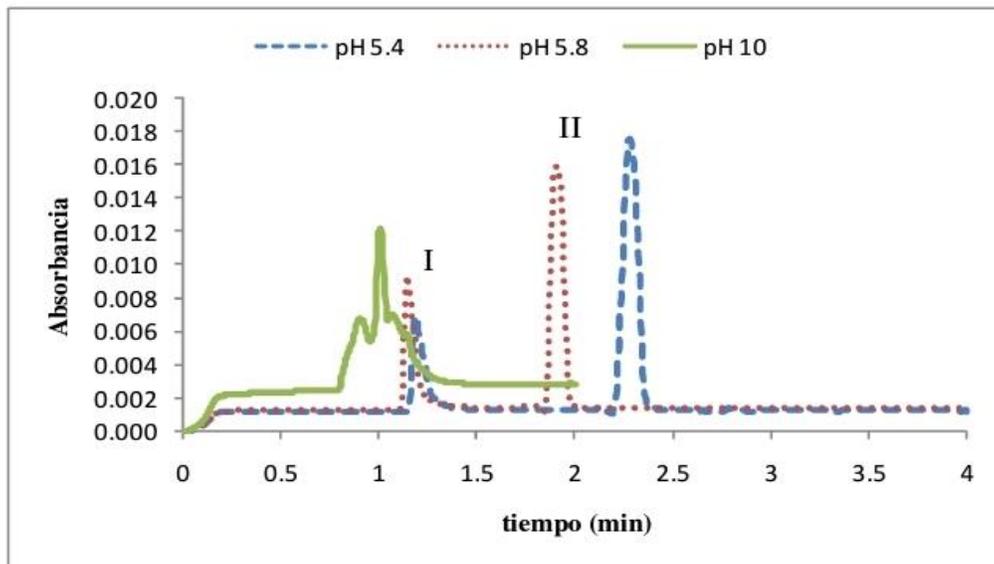


Figura 3.6. Electroferogramas obtenidos a tres diferentes valores de pH para el compuesto LQM351. El pico I corresponde a la acetona, el II al fármaco.

Con estos resultados y los obtenidos para los *oxicams*, se puede afirmar que la técnica de electroforesis capilar resulta un método conveniente para la determinación de valores de constantes de acidez. El cual puede complementar otras técnicas para determinación de constantes de equilibrio.

Además, el ajuste hecho con SQUAD permite obtener parámetros como las movilidades iónicas de las especies del sistema y de manera natural se conocen las conductividades iónicas equivalentes.

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA EL CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (*CMC*) DE TENSOACTIVOS

4.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se plantea una metodología para determinar la concentración micelar crítica de tensoactivos, mediante la técnica MEKC y además se propone un modelo teórico para ajustar el comportamiento de la movilidad en función de la concentración total de tensoactivo.

Esta metodología se propone porque en esta modalidad de electroforesis, la MEKC, se utilizan tensoactivos para el proceso de separación, sin embargo, pocos autores examinan la influencia que parámetros, como el efecto en cambios en la naturaleza y concentración del electrolito o bien, el efecto en la adición de un solvente orgánico e inclusive la introducción al sistema de selectores quirales, sales biliares o ciclodextrinas tienen la evolución de la existencia de la fase micelar. Como el estudio de la micelización ha probado ser un parámetro clave en la optimización de las condiciones analíticas en MEKC, la determinación de la concentración micelar crítica (*CMC*) bajo condiciones electroforéticas es esencial [38].

El tensoactivo utilizado es el dodecilsulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés). Los tensoactivos son moléculas anfifílicas compuestas usualmente por una cadena o cola hidrofóbica, la cual puede contener entre ocho y veinte átomos de carbono; y por una cabeza hidrofílica formada, ya sea por un grupo ionizable o bien por uno altamente polar [13]. Se clasifican como aniónicos, catiónicos y no-iónicos de acuerdo con la carga que presentan en la superficie activa de la molécula. En soluciones diluidas actúan como electrolitos normales, pero cerca de

concentraciones bien definidas se observan cambios abruptos en las propiedades fisicoquímicas de la solución tales como la presión osmótica, la conductividad eléctrica y la tensión superficial. Esto se debe a la formación de agregados organizados conocidos como micelas, en las cuales las cadenas hidrofóbicas se orientan hacia el interior de la micela permitiendo que los grupos hidrofílicos queden en contacto con el medio acuoso. La concentración por encima de la cual se empieza a apreciar la formación de micelas se conoce como concentración micelar crítica (*CMC*). El número de monómeros en una micela se conoce como el número de agregación (*n*) [13].

Para realizar la determinación de la *CMC*, se propone utilizar un soluto que tenga poco tiempo de residencia en las micelas, pero que sea lo suficientemente hidrofóbico para interactuar con éstas. Además, como lo que se pretende estudiar es la evolución de la existencia de la fase micelar, se requiere que dicho soluto se ponga en baja concentración de modo que, idealmente, no interfiera con dicho proceso; siendo así éste debe tener un coeficiente de absortividad grande para que sea detectado. El soluto seleccionado, que cumple las características anteriores, es el naftaleno [38].

4.2. PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1 REACTIVOS

Se utilizó Borato de sodio decahidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), proporcionado por Monterrey; naftaleno proporcionado por Merck. El tensoactivo utilizado fue dodecil sulfato de sodio, conocido como SDS (se usó la sal sódica, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) proporcionado por Merck (98% de pureza). Los solventes usados fueron: metanol de Merck y agua desionizada.

4.2.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

El buffer de boratos se preparó en concentración 5×10^{-3} M, (pH=9.4). El naftaleno se preparó en metanol (5.0 mg en 10 mL). Se preparó una solución stock de SDS de concentración 50 mM y de ésta se tomaron las alícuotas correspondientes para variar la concentración del tensoactivo diluidas con el buffer de boratos.

4.2.3 CARACTERÍSTICAS Y ACONDICIONAMIENTO DEL CAPILAR

Se utilizó un capilar de sílice de $50 \mu\text{m}$ de diámetro interno, con una longitud total de 50 cm y una longitud efectiva de 40 cm. El acondicionamiento realizado al capilar, previo a cada inyección consistió en:

- Introducción, por presión, de NaOH (0.1 M), a 20 *psi* por un minuto
- Introducción de agua a 20 *psi* por un minuto
- Introducción de fase móvil (SDS en buffer de boratos a diferente concentración de tensoactivo), a 20 *psi* durante dos minutos.

4.2.4 PARÁMETROS EXPERIMENTALES

La inyección del naftaleno se hizo de forma hidrodinámica a 0.5 *psi* por 5 segundos, del lado del ánodo. El experimento se realizó con el capilar a una

temperatura de 25 °C. El voltaje aplicado fue de 20 kV, utilizando polaridad normal. El naftaleno se monitoreó a una longitud de onda de 214 nm. Como el naftaleno se preparó en metanol, se usó este último como marcador del flujo electroosmótico.

Se realizaron dos repeticiones por cada concentración de SDS. Las concentraciones se variaron de 2 mM hasta 25 mM.

4.3. RESULTADOS

Se hizo el seguimiento del naftaleno, variando la concentración de SDS, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 4.1. Aquí se observa que la movilidad del naftaleno empieza a cambiar, cuando la concentración total de SDS está alrededor de 5 mM, lo que indica que en esta zona se encuentra la concentración micelar crítica.

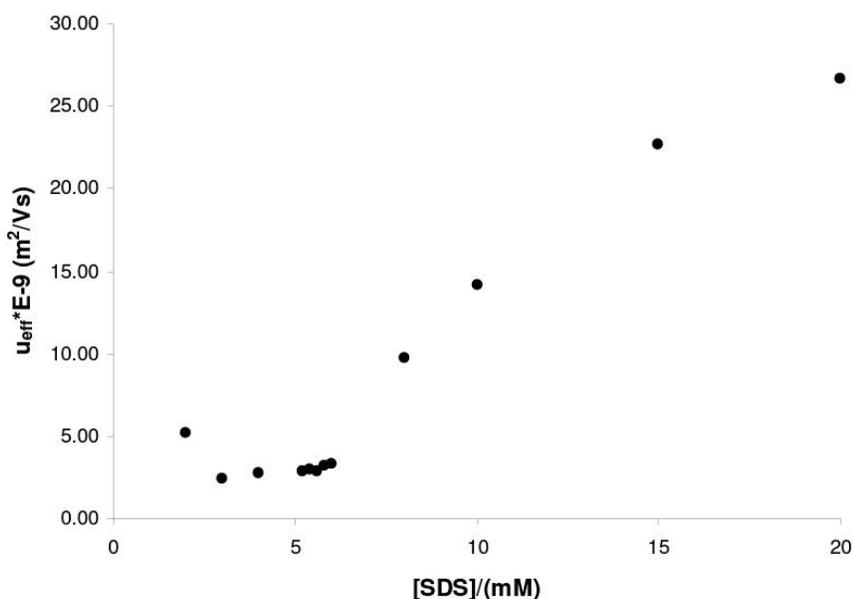


Figura 4.1. Cambio en la movilidad del naftaleno como función de la concentración total de SDS.

Para obtener la concentración micelar crítica se toman en cuenta los puntos cercanos a la zona donde la movilidad cambia, de esta manera se ajustan dos rectas cuya intersección [39] da el valor de la $CMC = 5.75 \text{ mM}$ (ver Figura 4.2).

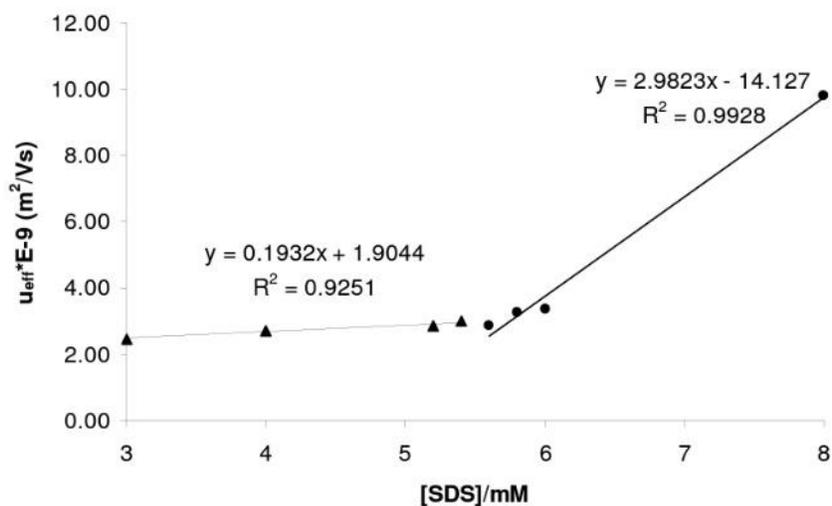


Figura 4.2. Ajuste lineal de la movilidad para calcular la concentración micelar crítica del SDS.

4.3.1 MODELO PROPUESTO POR JACQUIER Y COL. [38]

Para modelar el comportamiento observado en la Figura 4.1, Jacquier y colaboradores [38], proponen como equilibrios representativos en MEKC los mostrados en la Figura 4.3.

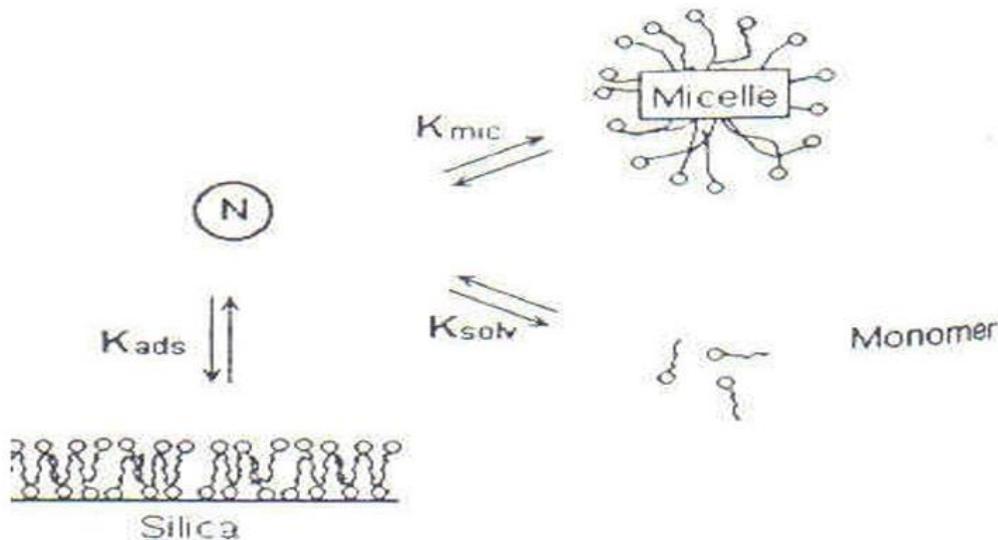


Figura 4.3. Equilibrios que ocurren en MEKC, propuestos por Jacquier y colaboradores [38].

Se debe notar que entre los equilibrios propuestos por Jacquier y col., no se considera el equilibrio de micelización (y finalmente tampoco se toma en cuenta el de adsorción del agente tensoactivo en la pared del capilar). Se describe el sistema a partir del equilibrio de naftaleno (N) con los monómeros de tensoactivo (S) y con las micelas (M) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$N + S = NS \quad K_{solv} = \frac{x}{(1-x-y)[S]} \quad (4.1)$$

$$N + M = NM \quad K_{mic} = \frac{y}{(1-x-y)[M]} \dots \dots \dots (4.2)$$

Donde x es la fracción molar de soluto asociado con el monómero de tensoactivo; y es la fracción molar de soluto asociado con las micelas.

La movilidad efectiva (u_{eff}) está ponderada por las fracciones molares del soluto en cada una de las fases, es decir:

$$u_{eff} = xu_{solv} + yu_{mic} = u_{eof} - u_{app} \quad (4.3)$$

Al expresar la movilidad efectiva como función de las constantes de equilibrio, de $[S]$ y $[M]$ (sustituyendo las ecuaciones (4.1) y (4.2) en (4.3)) y considerando que los dos equilibrios son independientes, se obtiene [38]:

$$u_{eff} = \frac{K_{solv}[S]}{1+K_{solv}[S]} u_{solv} + \frac{K_{mic}[M]}{1+K_{mic}[M]} u_{mic} \quad (4.4)$$

Ahora bien, si no se hace la aproximación en la independencia de los equilibrios, la ecuación de movilidad que resulta es:

$$u_{eff} = \frac{K_{solv}[S]}{1+K_{solv}[S]+K_{mic}[M]} u_{solv} + \frac{K_{mic}[M]}{1+K_{solv}[S]+K_{mic}[M]} u_{mic} \quad (4.5)$$

En (4.5) se puede apreciar que los equilibrios no son independientes, esto se esperaba ya que en el sistema de análisis se encuentran presentes tanto los monómeros de tensoactivo libres como las micelas y el soluto interactúa con ambas fases en un equilibrio dinámico.

En su modelación, además se hacen otra serie de aproximaciones en la movilidad, considerando tres intervalos de concentración:

a) Cuando $C_t < CMC$, entonces
$$u_{eff} = \frac{K_{solv}C_t}{1+K_{solv}C_t} u_{solv} \quad (4.6)$$

b) Cuando $C_t > CMC$, entonces
$$u_{eff} = \frac{K_{solv}cmc}{1+K_{solv}cmc} u_{solv} + \frac{K_{mic}(C_t-cmc)/n}{1+K_{mic}(C_t-cmc)/n} u_{mic} \quad (4.7)$$

c) Cuando $C_t \approx CMC$, entonces
$$u_{eff} = K_{solv}[S]u_{solv} + K_{mic}[M]u_{mic} \quad (4.8)$$

Para el experimento realizado en el presente trabajo se hizo la modelación sin partir la concentración total en las tres zonas, únicamente se toma en cuenta el balance propuesto por los mismos autores:

$$C_t = [S] + n[M] \quad (4.9)$$

De acuerdo a esto, considerando $n=100$ (dato reportado en la referencia [38]) y los parámetros obtenidos de manera experimental para CMC y u_{CMC} , se modelaron

tres comportamientos diferentes de la movilidad (Figura 4.3). La serie “sim” corresponde a la modelación utilizando la ecuación (4.5). La serie “artículo” corresponde al artículo haciendo las aproximaciones en los diferentes intervalos de concentración, es decir, siguiendo las ecuaciones (4.6), (4.7) y (4.8). Por último, la serie “art sin aprox” es un ajuste realizado, utilizando la ecuación (4.4) en todo el intervalo de concentración.

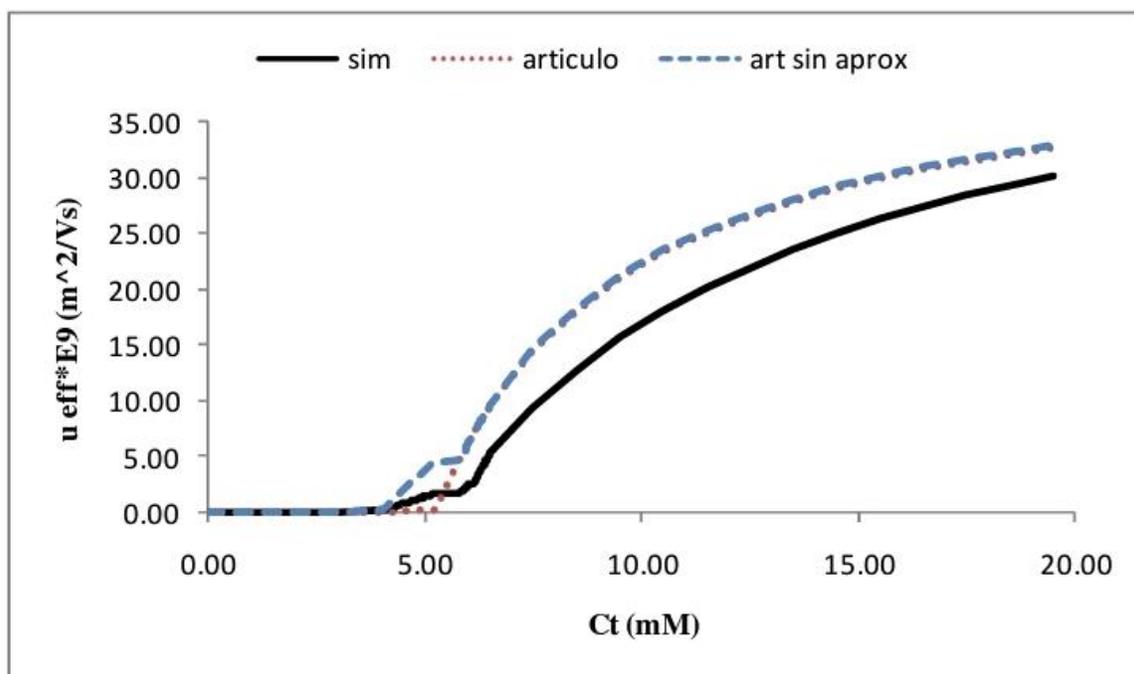


Figura 4.4. Comparativo del comportamiento de la movilidad utilizando diferentes ecuaciones para su modelado.

Las aproximaciones hechas en cada caso se manifiestan precisamente alrededor de la zona donde se encuentra la CMC.

En la siguiente sección se plantea un modelo para ajustar el comportamiento de la movilidad observado en la Figura 4.1.

4.3.2 MODELO CONSIDERANDO UN EQUILIBRIO ÚNICO DE MICELIZACIÓN

Considerando la discrepancia en la zona de la *CMC*, para las ecuaciones propuestas en el modelo anterior [38], se propone otro modelo considerando entonces la existencia de un solo equilibrio de polinucleación como sigue:

$$nM = M_n \quad K_{M_n}^{nM} = K$$

Donde $K_{M_n}^{nM}$ es la constante de formación global del equilibrio y n es el número de agregación de moléculas de M en una micela.

Ahora bien, de acuerdo a la ley de acción de masas, para el equilibrio de polinucleación es posible escribir:

$$K = \frac{[M_n]}{[M]^n} \quad (4.10)$$

Por lo tanto, cuando $[M]_n = [M] = C$, la constante de equilibrio puede escribirse como:

$$K = \frac{C}{C^n} = C^{1-n} \quad (4.11)$$

Si tomamos logaritmo base 10 en ambos lados de la ecuación (4.11), se tiene:

$$\log K = (1 - n) \log C \quad (4.12)$$

Dado que, cuando comienzan a formarse las micelas $[M] \approx \text{constante} = CMC = C$ la ecuación (4.12) permite tener una estimación del valor de la constante de micelización.

Una vez estimado el valor de la constante de micelización, a partir de los valores de *CMC* obtenidos experimentalmente, se utilizó el programa MEDUSA [39] para calcular las fracciones de cantidad y de concentración para especies polinucleares

de un solo componente (Figura 4.5). Dichas fracciones se definen de acuerdo a las siguientes relaciones [40]:

$$\text{- Fracciones de cantidad} \quad f_{M_n} = \frac{n[M_n]}{[M]_T} ; \quad f_{M_n} = \frac{[M]}{[M]_T} \quad (4.13)$$

$$\text{- Fracciones de concentración} \quad \phi_{M_n} = \frac{[M_n]}{\Sigma_M} ; \quad \phi_M = \frac{[M]}{\Sigma_M} \quad (4.14)$$

siendo $[M_T] = [M] + n[M_n]$ y $\Sigma_M = [M] + [M_n]$.

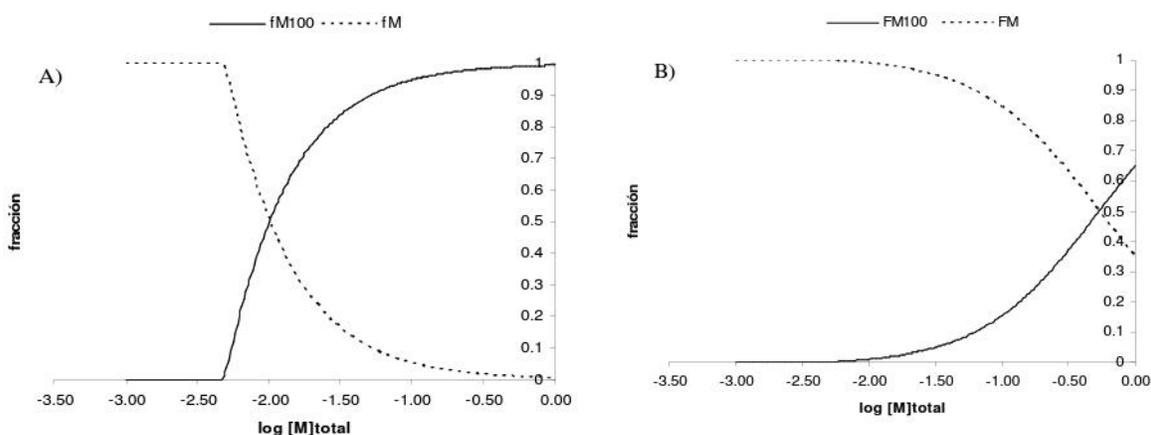


Figura 4.5. Fracciones de los monómeros y las micelas de SDS en el sistema. A) Fracciones de cantidad. B) Fracciones de concentración. En ambos casos se considera $n=100$ y $CMC=5.75mM$ [38].

Considerando la forma de la movilidad efectiva del SDS (Figura 4.1) y la forma del comportamiento observado en la fracción de cantidad de las micelas, se utilizó esta fracción multiplicada por la movilidad de las micelas ($u_{mic}=4.80 \times 10^{-8}$), para modelar el comportamiento de la movilidad efectiva del naftaleno después de la concentración micelar crítica (Figura 4.1). Esto supone que todo el naftaleno se encuentra en las micelas o libre, pero el naftaleno libre sólo puede moverse arrastrado por el flujo electroosmótico.

El ajuste realizado de esta forma es bueno y no se requiere hacer aproximaciones para evitar comportamientos no lineales, como se muestra en la Figura 4.5.

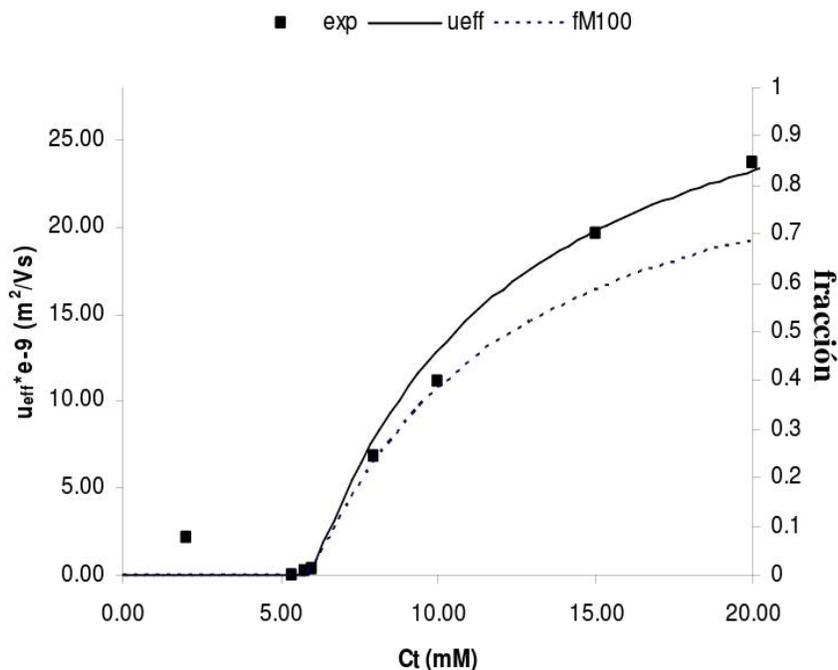


Figura 4.5. Movilidad en función de la concentración de SDS, experimental (cuadros) y simulación (línea) comparando también el comportamiento de la fracción de cantidad con $n=100$.

Entonces, la fracción que puede modelar el comportamiento en la movilidad es la fracción de cantidad de monómero en las micelas, y no la de concentración; se pensaba que la fracción que tendría peso sobre la movilidad esta última y resulta que no se podría modelar el comportamiento de la movilidad con la fracción de concentración porque la concentración de las micelas, por encima de la CMC es todavía dos órdenes de magnitud menor que la de agente tensoactivo monomérico, se necesita que la concentración total sea aproximadamente 0.1 M para que $[M_m]$ empiece a predominar sobre $[M]$ (Figura 4.5).

IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA EN MEZCLAS COMPLEJAS (MULTICOMPONENTES)

5.1. INTRODUCCIÓN

La electroforesis capilar tiene una vasta aplicación como método de separación ya que tiene una buena resolución y permite tiempos cortos de análisis aún para sistemas complejos, es decir, para aquellos sistemas que involucran gran cantidad de componentes.

Un ejemplo de sistemas complejos es aquellos que provienen de extractos herbales comúnmente conocidos como té. El consumo de estos té actualmente sigue siendo una práctica muy común, de hecho, con la búsqueda de medicinas alternativas, el uso de la herbolaria como método de tratamiento a varias enfermedades ha venido en aumento en la última década tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. Es por esto que la industria farmacéutica está considerando las plantas medicinales como una fuente natural importante en la búsqueda de compuestos con actividad farmacológica.

El análisis de los componentes farmacológicamente activos se logra mediante el uso de técnicas de análisis con alta resolución como las cromatográficas o la electroforesis capilar. Con estos métodos se pretende identificar y caracterizar dichos componentes, permitiendo así su extracción para manufacturar nuevos medicamentos con menor actividad toxicológica.

El análisis por huella digital ha sido empleado para identificar y certificar la calidad de las hierbas medicinales. Los métodos cromatográficos son altamente

recomendados y comúnmente usados para este fin. Sin embargo, la electroforesis capilar se considera una técnica complementaria a la técnica de HPLC para el análisis de hierbas medicinales. Las dos técnicas se consideran ortogonales, ya que sus mecanismos de separación son diferentes [41].

Comparada con la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), la electroforesis capilar requiere solo de pequeñas muestras de inyección; además de que es altamente eficiente, tiene bajos costos de operación y la posibilidad de trabajar principalmente con soluciones acuosas. Además, el tratamiento de la muestra se reduce debido a que el pretratamiento dado al capilar antes de introducir la muestra reduce las interferencias ocasionadas por la matriz que es compleja.

Para la obtención de huellas digitales se debe considerar una resolución satisfactoria de los constituyentes dentro de un tiempo de análisis razonable y esto se logra optimizando las condiciones electroforéticas como potencial aplicado, pH de trabajo, concentración y tipo de buffer, etc. Una vez lograda esta optimización el análisis e identificación para caracterización de muestras mediante obtención de huella digital es rápido.

El árbol *Eysenhardtia polystachya* se distribuye en gran parte del territorio mexicano y parte de los Estados Unidos ya que se puede encontrar desde el sureste de Arizona hasta Oaxaca, donde es conocido como “palo azul”.

Este árbol es utilizado en la medicina tradicional de hierbas para el tratamiento de urolitiasis (cálculos en las vías urinarias) [42], lumbago, artritis, reumatismo, ciática, como depurativo de la sangre pues elimina el ácido úrico (de ahí su fama como diurético y antirreumático), y principalmente para el tratamiento de la nefrolitiasis (cálculos renales) [43]. También es utilizado como un

antiespasmódico y para el tratamiento de complicaciones derivadas de la diabetes mellitus [44,45], para este propósito la corteza se hierve con agua para producir un líquido de color dorado con una fluorescencia azul (de ahí el nombre dado: palo azul), de la cual los enfermos toman de una a tres tazas diarias [43].

Entre los componentes del *Eysenhardtia polystachya* se pueden encontrar compuestos polifenólicos y flavonoides que son en general, ésteres de un tipo de azúcar, que contienen un número variable de ácidos fenólicos [44].

Los polifenoles son sustancias que se producen en diversas partes de las plantas como son: corteza, frutos, hojas, raíces y semillas. A pesar de tener un origen común, la especificidad de las plantas les da a los polifenoles diferencias en color, calidad y concentración [46].

Los polifenoles son compuestos que constan de un anillo bencénico, sustituido por uno o más grupos hidroxilos. Entre los compuestos fenólicos existentes en los alimentos, se pueden distinguir dos grandes familias: no flavonoides y flavonoides.

Los flavonoides se encuentran en partes de vegetales y plantas y en productos alimenticios incluidos en la dieta del ser humano. Debido a su estructura fenólica, estos compuestos son fuertes antioxidantes y receptores de radicales libres [47,48].

El interés por los flavonoides ha crecido debido a su amplia actividad farmacológica. Los flavonoides son ampliamente utilizados por sus características antialérgicas y diuréticas; se asume que estas características se deben a la capacidad del oxígeno para absorber radicales.

Se han descrito más de 4,000 flavonoides que se clasifican en varias familias según cambios en su estructura básica. Son compuestos polifenólicos tanto de bajo como de elevado peso molecular que comparten el esqueleto formado por dos anillos bencénicos unidos a través de un anillo pirona o pirano heterociclo, que pueden poseer varios grupos hidroxilo (-OH) unidos a esta estructura de anillos.

Los compuestos polifenólicos pueden extraerse del material vegetal utilizando diversos solventes como son: acetona, agua, etanol, metanol, así como mezclas de ellos en diferentes proporciones [49], siendo el agua caliente el solvente más económico para la extracción y el más usado en la práctica herbolaria [51].

5.2. PARTE EXPERIMENTAL

5.2.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Previo al análisis por electroforesis capilar se probaron condiciones de preparación del extracto de *Eysenhardtia polystachya* a partir de la madera proporcionada por el laboratorio de extractos fluidos y secos “Rosa Elena Dueñas” (LRHFEFS), este laboratorio garantiza que la madera proporcionada es efectivamente *Eysenhardtia polystachya*, por lo cual se usó como estándar.

Las condiciones de extracción involucran la selección y tipo de solventes, la relación adecuada entre ellos, así como también la cantidad de materia vegetal a usar. Para este propósito se utilizaron tres solventes: agua, acetona y etanol y se probaron dos combinaciones de estos: agua-acetona (70:30) y etanol-agua (1:1); a

temperatura ambiente y de ebullición. Además, se consideraron cantidades de materia vegetal de: 2.0 g, 5.0 g y 10.0 g [46].

Para la obtención del extracto se colocó la cantidad deseada de la madera, previamente cortada en astillas, en un matraz de fondo plano con 100 mL de solvente y se puso a reflujo, a la temperatura de ebullición, durante un lapso de cinco horas; o bien se dejó a temperatura ambiente de igual manera por cinco horas. Transcurrido este tiempo, las soluciones se decantaron y filtraron, almacenándose en botellas ámbar a 4 °C.

De acuerdo a López-Bermúdez [46], se consideró como mejor sistema de extracción aquel que presentaba una mayor cantidad de polifenoles, esto se hizo de acuerdo con el método conocido como Azul de Prusia de Price y Butler [51,52]. López-Bermúdez determinó además la estabilidad de los extractos monitoreando los espectros durante 30 días.

Los resultados obtenidos por López-Bermúdez muestran que el mejor extracto se obtiene a temperatura de ebullición en el sistema etanol-agua (1:1) y 5.0 gramos de madera, ya que es el que presenta mayor cantidad de polifenoles además de ser estable hasta por 30 días.

5.2.2 PARÁMETROS Y CONDICIONES EXPERIMENTALES

Los experimentos se realizaron en el sistema de electroforesis capilar P/ACE MDQ de Beckman, descrito en el capítulo I de esta tesis.

El capilar utilizado, de sílice fundida, tenía una longitud total de 60.2 cm, con 50 cm de longitud efectiva y diámetro interno de 50 μm . la inyección se realizó en el cátodo de forma hidrodinámica, aplicando una presión de 1.0 *psi* por 5.0 segundos.

El capilar se acondicionó, entre cada corrida, durante un minuto con NaOH (0.1 M), un minuto con agua y 1.5 minutos con el buffer de corrida, previo a la inyección de la muestra. Al inicio y al final del día se le pasaba una solución de hidróxido de sodio (0.1 M) y luego agua durante 5 minutos cada uno. El capilar se dejaba lleno con agua.

5.2.3 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

Para el análisis electroforético se tomaron los extractos considerando como electrolito soporte buffer de boratos a pH 8.1 y también buffer de fosfatos al mismo pH, para determinar cuál de ellos daba la mejor respuesta.

La mejor respuesta se obtendrá en cuanto la resolución sea mejor, es decir los picos obtenidos estén separados y también cuando se observe el mayor número de picos.

5.2.4 OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS Y REPETIBILIDAD

Con base en la mejor resolución de los picos, que se obtengan corriendo la muestra con cada uno de los buffers, haciendo una variación en el voltaje aplicado y en la concentración del buffer, se seleccionaron las condiciones electroforéticas óptimas para la obtención de la huella digital del *Eysenhardtia polystachya*.

Como el extracto presenta coloración roja, el análisis se realizó tanto en la región ultravioleta como en la visible. Aunque el equipo cuenta con detector de arreglo de diodos y permite obtener el espectro de los picos obtenidos, en ambas regiones se seleccionaron longitudes de onda para la obtención del electroferograma representativo de dicha región. Para la región ultravioleta se seleccionó como longitud de onda 214 nanómetros, mientras que el electroferograma para la región visible se obtuvo a 426 nanómetros. Así pues, para cada región, la UV y la visible, se variaron la concentración del buffer y el voltaje.

Las concentraciones se variaron de 10 a 50 mM y el voltaje de 10 a 25 kV. Se tomaron en cuenta varios parámetros, principalmente el tiempo de migración y el Δt_m para los picos vecinos. La resolución se optimizó obteniendo el máximo de diferencia en el tiempo de migración para los picos más próximos contra el voltaje y la concentración del buffer. La repetibilidad se evaluó usando la prueba ANOVA [37] para los tiempos de migración de los picos.

5.3. RESULTADOS

Se realizó una corrida de prueba para cada uno de los tres extractos: etanol:agua (1:1), acetona:agua (7:3) y agua. Además, para decidir cuál de los buffers sería empleado para las determinaciones con el mejor extracto, se probaron ambos buffers, boratos y fosfatos y se analizaron los electroferogramas resultantes. El extracto etanol:agua (1:1) en buffer de fosfatos resulta ser el que da una mejor huella digital ya que presenta el mayor contenido de polifenoles y flavonoides y también el mayor número de picos, entonces éste fue el extracto y el buffer seleccionados para hacer la optimización de los parámetros.

El extracto de *Eysendhardtia polystachya* es una mezcla compleja de compuestos polifenólicos lo cual dificulta la identificación satisfactoria mediante métodos cromatográficos convencionales; por lo que es de gran importancia la obtención de los parámetros óptimos para su análisis. Toda vez que se fijan esos parámetros, el análisis se vuelve más eficiente con respecto a la resolución de los electroferogramas correspondientes.

Para la optimización de un método de electroforesis capilar existen una serie de parámetros que necesitan ser considerados tales como el voltaje, pH y concentración del buffer, los cuales proveen los medios para una buena separación con el mayor número de picos con diferencias significativas entre sus tiempos de migración, Δt_m , con respecto a los picos vecinos; es necesario decir que la precisión de las medidas experimentales, o movilidad, dependen fuertemente de dichos factores.

El estudio consistió en encontrar la concentración más apropiada para el análisis de los extractos, que permita tiempos de migración lo suficientemente grandes para obtener picos separados, pero a la vez cortos para hacer un análisis rápido, lo que es equivalente a decir que se obtuvo una buena resolución de los picos y un análisis eficiente. Los electroferogramas obtenidos permiten la determinación de los parámetros óptimos para el análisis de los extractos. Cuando se analizaron los electroferogramas, se observó que en la región UV (214 nm) existían picos que no se presentaban en la región visible (426 nm) o a la inversa, como se observa en la Figura 5.1.

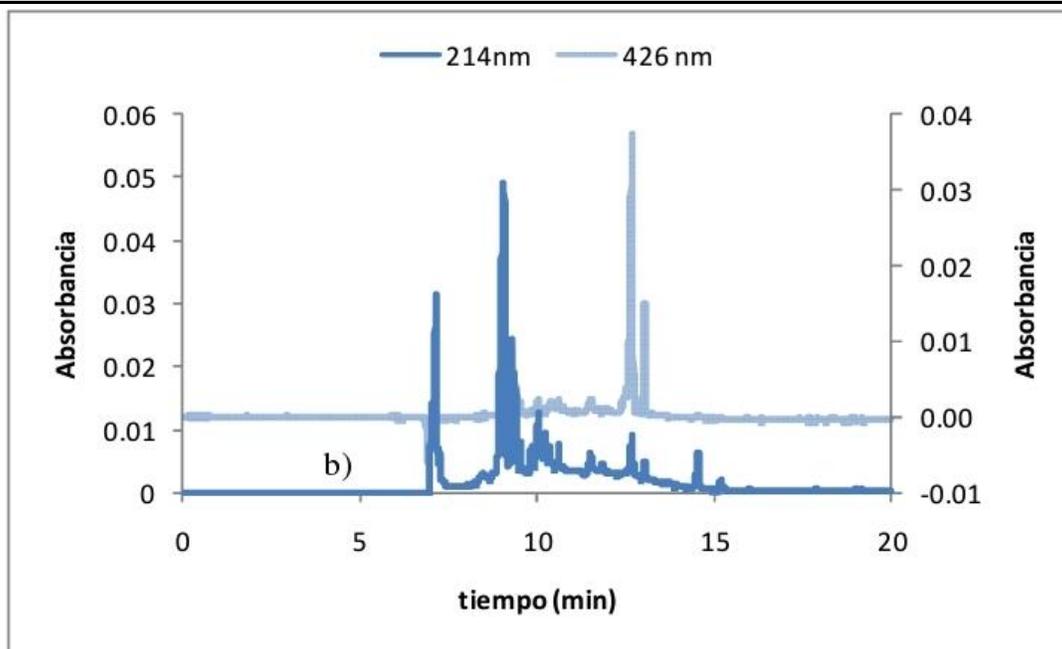


Figura 5.1. Electroferogramas del extracto etanol-agua (1:1), aplicando 15 kV, en buffer de fosfatos pH=8.1; a) electroferograma registrado a 426 nm (región visible) y b) electroferograma obtenido a 214 nm (región UV).

Las condiciones óptimas se determinaron para cada región de interés, UV y visible a 214 y 426 nm respectivamente, pH=8.1 [56]. Para la primera región, los parámetros óptimos fueron concentración de buffer 10 mM y 20 kV, mientras que, para la segunda región, los parámetros óptimos fueron 50 mM para la concentración del buffer y 12.5 kV de voltaje aplicado [53].

5.3.1 REPETIBILIDAD

La repetibilidad de los electroferogramas de los extractos de *Eysendhardtia polystachya* se evaluó, inyectando siete muestras de la madera bajo condiciones óptimas como se definió para cada región, UV y visible, respectivamente. La Figura 5.2 muestra los resultados obtenidos para los extractos de LHRFFDE.

En la Tabla 5.1 se muestran los resultados de la prueba ANOVA para los tiempos de migración. Los resultados permiten asegurar que el método optimizado es reproducible para ambos electroferogramas, (obtenidos en condiciones óptimas), y que éstos pueden considerarse como las huellas digitales de los extractos de *Eysendhardtia polystachya*.

Tabla 5.1. Resultados de la prueba ANOVA [37] para los tiempos de migración de los picos obtenidos en los electroferogramas monitoreados a 214 nm y 426 nm. Las condiciones de separación son óptimas para cada caso.

Longitud de onda (nm)	Grados de libertad	SS	MS	Desviación estándar relativa (RSD) del t_m
214	6	0.263	5.749	0.019
426	6	0.417	15.084	0.005

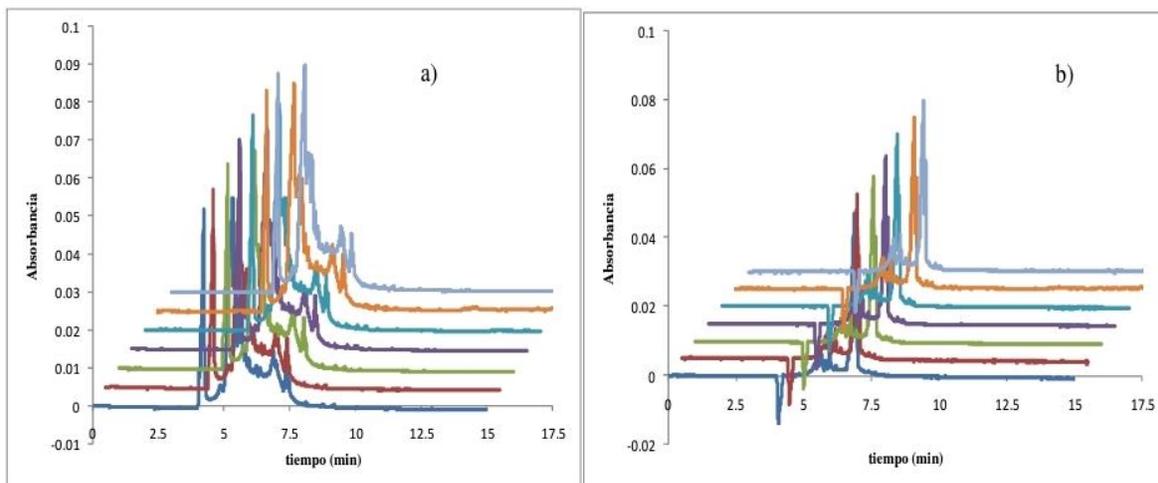


Figura 5.2. Repetibilidad obtenida para los extractos de LHRFFDE en condiciones óptimas; a) región UV ($\lambda=214\text{nm}$), b) región visible ($\lambda=426\text{ nm}$)

5.3.2 APLICACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINAR LA AUTENTICIDAD DE UNA MUESTRA DE PALO AZUL

El método desarrollado se aplicó al análisis de madera comercial de *Eysendhardtia polystachya*. El extracto se obtuvo usando 5 g de material vegetal y 100 mL de la mezcla etanol:agua (1:1), se enfrió y filtró almacenándose en botellas ámbar a 4 °C. Se tomó una alícuota para obtener una solución de 50 mg/mL. Los electroferogramas obtenidos a 214 y 426 nm muestran similitud, excepto por pequeños cambios en los tiempos de migración de algunos picos como se muestra en las Figuras 5.3 y 5.4. Más aún, los picos I y II mostrados en la Figura 5.3, pueden asignarse a catequinas u otros compuestos flavonoides (como floretina), así como también el pico III en la Figura 5.4. Esta asignación preliminar se obtuvo por el análisis y comparación de tiempos de migración de picos en los electroferogramas correspondientes a muestras con estándares conocidos en condiciones óptimas.

Existen algunos picos en tiempos de migración alrededor de 6 minutos en la figura 5.3a (condiciones óptimas para 214 nm) que podrían asignarse al ácido tánico.

Las Figuras 5.3 y 5.4 además muestran que todos los picos correspondientes están presentes en ambas muestras de *Eysendhardtia polystachya* estudiadas, aunque los tiempos de migración sean diferentes debido a que los electroferogramas correspondientes a las muestras aquí presentadas se obtuvieron con un capilar más corto. Otra diferencia entre ellas es la altura y el área de los picos, lo cual se espera por la concentración de cada componente en diferentes muestras naturales de la misma planta.

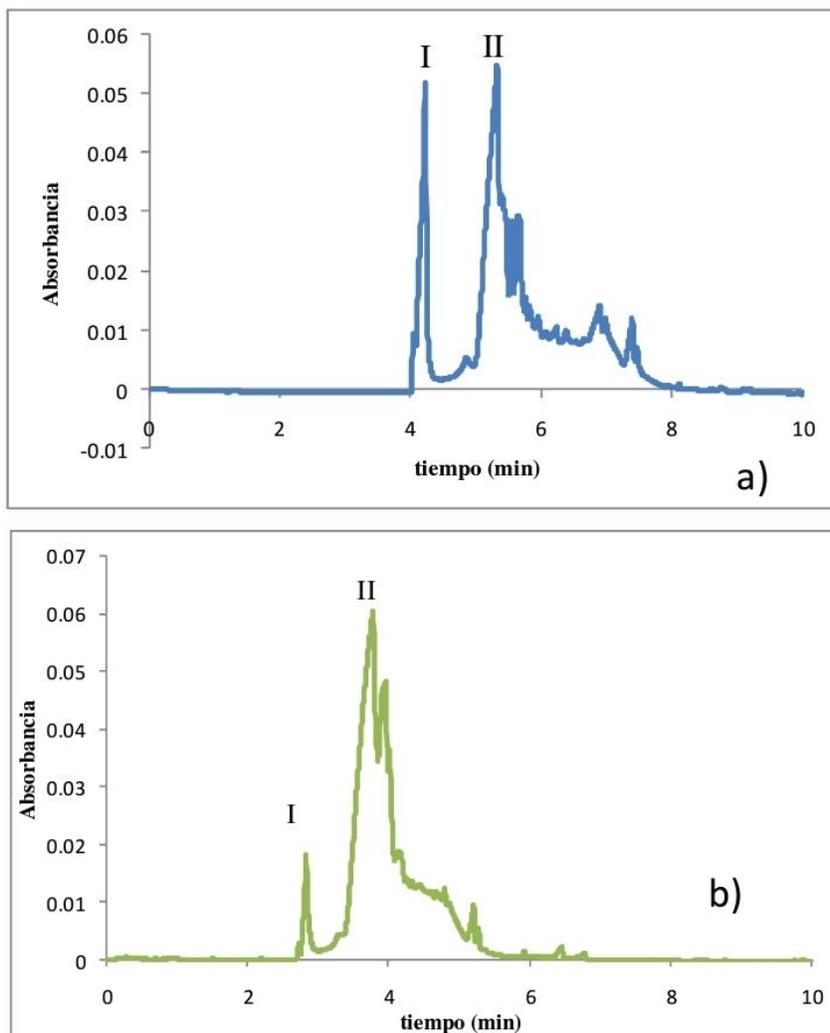


Figura 5.3. Electroferogramas obtenidos de la región UV en condiciones óptimas para: a) extracto de LHRFFDE; b) muestra comercial de *Eysenhardtia polystachya*. Los picos I y II pueden asignarse a flavonoides como catequina.

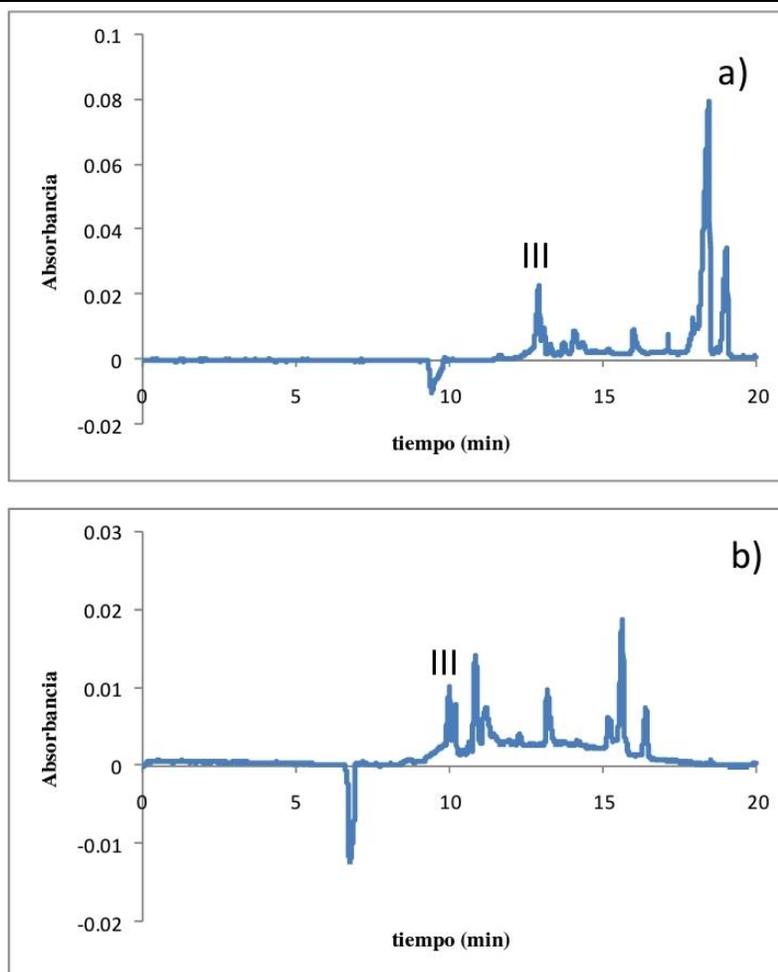


Figura 5.4. Electroferogramas obtenidos de la región visible en condiciones óptimas para: a) extracto de LHRFFDE; b) muestra comercial de *Eysenhardtia polystachya*. El pico III puede deberse a compuestos flavonoides como catequina.

También se aplicó el método obtenido [53] para determinar la autenticidad de una muestra que supuestamente era *Eysenhardtia polystachya* de modo que se realizaron los extractos en etanol-agua (1:1) y se analizaron en condiciones electroforéticas, aplicando la metodología desarrollada y descrita con anterioridad.

En la Figura 5.5a y 5.5b se presentan los electroferogramas obtenidos para la región ultravioleta (214 nm) y la visible (426 nm) respectivamente para los extractos de la madera a analizar.

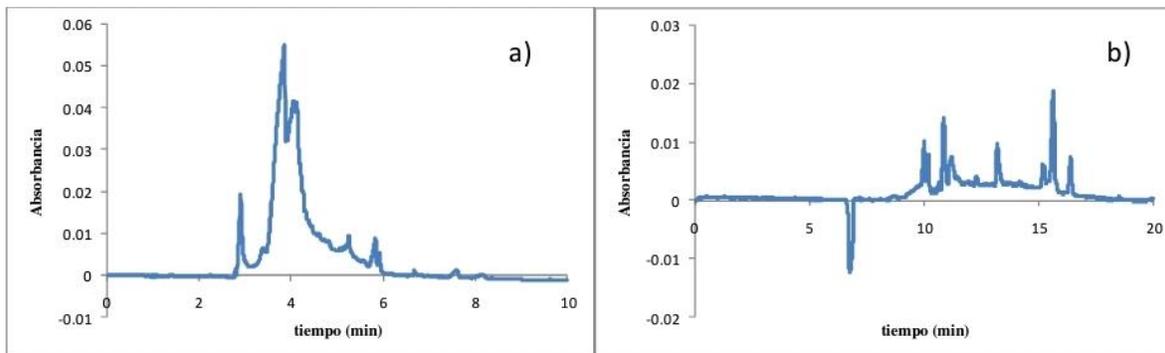


Figura 5.5. Electroferogramas obtenidos para la supuesta muestra de *Esenhardtia polystachya* bajo análisis; a) región UV (214 nm) en buffer de fosfatos (10 mM, pH 8.1), V=20 kV; b) región visible (426 nm) en buffer de fosfatos (50 mM, pH 8.1), V=12.5 kV.

Estos electroferogramas se comparan con los obtenidos para el extracto de LRHFES, considerado el estándar, obtenidos en las mismas condiciones. Los electroferogramas comparativos para ambas regiones, UV y visible, se muestran en las Figuras 5.6 y 5.7, respectivamente.

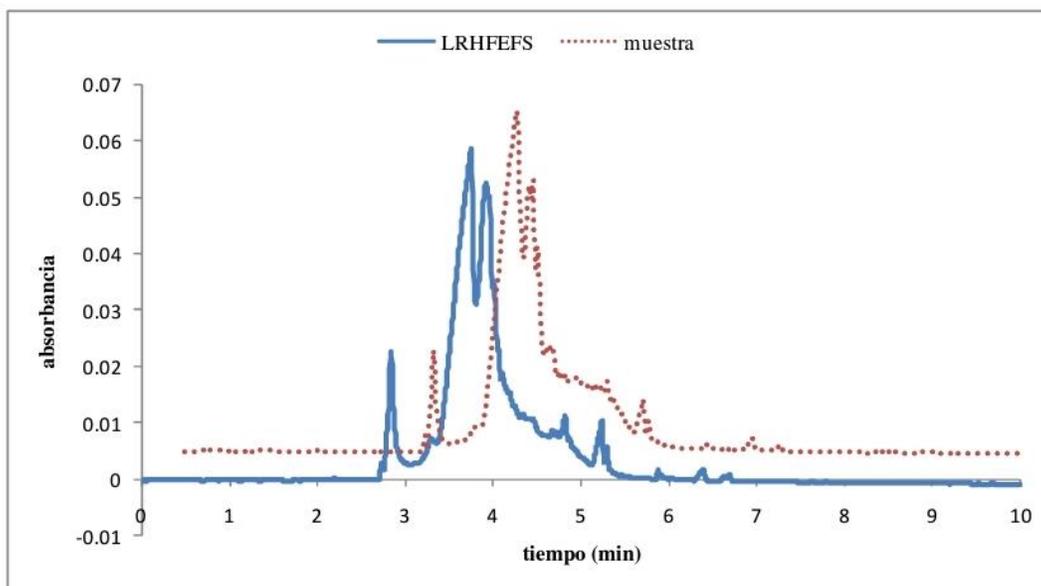


Figura 5.6. Electroferogramas obtenidos para la región UV (214 nm) en buffer de fosfatos (10 mM, pH 8.1), $V=20$ kV

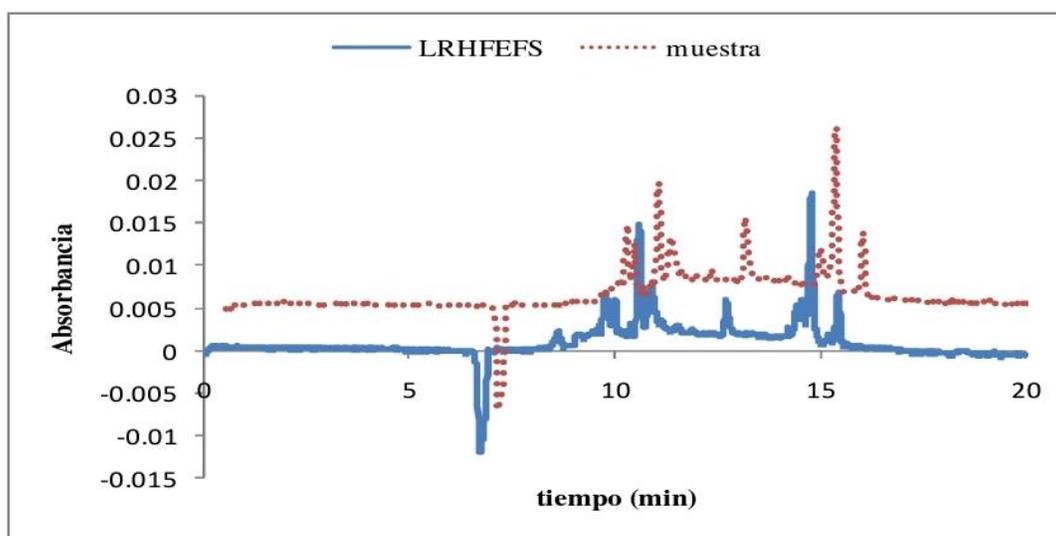


Figura 5.7. Electroferogramas obtenidos para la región visible (426 nm) en buffer de fosfatos (50 mM, pH 8.1), $V=12.5$ kV.

En las figuras anteriores se puede apreciar una similitud entre los picos obtenidos para las dos regiones entre ambos extractos, por lo que se piensa que la muestra tratada, efectivamente se trata de *Eysenhardtia polystachya*. Para asignar la correspondencia entre los picos obtenidos para la muestra y el LRHFEFS en las

Figuras 5.8 y 5.9 se presentan los contornos (espectros bidimensionales) obtenidos para el LRHFEFS y la muestra, en las regiones ultravioleta y visible, respectivamente.

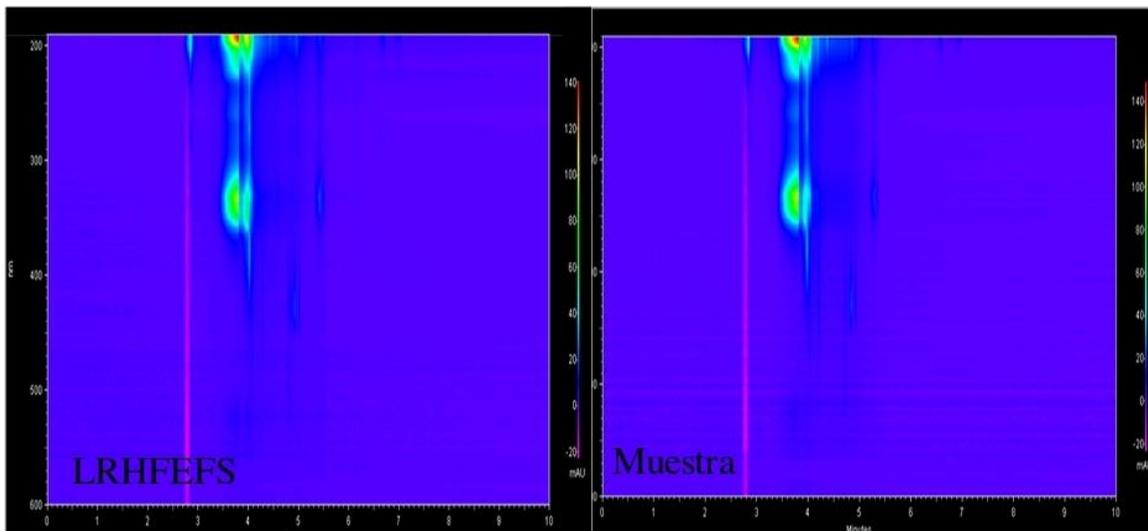


Figura 5.8. Contornos de LRHFEFS y muestra de palo azul obtenidos para la región UV (214 nm) en buffer de fosfatos (10 mM, pH 8.1), V=20 kV.

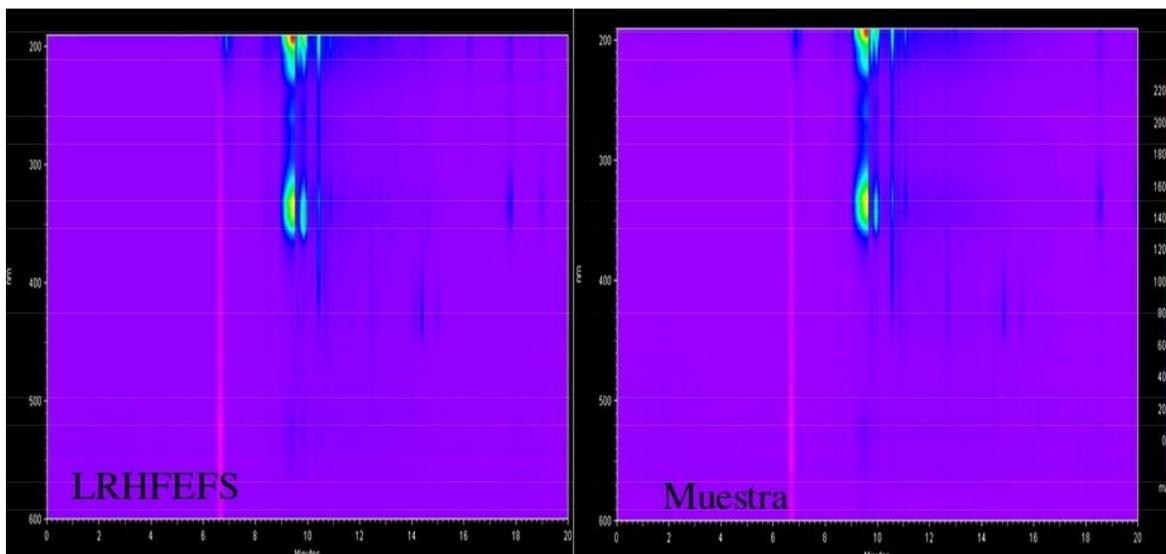


Figura 5.9. Contornos de LRHFEFS y de muestra de palo azul obtenidos para la región visible (426 nm) en buffer de fosfatos (50 mM, pH 8.1), V=12.5 kV.

En los espectros bidimensionales se observa que los picos obtenidos tienen correspondencia en los espectros, aunque del LRHFEFS a la muestra se encuentren ligeramente desplazados en cuanto al tiempo. Con esto podemos decir que no solo los electroferogramas son similares, sino que los componentes en ambas muestras son los mismos, por lo tanto, podemos confirmar que la muestra es efectivamente, Palo azul.

Más aún, este último análisis presentado se realizó casi dos años después de haber desarrollado la metodología y los resultados obtenidos, en términos de huella digital de *Eysenhardtia polystachya*, son similares, como se muestra en la Figura 5.10.

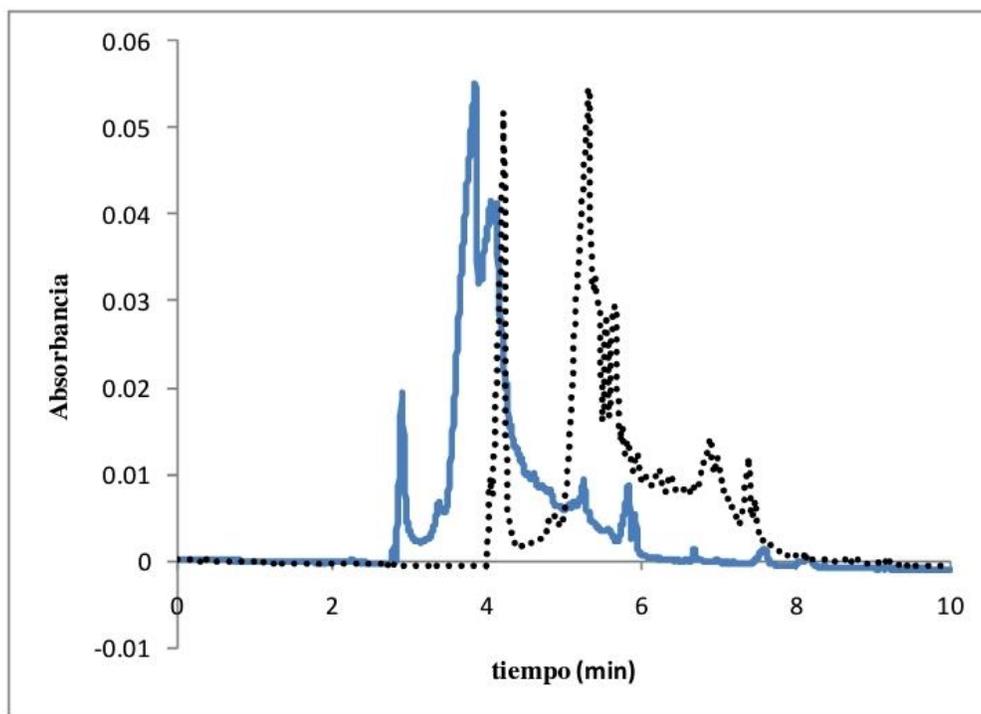


Figura 5.10. Electroferogramas de extractos de LHRFEFS para la región UV, obtenidos en condiciones óptimas, pero realizados con dos años de diferencia. El más reciente (línea sólida), obtenido para el trabajo publicado (línea punteada).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se demuestra que la electroforesis capilar es una técnica versátil que tiene vastas aplicaciones, no sólo como una técnica de análisis, sino que también es útil para calcular constantes de acidez, así como también para estudiar la evolución de la formación de micelas.

Además, se comprueba que se pueden calcular parámetros fisicoquímicos tales como:

- movilidades de especies iónicas
- conductividades iónicas equivalentes
- concentración micelar crítica de tensoactivos

Todo lo anterior siguiendo los cambios en la movilidad con respecto a algún parámetro experimental como el pH (para la obtención de pK_A 's) o la concentración del tensoactivo en el caso de las constantes de asociación. Aunque el comportamiento de la movilidad contra parámetros como el pH no es lineal se pueden hacer ajustes de los datos experimentales, para esto resultan útiles programas computacionales como SQUAD; o bien, para simular el comportamiento de la movilidad con el cambio en la concentración de tensoactivo se pueden usar programas como MEDUSA.

Igualmente, esta técnica demuestra su utilidad en la obtención de huellas digitales para sistemas complejos como lo son los extractos de hierbas medicinales; ya que sus costos de operación son significativamente más bajos que los de los métodos cromatográficos comúnmente empleados para este fin. En este caso la electroforesis capilar se vuelve no solo una opción más viable sino también un método ortogonal de comprobación y comparación.

Cabe mencionar que, gracias al detector de arreglo de diodos, el análisis y la asignación de los picos, tanto en separaciones como en la determinación de valores de constantes, se facilita ya que al observar el espectro se comprueba inequívocamente la presencia de un analito o la aparición de una nueva especie absorbente en el sistema.

Resultó ser especialmente útil, para el caso de los fármacos, el hecho de que se utilice poca cantidad de muestra, ya que en el caso de los *LQM's* se disponía únicamente de 100 mg.

Por todo lo anterior se pretende que el uso de esta técnica se difunda en los laboratorios como una alternativa al cálculo de parámetros fisicoquímicos como los ya mencionados y no sólo se use como método de separación.

Quedaron como pendientes, mejorar el modelo del ajuste hecho al comportamiento de la movilidad en función de la concentración de tensoactivo (capítulo IV), ya que en este modelo propuesto sólo se introdujo el equilibrio de micelización y no se está considerando la interacción del SDS con el naftaleno el cual, aunque está en pequeña cantidad, se encuentra presente en el sistema y no puede despreciarse del todo.

En cuanto a la caracterización por huella digital de *Eysendhartia polystachya*, hace falta aplicar esta metodología a una muestra de madera que no sea Palo Azul, con el fin de no dejar lugar a dudas que se encontró la huella digital del *Eysendhartia polystachya*.

Por último, si se usa la técnica MEKC para separación de compuestos neutros, se podría emplear también en la determinación de constantes de equilibrio para analitos que sean muy poco solubles en agua, o bien que sean inestables en medio acuoso; ya que se sabe que las micelas pueden ayudar al proceso de solubilización, y en ocasiones también a la estabilización de compuestos, esta es una vía interesante que valdría la pena explorar.

REFERENCIAS

- [1] Barrón D., Jiménez-Lozano E., Barbosa J., Anal. Chim Acta, 415 (2000), 83
- [2] J. Barbosa, D. Barrón, E. Jiménez-Lozano, V. Sanz-Nebot, Anal. Chim Acta, 437 (2001), 309
- [3] E. Jiménez, I. Marqués, D. Barrón, J.L. Beltrán, J. Barbosa, Anal. Chim. Acta, 464 (2002), 37
- [4] Barbosa J., Barrón D., Jiménez-Lozano E., J. Chromatogr. A, 839 (1999), 183
- [5] Barrón D., Irlés A., Barbosa J., J. Chromatogr. A, 871 (2000), 367
- [6] Barrón D., Jiménez-Lozano E., Irlés A., Barbosa J., J. Chromatogr. A, 871 (2000), 381
- [7] V. Sanz-Nebot, Benavente F., I. Toro, J Barbosa, J. Chromatogr. A, 921 (2001), 69
- [8] Barrón D., Jiménez-Lozano E., Barbosa J., J. Chromatogr. A, 919 (2001), 395
- [9] V. Sanz-Nebot, Benavente F., I. Toro, J Barbosa, J. Chromatogr. A, 942 (2002), 145
- [10] V. Sanz-Nebot, Benavente F., I. Toro, J Barbosa, J. Chromatogr. A, 985 (2003), 411
- [11] Mbuna J., Takayanagi T., Oshima M., Motomizu S., J. Chromatogr. A, 1022 (2004), 191
- [12] Weinberger, R., Practical Capillary Electrophoresis, Academy Press, Inc., 1993
- [13] Foret, F., Capillary Zone Electrophoresis, VCH, 1993
- [14] Cooper, C., JChemEdu., 75 (3), 343
- [15] Smith, S., Strasters, J. y Khaledi, M., J. Chromatogr, 559 (1991), 57-68
- [16] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, Anal. Chem., 56 (1984), 111
- [17] Morin Ph., Archambault J.C., André P., Dreux M., Gaydou E., J. Chromatogr. A, 791 (1997), 289
- [18] The Merck Index
- [19] A.E. Sánchez-Rivera, S. Corona-Avendaño, G. Alarcón-Angeles, A. Rojas-Hernández, M.T. Ramírez-Silva, M.A. Romero-Romo, Spectrochim. Acta A, 59 (2003), 3193-3203

- [20] J. Barbosa, I. Marqués, G. Fonrodona, D. Barrón, R. Bergés, *Anal. Chim. Acta*, 347 (1997), 385
- [21] J. Barbosa, I. Toro, R. Bergés, V. Sanz-Nebot, *J. Chromatogr. A*, 915 (2001), 85
- [22] V. Sanz-Nebot, I. Toro, J. Barbosa, *J. Chromatogr. A*, 933 (2001), 45
- [23] J. Barbosa, I. Toro, V. Sanz-Nebot, *J. Chromatogr. A*, 823 (1988), 497
- [24] J. Barbosa, R. Bergés, V. Sanz-Nebot, *J. Chromatogr. A*, 823 (1988), 41
- [25] E. Bernhard, F. Zimmermann, *Arzneim-Forsch.*, 34 (1984), 647
- [26] H. Chakraborty, R. Banerjee, M. Sarkar, *Biophysical Chemistry*, 104 (2003), 315.
- [27] R. Moya-Hernández, J.C. Rueda-Jackson, M.T. Ramírez, G.A. Vázquez, J. Havel, A. Rojas-Hernández, *J. Chem. Educ.* 79 (2002) 389.
- [28] S. Poole, S. Patel, K. Dehring, H. Workman, C.F. Poole, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 445.
- [29] D.J. Legget, W.A.E. McBryde, *Anal. Chem.* 47 (1975) 1065.
- [30] D. Legget, *Computational Methods for Determination of Formation Constants*, Plenum Press, New York, 1985
- [31] D. Rodríguez-Barrientos, A. Rojas-Hernández, A. Gutiérrez, R. Moya-Hernández, R. Gómez-Balderas, M.T. Ramírez-Silva, *Talanta submitted*.
- [32] R.S. Tsai, P.A. Carrupt, *Helv. Chim. Acta*, 76 (1993), 842
- [33] P. Luger, K. Daneck, W. Engel, G.W. Trummlitz, S. Klaus, *Eur. J. Pharm. Sci.* 4 (1996), 175-187.
- [34] A.J. Bard, R. Faulkner, *Electrochemical Methods Fundamentals and applications*, John Wiley & Sons, New York, 1980
- [35] J.M. Islas-Martínez, *Determinación de las constantes de acidez de compuestos Piperidínicos de interés biológico*, Tesis de maestría, 2006
- [36] J.M. Islas Martínez, D. Rodríguez-Barrientos, A. Galano, E. Angeles, L.A. Torres, F. Olvera, M.T. Ramírez-Silva, A. Rojas-Hernández, *J. Phys. Chem B*, 113 (2009), 11765
- [37] J.N. Miller, J.C. Miller, *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4a. Edición, Pearson Prentice Hall, Madrid, 2002
- [38] J.C. Jacquier, P.L. Desbène, *J. Chromatogr. A*, 718 (1995), 167
- [39] Puigdomenech I. MEDUSA (Making Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms).
http://www.met.kth.se/matchem/Photo_Instruments/medusa.html

- [40] A. Rojas-Hernández, R. Moya-Hernández, J.C. Rueda-Jackson, M.T. Ramírez-Silva, *EFSolGelST*, 2003, 364
- [41] Y. Ji, G. Alaerts, C. Xu, Y. Hu, Y. Vander, *J. Chromatogr. A*, 1128 (2006), 273
- [42] G. Pérez, S. Vargas, G. Pérez, S. Zavala, *Phytotherapy Research*, 12 (1998), 144
- [43] R.M. Pérez Gutiérrez, R. Vargas Solís, L.M. García Dueñas, Boletín del Colegio Mexicano de Urología, Vol. XVII, No. 3 (julio-septiembre 2002), 134
- [44] F.J. Alarcón-Aguilar, R. Román-Ramos, S. Pérez-Gutiérrez, A. Aguilar-Contreras, C. Contreras-Weber, J.L.J. Flores-Saenz, *Ethnopharmacol*, 61 (1998), 101
- [45] J.M. Narvaez-Mastache, María Luisa Garduño-Ramírez, Laura Alvarez, G. Delgado, *J.Nat.Prod.*, 69 (2006), 1687
- [46] F.J. López-Bermúdez, *Tesis de Licenciatura*, Universidad del Istmo, febrero, 2009.
- [47] C.A. Rice Evans, L. Parker, M. Dekker, *Flavonoids in Health and Diseases*, New York (1988)
- [48] L. Magnani, E.M. Gaydou, J.C. Hubaud, *Anal. Chim Acta*, 411 (2000), 209
- [49] P.G. Waterman, S. Mole, *Methods in ecology. Analysis of phenolic plant metabolites*, Blackwell Scientific Publications, (1994), 237
- [50] RF. Gonzales, G. Ochoa, N. Guzmán, E Castañeda, *Utilización de taninos de corteza de pino en la preparación de adhesivos para vigas laminadas*. (1989)
- [51] M.L. Price, L.G. Butler, *J.Agric.FoodChem.*, 26 (1997), 1268 [52] L.G. Butler, *J.Agric.FoodChem.*, 30 (1982), 1094
- [53] P. Salinas-Hernández, F.J. López-Bermúdez, D. Rodríguez-Barrientos, M.T. Ramírez-Silva, M.A. Romero-Romo, F. Morales-Anzures, A. Rojas-Hernández, *Journal of Separation Science*, 31 (2008), 741



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00051

Matrícula: 203180209

APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR A LA DETERMINACION DE CONSTANTES DE EQUILIBRIO Y A LA CARACTERIZACION DE MUESTRAS COMPLICADAS.

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 18 del mes de diciembre del año 2009 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. LAURA GALICIA LUIS
- DRA. ALMA LUISA REVILLA VAZQUEZ
- DRA. MARIA ELENA PAEZ HERNANDEZ
- DR. CARLOS ANDRES GALAN VIDAL
- DR. ALBERTO ROJAS HERNANDEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS (QUIMICA)

DE: DAMARIS RODRIGUEZ BARRIENTOS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:



DAMARIS RODRIGUEZ BARRIENTOS
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

aprobar.

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBI

DRA. VERONICA MEDINA BAÑUELOS

PRESIDENTA

DRA. LAURA GALICIA LUIS

VOCAL

DRA. ALMA LUISA REVILLA VAZQUEZ

VOCAL

DRA. MARIA ELENA PAEZ HERNANDEZ

VOCAL

DR. CARLOS ANDRES GALAN VIDAL

SECRETARIO

DR. ALBERTO ROJAS HERNANDEZ