



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE
COMPLEJOS DE INCLUSIÓN POR
ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA.

T E S I S

Que para obtener el título de:

Q U Í M I C A

P R E S E N T A:

ABIGAIL SAAVEDRA RUIZ

ASESORES:

Dr. ENRIQUE R. ANGELES ANGUIANO.

M. en C. MIGUEL ANGEL HERNÁNDEZ BALBOA.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Determinación analítica de Complejos de Inclusión por Electroforesis Capilar de Zona

que presenta la pasante: Abigail Saavedra Ruiz
 con número de cuenta: 403078527 para obtener el título de :
Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 6 de Diciembre de 2007

PRESIDENTE	<u>Dr. Enrique Ramón Angeles Anguiano</u>	
VOCAL	<u>MC. Rubén Sanabria Tzintzún</u>	
SECRETARIO	<u>MC. Luis Antonio Martínez Arellano</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MC. Alberto Ramírez Murcia</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q. Aurora Karina Franco Francisco</u>	

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Química Medicinal y teórica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la dirección del Dr. Enrique R. Ángeles Anguiano, M. en C. Miguel A. Hernández Balboa y QFB Víctor H. Agregó Reyes, con el apoyo económico parcial otorgado por el PAPIIT (proyecto IN213606) y CONACYT. Con la asistencia técnica de C. Pérez y D. Jiménez.

AGRADECIMIENTOS

Señor Dios todo poderoso, Jehová de los Ejércitos. Te doy infinitas gracias por todas las bendiciones que recibo cada instante de mi vida, y cada día que me das permiso de conocer es una nueva oportunidad de ser feliz.

Mami y papi, no tengo palabras para agradecerles todo el amor, apoyo, comprensión, disciplina incondicional que he recibido a lo largo de mi vida, y en esta ocasión que he culminado una de mis mas grandes metas solo me resta decirles gracias, son los mejores padres que Dios me pudo haber dado. Los amo.

Hermanos de mi alma, Rene y Edgar, definitivamente cada día que amanece doy gracias por tener a los mejores amigos, que desde bebés vinieron a llenar mi vida de un inigualable amor, son mi apoyo, consuelo, ejemplo, diversión. Mil besos hermosos.

Abuelita, gracias de todo corazón por todo el apoyo, amor recibido a lo largo del inicio de esta meta, ha sido una bendición poder convivir más con usted.

Tía Lupe, gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme, consentirme, cuidarme, el solo hecho de tu presencia me hace sentir como en mi casa.

Lore, definitivamente has sido como mi hermana pequeña te quiero mucho, gracias porque siempre puedo contar contigo.

Tío Nacho, gracias por todo, porque siempre me hiciste sentir como en casa, y encontraste la palabra de consuelo en algún momento que la necesite.

Gracias familia Ruiz, por su calidez, porque aún cuando no convivimos como me gustaría se que puedo contar con ustedes. Y nos une un gran cariño. Soy bendecida al tenerlos como familia.

Gracias Familia Saavedra por todo el cariño, por hacerme sentir una mujer llena de virtudes y no puedo evitar sentirme completamente orgullosa de ser parte de su familia los quiero mucho, somos grandiosos.

A lo largo de mi vida he tenido grandes compañero, amistades y a cada uno de ellos le agradezco su apoyo que en determinado momento me dieron, y aún cuando posiblemente nuestros caminos se han alejado, siempre podrán contar conmigo.

No puedo dejar pasar a mis grandes amigas, que en ningún momento me han dejado de apoyar porque se han quedado en mi todos sus ejemplos y sus ganas de triunfar Deysi, Araceli, Claudia, Tania, Elizabeth, Ángeles Carmen.

Gracias a mis amigos Darío, Roberto, Israel, Vladimir, Betel, Pilar porque en ustedes encontré siempre un bonito apoyo, arriba mis químicos 30.

Miguel Ángel, como decirte gracias simplemente, si estuviste conmigo en muchos momentos apoyándome y brindándome tu cariño. Dios te bendiga, te llene de bendiciones cada instante de tu vida. Siempre tendrás un lugar especial.

Oscar y José, ihasta se escucha como título de canción! Gracias por su amistad y definitivamente mi último semestre no hubiera sido igual sin ustedes, los quiero mucho, no lo olviden.

Oscar iuuuuu! Un apartado para ti solito. Me encanto compartir contigo el trabajo para la elaboración de esta tesis, gracias por tu apoyo en todo momento. Te quiero mucho y cualquiera que sea tu camino, recuerda que siempre podrás contar conmigo. ¡Yo espero que no sea muy lejano al mío! Pero en fin.

Un agradecimiento especial, para Lulú e Hilda, porque aún cuando somos químicas 30 nuestra convivencia no fue tan allegada, pero siempre ha existido una simpatía que a últimas fechas se ha convertido en una bonita amistad.

Gracias a todos mis compañeros del Laboratorio de Química Medicinal, porque ha sido muy ameno el trabajar a su lado y considero que somos como una familia. Víctor, Miguel, Dr. Enrique, gracias por el apoyo, la confianza, la paciencia, la amistad que me han brindado.

CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN.....	I
2 GENERALIDADES.....	1
Fuente de poder.....	2
Capilares.....	2
Electrodos.....	2
Depósitos o viales.....	3
Detector.....	3
Flujo Electroosmótico.....	5
Inyección de Muestra.....	7
Mecanismo de separación.....	8
Tipos de Electroforesis Capilar.....	8
β –Ciclodextrinas.....	12
Clorambucilo.....	14
Propiedades Fisicoquímicas.....	14
3 OBJETIVOS.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
4 MATERIAL Y EQUIPO.....	16
5 REACTIVOS.....	16
6 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	17
7 CURVAS DE CALIBRACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE CICLODEXTRINAS CON CLORAMBUCILO.....	19
8 ESTUDIO DE LA MOVILIDAD DE LOS COMPLEJOS.....	21
9 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN.....	22
10 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
11 CONCLUSIONES.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	55
ANEXO 1. Análisis de varianza del clorambucilo.....	58
ANEXO 2. Análisis de varianza del complejo de clorambucilo –dimetil – β – ciclodextrina.....	59
ANEXO 3. Análisis de varianza del complejo de clorambucilo – 2 – hidroxipropil – β – ciclodextrina.....	60
ANEXO 4. Análisis de varianza del complejo de clorambucilo –trimetil – β – ciclodextrina.....	61

1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen muchos factores como la alimentación, el cambio climático, el ritmo de vida, etc. los cuales se cree que son la causa de diversas enfermedades que no tienen una cura. Para poder erradicarlos es necesario llevar exhaustivos estudios, los cuales se basan en las diferentes áreas de conocimiento como son Química orgánica, Química analítica, Fisicoquímica, Física, Matemáticas, Bioquímica, Informática, solo por mencionar algunas y para poder lograr el objetivo es necesario que se trabaje en equipo permitiendo generar el conocimiento necesario para saber sobre esas terribles enfermedades.

En el área de Química analítica se han desarrollado diversas técnicas las cuales permiten separar y cuantificar diversas sustancias, estas técnicas deben tener ciertas características fundamentales para que trasciendan y es que deben ser sensibles, rápidas, eficientes, de bajo costo y lo importante que es generar un mínimo de residuos tóxicos. De acuerdo a estas condiciones los métodos de separación más empleados en la actualidad son la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), cromatografía de gases (CG) y electroforesis capilar (CE). Para saber cual técnica debe elegirse es importante saber que fines se tienen si son analíticos o preparativos, saber que equipo se tiene disponible, con que recursos económicos se cuentan y cuanto tiempo hay disponible, una vez contestada cada uno de estos puntos se obtendrá la técnica correcta.

La técnica que se empleó en este trabajo fue la electroforesis capilar la cual se basa en las diferencias en la velocidad de migración de especies cargadas en un campo eléctrico aplicado. De esta técnica existen diferentes variaciones, siendo más específica la técnica fue electroforesis capilar de zona.

La razón por la cual se utilizó la electroforesis capilar fue porque no requiere de columnas especiales de alto costo, tiene un alto poder de separación (alta eficiencia), el desarrollo de los métodos es muy rápido, el consumo de reactivos, solventes y soluciones amortiguadoras es mínimo a comparación de las demás técnicas analíticas, y por todo lo anterior es compatible con el estudio de los complejos de inclusión con β -ciclodextrinas

Hoy en día se han publicado trabajos de reconocimiento molecular y han enfocado sus estudios en varias moléculas terapéuticas, cuya biodisponibilidad es afectada

frecuentemente por problemas de solubilidad limitada o la estabilidad entre otras, para este problema se han realizado recientemente estudios de encapsulación molecular satisfactorios que permiten mejorar la biodisponibilidad de los medicamentos protegiéndolos de la descomposición, mejorar su solubilidad, enmascarar olores y sabores desagradables.¹ Una de las sustancias muy utilizadas son las β – ciclodextrinas.

Por medio de la electroforesis capilar se identificaron los complejos de inclusión dimetil β – ciclodextrina ,2 –hidroxipropil β – ciclodextrina y trimetil β – ciclodextrina con clorambucilo, realizando las curvas de calibración para cada uno, hasta comprobar la reproducibilidad de los tiempos de migración y áreas. Posteriormente se estudio el comportamiento de la movilidad de cada uno de los complejos agregando diferentes cantidades de β – ciclodextrina respectivamente, en el analito soporte (solución amortiguadora), y como analito de estudio el complejo de inclusión y por último se determinaron las constantes de formación de los tres complejos para conocer su estabilidad, las cuales se determinaron agregando diferentes cantidades de la β – ciclodextrina correspondiente en el analito soporte (solución amortiguadora), sin embargo en este caso el analito de estudio fue el clorambucilo, que es el fármaco de interés.

Este estudio se realizó con el propósito de obtener un método analítico confiable que nos permita determinar los complejos de inclusión de β – ciclodextrinas con clorambucilo y dejar la pauta para el estudio posterior de otros complejos de inclusión, y con ello la síntesis de nuevos medicamentos.

2 GENERALIDADES

La electroforesis capilar es un método de separación basado en las diferencias de la velocidad de migración de especies cargadas en un campo eléctrico.²

La electroforesis tiene varias modalidades como electroforesis capilar de zona, isotacoforesis capilar, enfoque capilar isoeléctrico, cromatografía micelar electrocinética, electroforesis capilar en gel, electrocromatografía capilar. La electroforesis capilar de zona es la base de todas las demás por su simplicidad operacional y versatilidad, su intervalo de aplicación es diverso y las áreas de aplicación pueden ir desde problemas relacionados con la separación de especies pequeñas^{3,4} hasta la separación de especies de gran tamaño.^{5,6} Además sin olvidar que se requieren pequeños volúmenes para realizar el análisis. Una de las principales ventajas de la electroforesis capilar es que requiere una instrumentación relativamente simple: una fuente de alto voltaje, un capilar cuyos extremos se encuentran sumergidos, junto con dos electrodos, en dos viales que contienen una disolución amortiguadora, un detector y un sistema de adquisición de datos. A continuación en la figura 1 se muestra el equipo de electroforesis capilar con el que se trabajó.



Fig. 1 Equipo de Electroforesis Capilar⁷

Fuente de poder

Es una fuente de corriente continua conectada a dos electrodos de platino inmersos en un electrolito, por lo tanto tiene posibilidades de imponer voltaje o corriente, capacidad para generar hasta 30 kV, posibilidad de trabajar polaridad positiva o negativa, controlar corriente de hasta 300 μ A y ofrece cierta seguridad.⁸

Capilares

Están hechos de sílice fundida y teflón. Los capilares de sílice fundida son transparentes a la luz UV/Visible, fácilmente modificables, y se ionizan de igual manera (tienen propiedades ácidas), son flexibles y tienen alta conductividad (grupos silanol). Por otra parte los capilares de teflón son pobres en conductividad térmica y su diámetro interno es relativamente grande mayor de 100 μ m. La longitud de los capilares es de 25 a 70 cm., se conoce como longitud total al largo total del capilar y como longitud efectiva a la distancia del extremo del capilar donde se inyecta la muestra hasta donde se encuentra la ventana que se dirige al detector.

Los capilares tienen diámetro interno de 50, 75, 100 y 200 μ m, el recubrimiento de los capilares es dinámico o permanente. En el recubrimiento dinámico se adiciona un aditivo al electrolito soporte, el más usado es el BCTA (Bromuro de cetiltrimetilamino) y BDTA (Bromuro de dicetiltrimetilamino); por otro lado, el recubrimiento permanente se lleva a cabo con una reacción entre la sílice del capilar y un reactivo específico.⁹

Electrodos

Generalmente de platino u otro material que sea inerte y se encuentra por encima del capilar, esto es, unos 0.5 cm. mas largo que el capilar.⁹

Depósitos o viales

Ofrece varias capacidades (desde microlitos hasta 500 mL dependiendo del equipo y la solución a contener), son inertes y seguros. Durante las separaciones, los extremos del capilar están colocados en dos recipientes que contienen una disolución del electrolito, el mismo con el que se ha llenado el capilar. Ambos recipientes contienen el mismo electrolito y su nivel a de ser el mismo en los dos para evitar cualquier flujo debido a su desequilibrio hidrostático. ¹⁰

Detector

La detección se realiza directamente sobre el capilar, por lo tanto el capilar funciona como celda de detección. El tipo de detector a utilizar va depender de las características del analito y siempre se considerará aquel que proporcione una sensibilidad elevada a todos los compuestos. ¹⁰

Los detectores que se utilizan son: ultravioleta-visible, absorbancia de UV-Visible, Arreglo de diodos, Fluorescencia, (estos dos últimos son derivados de UV-Visible), detección electroquímica, detección amperométrica y de masas.

Generalmente el detector se coloca al final del mismo capilar en el extremo catódico donde se realiza la separación. La sílice fundida (como la capa de poliimida) tiene la ventaja de que a través de ella permite el paso de la luz UV de tal manera que la visualización es en línea.

- a) Detector UV-Visible. Hay básicamente tres tipos; el detector de longitud de onda fija, el detector de longitud de onda variable y el detector de Arreglo de Diodos.
- b) El detector de longitud de onda fija es el más habitual. A pesar de la estabilidad y la facilidad de operación, presenta algunos inconvenientes ya que opera a una única longitud de onda y no es la óptima para cada uno de los compuestos a determinar.
- c) El detector de longitud de onda variable, es aquel que está ajustado a dos longitudes de onda para realizar la medición.

-
-
- d) La introducción del detector de arreglo de diodos ha resuelto este problema ya que permite adquirir al mismo tiempo el espectro de cada uno de los analitos en un mismo análisis, debido a que tiene varias ventanas de detección a distintas longitudes de onda. ¹¹⁻¹³
- e) Detector de fluorescencia. Los compuestos de interés tienen características fluorescentes. El método desarrollado, que incluye la extracción de fluidos supercríticos mediante CO₂, es muy sensible ya que llega a detectar niveles inferiores a partes por billón (ppb's). A pesar de la gran selectividad de este detector, tiene el inconveniente de que hay pocas aplicaciones en las que los compuestos de interés presenten fluorescencia. Este problema fue superado teniendo en cuenta que se pueden derivar los solutos de interés con moléculas fluorescentes. ¹⁴
- f) Detector de espectrometría de masas. El acoplamiento entre la electroforesis (CE) y la espectrometría de masas (MS) ha supuesto un incremento en el uso de este tipo de detección. Una de las interfases más utilizadas CE-MS es el electrospray, que requiere un flujo mínimo más grande que el utilizado en la parte de separación mediante CE. En general, se aumenta el grado de sensibilidad si se utilizan electrolitos más volátiles (como el ácido acético) a niveles bajos de concentración y se minimizan los compuestos no volátiles. Por otro lado el uso de tensoactivos, como por ejemplo el SDS (dodecilsulfato sódico o laurilsulfato sódico), incrementa la intensidad de la señal del fondo y presenta una de las mayores barreras en el acoplamiento de la técnica cromatografía micelar electrocinética (CME) con la MS. ^{15,16}
- g) En el detector electroquímico de conductividad algunos autores observan que esta determinación es más atractiva para los iones que tienen una movilidad diferente a la del electrolito. Dependiendo del diseño, pueden acoplarse fácilmente a los equipos de electroforesis capilar y a su vez a otro detector de tal manera que la detección sea simultánea y con ello aumentar el poder de detección de iones con diferentes movilidades. ¹⁰

-
-
- h) El detector amperométrico tiene electrodos de Cobre, se utiliza para sustancias fácilmente oxidables o reducibles, por ejemplo, azúcares reductores como la glucosa y fructosa. Una de sus principales ventajas es que tiene gran selectividad, ya que solamente detecta aquellos compuestos electroactivos al voltaje aplicado, facilitando a la determinación de aquellas sustancias en que los compuestos de interés se han de estudiar en matrices más o menos complejas, como son los fluidos corporales.¹

Flujo Electrosmótico

El capilar y los viales se llenan con un electrolito de capacidad amortiguadora. La muestra formada por un conjunto de aniones y cationes, se introduce dentro de este sistema ocupando una única zona o franja. Al someter este sistema a la influencia de un campo eléctrico, las especies iónicas del electrolito y de la muestra migran hacia el electrodo correspondiente, es decir, se establece un movimiento de iones que forman parte del sistema, a causa de la alta concentración del electrolito comparada con la concentración de la muestra, algunas propiedades físicas como la conductancia serán influenciadas principalmente por el electrolito mientras que la influencia de la muestra podrá ser despreciada. Cuando haya transcurrido cierto tiempo desde el inicio de la aplicación del campo eléctrico, los componentes de la muestra migrarán cada uno a su velocidad y se separarán en diferentes zonas según la movilidad de cada analito.

En electroforesis capilar, además de las moléculas de soluto cargadas, la disolución tampón también se desplaza por el capilar bajo la influencia de un campo eléctrico este fenómeno se nombra flujo electrosmótico. Al trabajar con polaridad positiva, de forma que el polo positivo o ánodo, se encuentra en el extremo del capilar donde se realiza la inyección de la muestra, el flujo electrosmótico se va del polo positivo al negativo, es decir, que el tampón se mueve del vial de entrada hacia el detector y al vial de salida.¹⁷

La pared del capilar está constituida por un entramado de grupos silanol Si-OH, con un pKa alrededor de 5. Esto hace que al trabajar con soluciones amortiguadoras básicas se encuentre cargada negativamente con grupos silanolato (SiO⁻) y los protones u otras cargas positivas libres de la disolución se sitúen cerca de las cargas negativas de la

pared formando una doble capa. Al aplicar una diferencia de potencial las cargas libres se moverán hacia los polos contrarios. Como las cargas negativas del capilar no se pueden mover, existe un flujo resultante de cargas positivas hacia el polo negativo. Los cationes se encuentran solvatados con moléculas de agua. Esto provoca que con su movimiento se desplace también todo el seno de la solución tampón, creando el flujo electroosmótico. En la figura 2 se muestra el orden en el cual los iones migran a través del capilar.

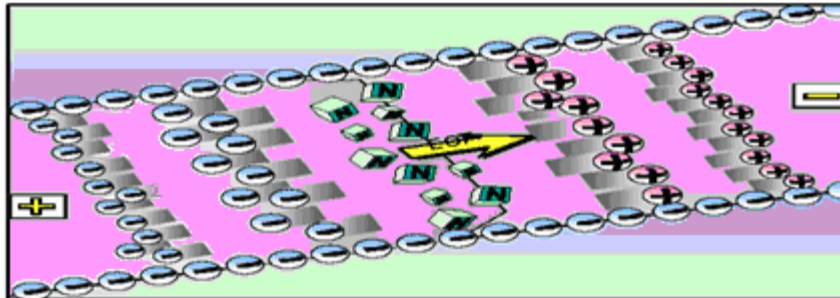


Fig. 2 Migración de iones a través del capilar

Puesto que la movilidad electroosmótica varía con la viscosidad del medio, es necesario controlar muy bien la temperatura, porque si no se disipa bien el calor generado por el paso de la corriente, se pueden producir diferencias de viscosidad de unas zonas a otras.

Para comprobar el flujo electroosmótico se utilizan sustancias neutras como benceno, piridina, metanol acetona, etc.

El perfil del flujo electroosmótico, en contraste con el flujo originado por presión, presenta un perfil plano, porque las diferencias de velocidad acaban muy cerca de la pared.¹⁰ En la figura 3 se observa la diferencia del flujo electroosmótico y el flujo hidrodinámico.



Fig. 3 Perfil del flujo electroosmótico Perfil del flujo hidrodinámico

Inyección de la Muestra

Es importante tomar en cuenta que para mantener la eficacia del método de electroforesis capilar es necesario que el sistema de inyección no introduzca un ensanchamiento de zona significativo y esto se minimiza al no tener conexión con válvulas de inyección.

Se realizan dos tipos de inyección la hidrodinámica y la electrocinética. En la hidrodinámica se emplea la presión para contener la muestra dentro del capilar. La electrocinética se ayuda de un potencial para introducir los componentes cargados de la muestra en el capilar. ¹⁸

Para introducir la muestra dentro del capilar se cambia el vial de entrada por un vial de muestra y se aplica la inyección durante 10 a 30 segundos introduciéndose en el capilar un volumen de muestra del orden de nanolitros.

Para la inyección hidrodinámica existen diferentes formas de producir una presión superior al extremo del capilar en contacto con la solución de la muestra: por flujo gravitatorio de la solución electrolítica mediante la elevación del vial con la muestra, mediante la aplicación de presión sobre la muestra, y por succión de la muestra mediante aplicación de vacío al vial de salida.

Este tipo de inyección no depende de la movilidad electroforética de los solutos ni de la composición de la solución de la muestra. El volumen de muestra inyectada viene definido por las dimensiones del capilar, la viscosidad del electrolito, la presión aplicada y el tiempo. También se ha de controlar con precisión la temperatura del capilar, ya que la viscosidad del electrolito puede verse afectada y variar la cantidad de muestra que se inyecta.

Algunos problemas que se pueden presentar en el momento de inyectar es que el vial de la muestra y el del electrolito no tienen el mismo nivel o cuando se sumerge el capilar dentro del vial de la muestra por lo tanto se ve afectado el flujo hidrodinámico y con ello se afecta la señal de respuesta, la eficacia de separación o la reproducibilidad de los tiempos de migración. ¹⁹

La inyección electrocinética está basada en el hecho de que el voltaje puede causar movimientos electroforéticos y electroosmóticos. Se aplica un voltaje elevado durante un breve periodo de tiempo. En este caso, los compuestos se introducen en el capilar por la acción conjunta de la migración y del efecto de la movilidad electroosmótica.

La cantidad inyectada es función de la movilidad electroosmótica de cada componente individual de la muestra. Este hecho genera algunas objeciones importantes, como la posibilidad de que se discriminen algunas especies iónicas o bien que varíe la cantidad de muestra inyectada en función de la conductividad del medio. Todos estos fenómenos ocasionan que sea menos reproducible que la inyección hidrodinámica.^{20 - 22}

Mecanismo de Separación

Para llevar a cabo la separación de los analitos es importante considerar dos tipos de fenómenos electrocinéticos los cuales son electromigración y electroósmosis. La electromigración, es el flujo electroforético que se origina cuando las cargas presentes migrarán hacia el electrodo opuesto a su carga. Por otro parte la electroósmosis es el flujo electroosmótico ya explicado anteriormente.¹⁰

Tipos de Electroforesis Capilar

Aun cuando la técnica de electroforesis capilar de zona es la base de las demás técnicas electroforéticas, es bueno tener presente el concepto de dichas técnicas, por ello se describen a continuación.

Electroforesis Capilar en Gel (CGE). El capilar se llena con un gel polimérico que evita, en parte, la convección y difusión, puede ser restrictivo para determinados tamaños moleculares. Es la más parecida a la convencional pero con las ventajas de precisión de este equipo instrumental. Se utiliza para fragmentos de ácidos nucleicos, proteínas y macromoléculas biológicas.^{2,10} En la figura 4 se observa un esquema del capilar preparado para la técnica de electroforesis capilar en gel.

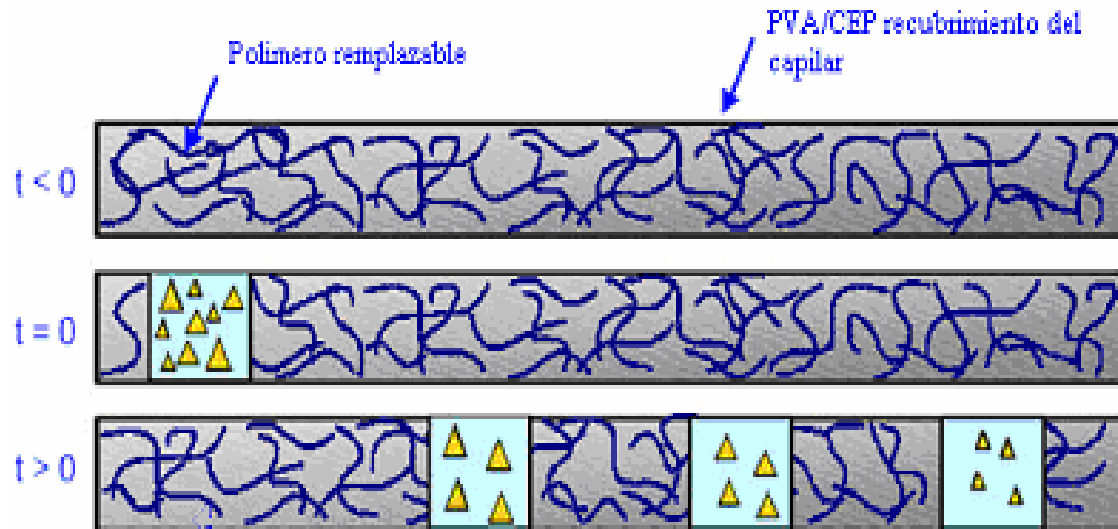


Fig. 4 Esquema de Electroforesis Capilar en Gel

Isoelectroenfoque Capilar (CIEF). Se establece un gradiente de pH en el capilar, mezclando la muestra con anfolitos. Se utiliza para proteínas. La separación se lleva a cabo por puntos isoeléctrico y el capilar es neutro, por lo tanto no tiene flujo electroosmótico.^{2, 10} En la figura 5 se muestra una ilustración de isoelectroenfoque capilar.

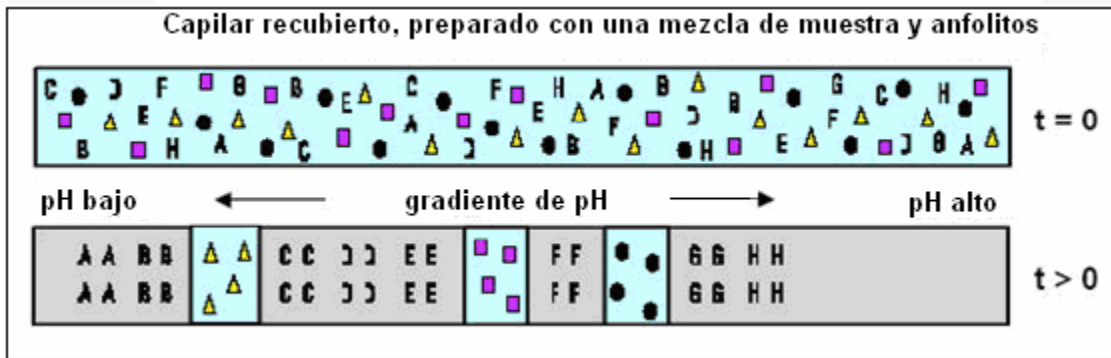


Fig. 5 Esquema de Isoelectroenfoque Capilar

Isotacoforesis Capilar (ITP). La muestra se inyecta entre dos tampones, el frontal con iones más rápidos que la muestra y el terminal, más lentos. Se conecta el campo eléctrico, los componentes de la muestra se separan en bandas entre los dos tampones según su velocidad de avance (según su movilidad) y rápidamente se alcanza un equilibrio y a partir de el, todas se mueven manteniendo la misma posición relativa. Se utiliza en pretratamiento de muestras complejas o muy diluidas.^{2, 10} En la figura 6 se muestra un esquema de la Isotacoforesis capilar.

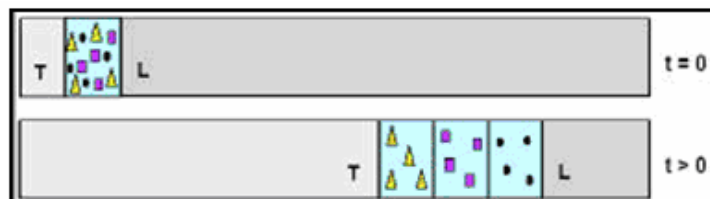


Fig. 6 Esquema de Isotacoforesis Capilar

Electrocromatografía Capilar (CEC). Es una mezcla entre cromatografía líquida y electroforesis, donde existen dos fases y fenómenos electrocinéticos. Una fase móvil, por ejemplo polar, se transporta a lo largo de una fase estacionaria, no por bombeo mecánico si no por flujo electroosmótico. La fase estacionaria puede ser una columna que contenga un grupo alquilante de dieciocho carbonos (C18). Las partículas de los constituyentes de la mezcla se separan por diferente movilidad electroforética y por flujo electroosmótico, a la vez que se distribuyen entre una fase estacionaria y otra móvil, lo cuál permite su aplicación a sustancias de carácter catiónico, aniónico y neutras. Se puede utilizar para sustancias muy parecidas entre sí, que se separan en un corto espacio de tiempo.^{2,10}

Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar, (MERK). Introducida por Tarabe en 1984, es una de las técnicas más usadas. Se crea una pseudo fase estacionaria con micelas, para lo cual se añaden detergentes al medio para formar micelas, como el dodecilsulfato sódico (SDS), en concentraciones superiores a su concentración micelar crítica (CMC). Permite separar compuestos con o sin carga.^{2,10} El comportamiento de los analitos en la electrocinética micelar se muestra en la figura 7.

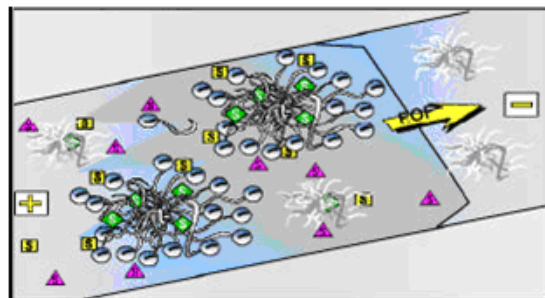


Fig. 7 Esquema de Electrocinética Micelar

β -Ciclodextrinas

Las β-ciclodextrinas (β-CD) son macromoléculas formadas por distinto número de residuos de D (+) glucopiranosos unidos mediante enlaces α (1-4), tienen una forma de cono truncado. En consecuencia la profundidad del cono es el ancho del anillo piranósico. Por fuera de él, en torno al borde inferior (mayor), se hallan los OH secundarios de C-2 y C-3; en torno al borde superior (menor) se hallan los -OH primarios de C-6 esto es, los grupos -CH₂OH. Debido a la presencia de estos grupos hidroxilo hidrofílicos en los extremos de la cavidad, las β -ciclodextrinas son solubles en agua. El cono interior contiene tres bandas superpuestas: dos unidades de C -H y en medio, una unidad glucosídica. Por lo tanto los pares electrónicos no compartidos de los átomos de oxígeno hacen que la cavidad interior sea hidrofóbica.²³ A continuación en la figura 8 se muestra la estructura de una β - ciclodextrina.

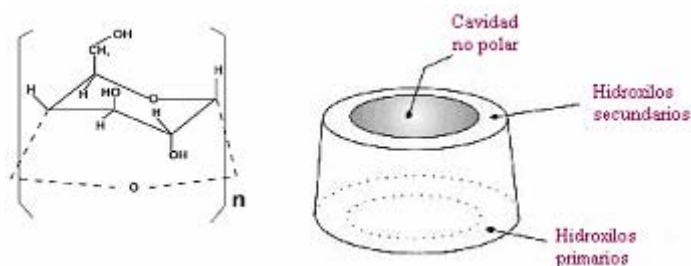


Fig. 8 Estructura de una β-ciclodextrina

Las β-ciclodextrinas son estables en disoluciones neutras y básicas pero se degradan lentamente con un pH ácido. En sólido empiezan a descomponerse por arriba de los 170 °C y son inocuas.

Una ciclodextrina admite en su interior lipófilo una molécula no polar como huésped; obviamente la bondad del acomodo de la molécula huésped depende de su tamaño y polaridad, así como del tamaño de la ciclodextrina particular que se use. El exterior hidrófilo del complejo resultante le confiere solubilidad en agua.

Estas características son las que permiten a las ciclodextrinas formar complejos de inclusión (clatratos), que son la base del encapsulamiento molecular. Se cree que estos compuestos anfitrión-huésped se forman gracias a las interacciones hidrofóbicas dipolo-dipolo, así como a las fuerzas de Van der Waals y enlaces de hidrógeno. La α-

ciclodextrina que tiene la cavidad más pequeña y por ende, el menor volumen, acomoda mejor un núcleo bencénico, mientras que la β -ciclodextrina lo hace con un núcleo de naftaleno. Casi todas las aplicaciones de las ciclodextrinas involucran la formación del complejo de inclusión; estos son relativamente estables y pueden separarse de forma más o menos pura como sustancias cristalinas que se aprovecha directamente (por ejemplo complejos de medicamentos y saborizantes). En otros casos, el complejo es solo un estado de transición (catálisis y/o separación de mezclas, etc.).

Las más utilizadas son las α - β - y γ - CD que contienen 6, 7 y 8 moléculas de glucopiranososa respectivamente, presentan un exterior hidrofílico y una cavidad interior hidrofóbica donde pueden acoger moléculas orgánicas no polares. Las moléculas del principio activo se incluyen en la cavidad y pueden ser transportadas por la β -ciclodextrina hasta el lugar de su actuación. Además las protegen del oxígeno y de la irradiación UV y las liberan uniformemente sobre un tiempo prolongado. Lo que evita cambiar la estructura de la molécula con el fin de obtener las propiedades deseadas. ²³

En la figura 9 se observan las 3 diferentes ciclodextrinas más utilizadas.

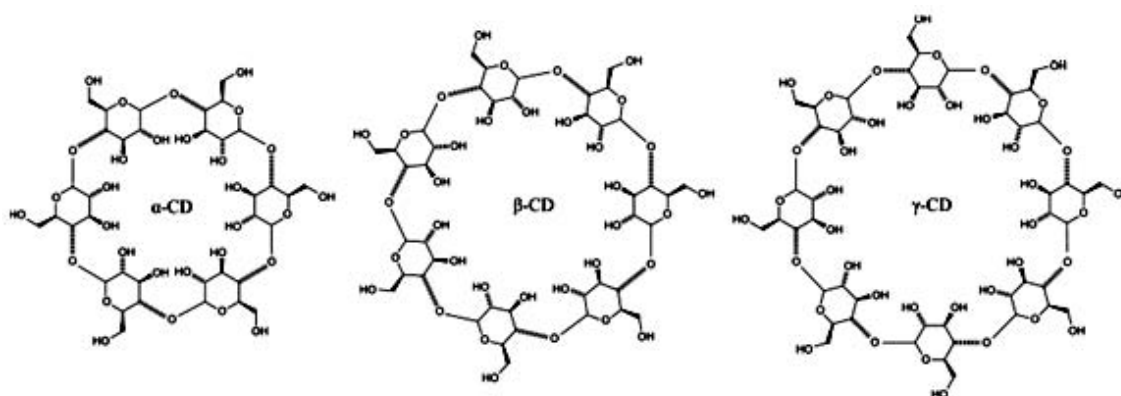


Fig. 9 Estructuras de Ciclodextrinas

Clorambucilo

El clorambucilo es un agente alquilante bifuncional usado en el tratamiento de enfermedad de Hodgkin y no Hodgkin, en linfomas malignos. Leucemia linfocítica crónica y cáncer de ovario y seno.²⁴ Como sabemos todas las quimioterapias son muy agresivas, porque no solo atacan a las células malignas si no también las sanas, lo que ocasiona efectos secundarios, en el caso del clorambucilo provoca heces negras y alquitranadas; sangre en la orina o en las heces; tos o ronquera, etc.²⁵ Similar a otros agentes alquilantes, el factor limitante es la dosis, por lo tanto localizando la acción citotóxica del clorambucilo a una región determinada del organismo se podría tener la mayor ventaja en la reducción de la dosis y consecuentemente la reducción de los efectos indeseables en los tejidos.

Propiedades Físicoquímicas

El clorambucilo tiene un peso molecular de 304.23 g/mol, su punto de fusión es de 64 – 66 °C. Es soluble en éter, a 20°C en 1.5 partes de alcohol, en 2.5 partes de cloroformo y 2 partes de acetona. Prácticamente insoluble en agua. La temperatura a la cuál debe mantenerse es de 2 – 8°C.²⁶ En la figura 10 se muestra la estructura del clorambucilo.

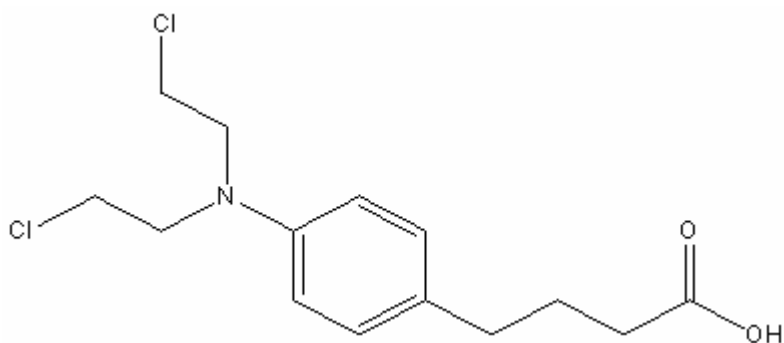


Fig. 10 Estructura del Clorambucilo

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar la determinación de los complejos de inclusión Dimetil β -ciclodextrina, Hidroxipropil β -ciclodextrina y Trimetil β -ciclodextrina con Clorambucilo por Electroforesis Capilar de Zona.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener las curvas de calibración de los complejos de inclusión, Dimetil β -ciclodextrina, Trimetil β -ciclodextrina y Hidroxipropil β -ciclodextrina.
2. Analizar el comportamiento de la movilidad del complejo de inclusión Dimetil- β -ciclodextrina e Hidroxipropil β -ciclodextrina cuando está en presencia de un exceso de β -ciclodextrina.
3. Determinar la estabilidad de los complejos de inclusión por electroforesis capilar, mediante el cálculo de la constante de formación.
4. Realizar el análisis estadístico (media, desviación estándar, coeficiente de variación y análisis de varianza) para cada uno de los complejos de inclusión estudiados.

4 MATERIAL Y EQUIPO

- Membranas Durapore^B PDVF, 0.45 μm , diámetro 25 mm.
- Balanza Mettler AT 200 Fact.
- PACE MDQ sistema de electroforesis capilar Beckman Coulter, (Fullerton CA) con detector de arreglo de diodos y ultravioleta visible.
- Capilar de sílice fundido de 60 cm. de longitud y 50 μm de longitud efectiva 75 μm de diámetro interno y 125 μm de diámetro externo (Beckman Coulter, Fullerton CA)
- pH-metro (Beckman Coulter, Q310)
- Estufa Rios-Rocha S.A.HS-41, 127volts, 9Amps, 1080watts.
- Sonicador Ultrasonic LC 304 Elma.
- Milli-Q plus, Millipore, France.

5 REACTIVOS

- Refrigerante Fluorinert™ FC-77. Beckman P/ACE™ System 2000 Capillary Cartridge Coolant.
- Clorambucilo. Sigma Aldrich.
- Dimetil-β-Ciclodextrina (Beckman Coulter)
- Trimetil- β-Ciclodextrina (Sigma)
- Hidroxipropil- β- Ciclodextrina (Beckman Coulter)
- Hidróxido de sodio (Productos Químicos Monterrey)
- Ácido Clorhídrico (productos Químicos Monterrey)
- Metanol grado HPLC (Tecsiquim)
- Buffer Standard. (Beckman Coulter Inc) pH 4 rojo, pH 7 verde, pH 10 azul.
- Tetraborato de sodio Decahidratado (JT Baker SA de CV)

6 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Hidróxido de sodio 0.1 M

Se disolvió 0.4g de NaOH en 80 mL de agua deionizada, esta solución se coloca en un matraz volumétrico de 100 mL y se lleva al aforo del matraz.

Ácido clorhídrico 0.1 M

Se midieron 0.82 mL de HCl, los cuales se colocaron en un matraz volumétrico y se aforaron a 100 mL con agua deionizada.

Tetraborato de sodio decahidratado 20 mM a pH 9 (solución amortiguadora de corrida)

Se disolvió 3.81 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 400 mL de agua deionizada, los cuáles se agitaron hasta completa disolución, se ajusto el pH = 9.0, y se aforo a 500 mL se filtro sobre una membrana de 45 μm y se sonicó.

Tetraborato de sodio decahidratado 40 mM a pH 9 (solución amortiguadora de corrida)

Se disolvió 7.63 g de Tetraborato de Sodio Decahidratado y se aforo a 50 mL.

Clorambucilo 1000 $\mu\text{g/mL}$

Se disolvió 10 mg de clorambucilo y se aforo a 10 mL de metanol.

Complejo de clorambucilo –dimetil – β –ciclodextrina 1000 $\mu\text{g/mL}$

Se disolvió 5 mg del complejo clorambucilo –Dimetil – β –Ciclodextrina y se aforo a 5 mL.

Complejo de clorambucilo –trimetil – β –ciclodextrina 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Se disolvió 5 mg del complejo clorambucilo –trimetil – β –ciclodextrina y se aforo a 5 mL con la solución amortiguadora de corrida.

Complejo de clorambucilo –hidroxipropil – β –ciclodextrina 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Se disolvió 5 mg del complejo clorambucilo –hidroxipropil – β –ciclodextrina y se aforo a 5 mL.

Complejo de clorambucilo –dimetil – β –ciclodextrina 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Sé disolvió 10 mg de clorambucilo –dimetil – β –ciclodextrina y se aforo con solución amortiguadora de boratos (20 mM y pH 9) a 10 mL.

Complejo de clorambucilo –hidroxipropil – β –ciclodextrina 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Sé disolvió 10 mg del complejo de clorambucilo –hidroxipropil – β –ciclodextrina y se aforo con buffer de boratos (20 mM y pH 9) a 10mL.

Dimetil – β –ciclodextrina 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Se disolvió 100 mg de dimetil – β –ciclodextrina y se aforo a 25 mL.

Trimetil – β –ciclodextrina 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Se disolvió 100 mg de trimetil – β –ciclodextrina y se aforo a 25 mL.

Hidroxipropil – β –ciclodextrina 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Se disolvió 100 mg de hidroxipropil – β –ciclodextrina y se aforo a 25 mL.

7 CURVAS DE CALIBRACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE CICLODEXTRINAS CON CLORAMBUCILO

Condiciones de trabajo

Solución amortiguadora de Tetraborato de sodio decahidratado a una concentración de 20mM y pH 9.2.

Voltaje: 20 kV.

Inyección por el método hidrodinámico.

Pretratamiento del Equipo de Electroforesis Capilar

El equipo de electroforesis capilar es utilizado después de 10 min. de haber sido encendido para permitir la calibración del equipo.

Lavados con: metanol, ácido clorhídrico al 0.1N, hidróxido de sodio al 0.1N, y agua deionizada.

Acondicionamiento: Con la solución amortiguadora de corrida.

COMPLEJO CLORAMBUCILO – DIMETIL – β – CICLODEXTRINA (CHL –DM – β – CD)

El complejo fue obtenido en el laboratorio de Química Medicinal. UNAM FES-Cuautitlán en un trabajo previo.²⁷

1. Se prepararon 5 mL de una solución del complejo de clorambucilo –dimetil – β – ciclodextrina a una concentración de 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$

De la solución anterior se realizó el siguiente sistema de diluciones.

Diluciones	1	2	3	4	5	6	7	8
Complejo CHL-DM - β -CD (μ L)	25	50	100	200	300	400	500	1000
Aforo con agua (mL)	5	5	5	5	5	5	5	5

*La preparación de cada dilución se llevó a cabo en el momento en el cual se realizó la medición del complejo en el equipo con la intención de no generar error sistemático.

2. Se colocó en un vial de plástico 400 μ L de la dilución y 20 μ L de metanol con su tapón respectivo y se midió en el equipo de electroforesis capilar cada una de las diluciones por triplicado.
3. Se registrarán los tiempos de migración del metanol y del clorambucilo y de este último su área.

COMPLEJOS CLORAMBUCILO – 2 –HIDROXIPROPIL – β – CICLODEXTRINA (CHL – 2 –HP – β –CD) Y CLORAMBUCILO – TRIMETIL– β – CICLODEXTRINA (CHL –TM – β –CD)

Para los complejos clorambucilo – 2 –hidroxipropil – β –ciclodextrina y clorambucilo – trimetil – β –ciclodextrina el procedimiento fue el mismo que el utilizado para el complejo clorambucilo –dimetil – β –ciclodextrina, una variación con el complejo clorambucilo – 2 – trimetil – β –ciclodextrina fue que se disolvió en la solución buffer de boratos por su baja solubilidad en agua.

8 ESTUDIO DE LA MOVILIDAD DE LOS COMPLEJOS

COMPLEJO CLORAMBUCILO –DIMETIL- β –CICLODEXTRINA (CHL –DM – β –CD)

1. Se prepararon 10 mL de una solución de dimetil β –ciclodextrina (DM β –CD) a una concentración de 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ disolviéndolo en la solución amortiguadora de trabajo.
2. Se realizaron las siguientes tres diluciones:

SISTEMAS	1	2	3
DM β –CD (μL)	1000	2000	3000
Buffer (mL)	5	5	5

*La preparación de cada dilución se llevó a cabo en el momento en el cual se realizó la medición del complejo en el equipo con la intención de no generar error por posibles descomposiciones.

3. Los viales de vidrio se llenaron con la dilución respectiva como electrolito soporte.
4. Para la muestra se midieron 400 μL de la dilución de 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ del complejo clorambucilo –dimetil β –ciclodextrina con 20 μL de metanol en un vial de plástico.
5. Enseguida se midió en el equipo de Electroforesis Capilar, cada una de las diluciones por triplicado.
6. Se llevaron a cabo los pasos anteriores para las muestras de 300 y 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del complejo de clorambucilo –dimetil β –ciclodextrina.
7. Se tabularon los datos generados y se obtuvo la desviación estándar, coeficiente de variación y movilidad efectiva.

COMPLEJO CLORAMBUCILO –HIDROXIPROPI L – β –CICLODEXTRINA (CHL – 2 –HP – β –CD)

Para estudiar este complejo, se realizó el mismo procedimiento que para el complejo clorambucilo –dimetil β –ciclodextrina.

9 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN.

DIMETIL β -CICLODEXTRINA (DM β -CD)

1. Se prepararon 25 mL de una solución de dimetil β -ciclodextrina a una concentración de 4000 μg / mL.
2. Se prepararon 25 mL de una solución amortiguadora de boratos a una concentración de 40 mM y pH 9.
3. Se prepararon 10 mL de una solución de clorambucilo a una concentración de 1200 μg / mL.
4. Se prepararon 5 mL de una dilución de clorambucilo a una concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de la solución anterior.
5. Se preparó un sistema de diluciones con dimetil β -ciclodextrina como electrolito de trabajo.

SISTEMA	1	2	3	4	5	6
Buffer(mL)	5	5	5	5	5	5
Solución de DM β -CD (mL)	5	2.5	1.25	0.75	0.25	0.125
Agua deionizada (mL)	10	10	10	10	10	10

*La preparación de cada dilución se llevó a cabo en el momento en el cual se realizó la medición del complejo en el equipo con la intención de no generar error sistemático.

-
-
6. Los viales de vidrio se llenaron con la dilución respectiva como electrolito soporte y para la muestra se midieron 400 μL de la dilución de 40 $\mu\text{g/mL}$ de clorambucilo con 20 μL de metanol en un vial de plástico.
 7. Enseguida se midió en el equipo de electroforesis capilar, cada una de las diluciones tres veces.
 8. Se trabajaron los datos generados.

***2 – HIDROXIPROPIL – β –CICLODEXTRINA (2 –HP – β –CD)
Y TRIMETIL– β –CICLODEXTRINA (TM – β –CD)***

El procedimiento empleado para el 2 –hidroxipropil – β –ciclodextrina y el trimetil – β –ciclodextrina fue el mismo que se utilizó para el dimetil – β –ciclodextrina.

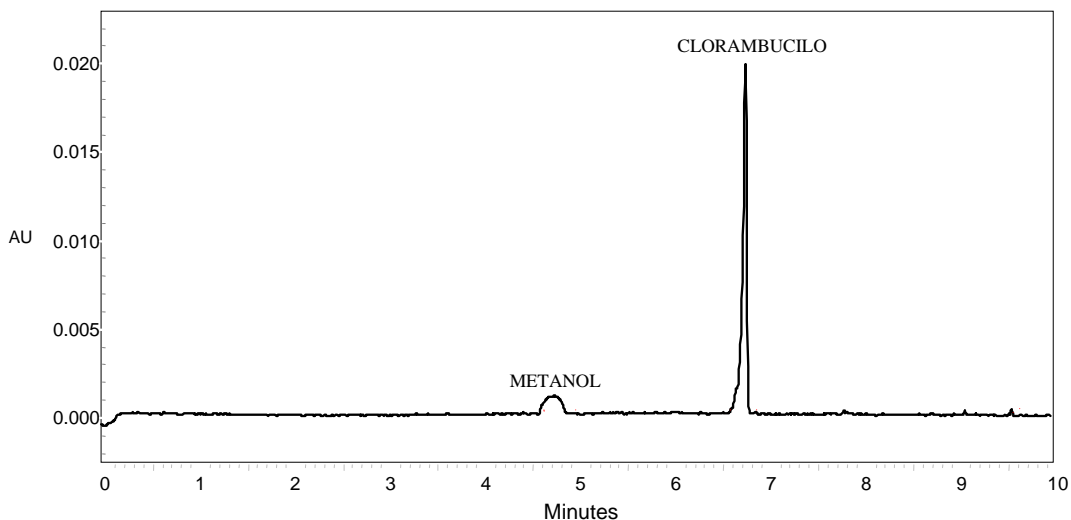
10 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CURVAS DE CALIBRACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE β - CICLODEXTRINAS CON CLORAMBUCILO.

CURVA DE CALIBRACIÓN DEL CLORAMBUCILO (CHL)

Para llevar a cabo la determinación de los complejos de inclusión, es importante conocer el comportamiento del fármaco a estudiar, el cuál fue el clorambucilo. Para conocer dicho comportamiento se realizó una curva de calibración con la ayuda del equipo de electroforesis capilar, donde se obtuvieron electroferogramas los cuáles permitieron conocer el tiempo de migración del clorambucilo así como su comportamiento bajo las condiciones de trabajo.

A continuación se muestra el electroferograma del clorambucilo.

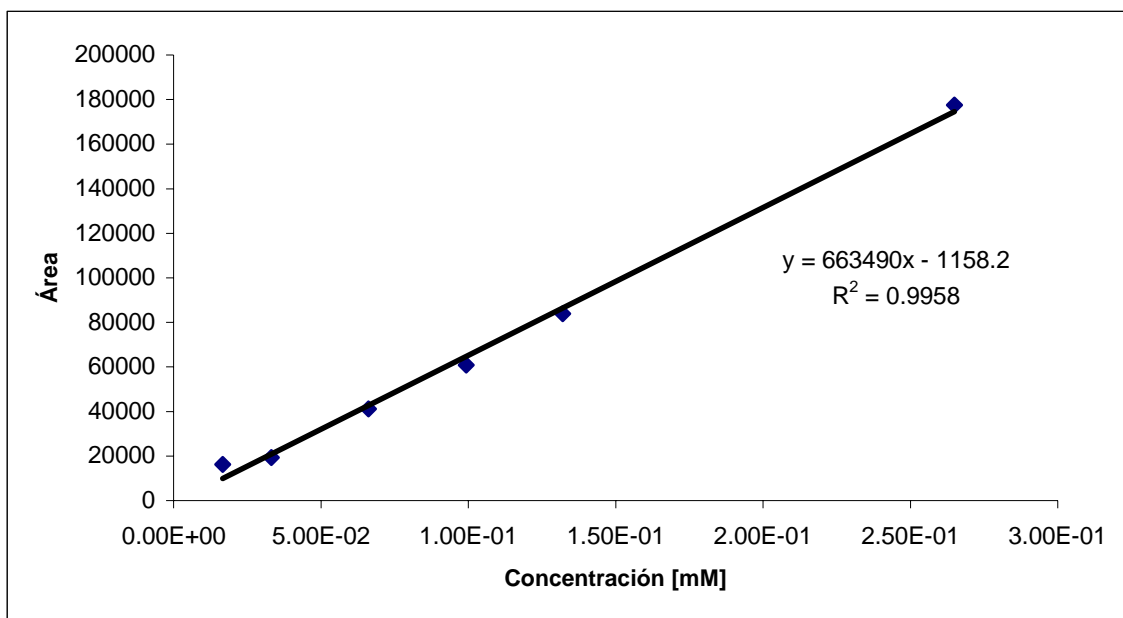


Electroferograma 1. Clorambucilo a una concentración de 6.61×10^{-5} M. Se utilizó un capilar de sílice fundida con una longitud efectiva de 50 cm. y un diámetro interno de 75 μm . La inyección fue hidrodinámica, un voltaje de 20 mV, se midió a una longitud de onda de 260 nm.

Se puede observar el flujo electroosmótico marcado por el metanol y enseguida el pico que corresponde al clorambucilo.

Para el estudio del fármaco se manejaron 6 concentraciones de 5 a 80 $\mu\text{g/mL}$. Debido a que el complejo tiene una alta concentración de activo, 5 $\mu\text{g/mL}$ son suficientes para el inicio de su cuantificación. Para decidir la concentración más elevada, se considero la solubilidad del clorambucilo ya que este es insoluble en agua, por lo que la solución del clorambucilo se realizó con metanol, sin embargo, al realizar las diluciones estas se aforaron con agua para evitar posibles interferencias en la medición ya que el rango de metanol que se utiliza es de 0 - 30%, si excede su concentración provoca la caída de la corriente y por lo tanto a partir de una concentración superior a 80 $\mu\text{g/mL}$ se obtiene una solución turbio lo cuál impediría una apropiada lectura del fármaco.

Una vez establecidas las 6 concentraciones se realizaron las mediciones en el equipo de electroforesis capilar y se obtuvieron los tiempos de migración y áreas y con esto, se calcularon las movilidades y se obtuvo la curva de calibración de clorambucilo la cuál se muestra en la gráfica 2.



Gráfica 2. Curva de calibración del clorambucilo

El Límite de detección de este fármaco es de 1.98×10^{-5} M (6.03 $\mu\text{g/mL}$) y el límite de cuantificación es de 3.3×10^{-5} M (10.06 $\mu\text{g/mL}$), y su rango de estudio es $1.66 \times 10^{-5} - 2.65 \times 10^{-4}$ M

Como se muestra en la grafica 2 el clorambucilo presenta un coeficiente de determinación de 0.9958, esto indica que la relación lineal que se realizó es correcta, debido a que los resultados de área obtenidos son proporcionales a las concentraciones de clorambucilo dentro del intervalo ya determinado. Entonces, si se conoce el valor de una de las variables (concentración o área) se podrá predecir con exactitud el valor que tendrá la otra variable.

En la tabla 1 se presentan los resultados del análisis estadístico en los cuales se demuestra la precisión de los resultados obtenidos.

A continuación se muestran el cálculo de la movilidad efectiva del clorambucilo.

$$\mu_{eff} = \frac{LxI}{V} x \frac{1}{t_{CHL}} - \frac{1}{tm}$$

μ_{eff} = movilidad efectiva (cm² / V min.)

L = longitud total del capilar (cm.)

I = longitud efectiva del capilar (cm.)

V = voltaje (V)

t_{CHL} = tiempo de migración del clorambucilo (min.)

tm = tiempo de migración del marcador (min.)

$$\mu_{eff} = \frac{60x50}{20000} x \frac{1}{7.067} - \frac{1}{4.917} = -0.00928099$$

Tabla 1. Movilidad efectiva del clorambucilo Libre

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Movilidad efectiva ($\text{cm}^2 / \text{V min.}$)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
10	-0.00940561	0.00011439	1.21614258
20	-0.00947342	0.000089075	0.94026218
30	-0.00922472	0.00012231	1.32587121
40	-0.00935378	0.00013386	1.43111783
60	-0.00957688	0.00013093	1.36710954
80	-0.00941665	0.00015493	1.64525019

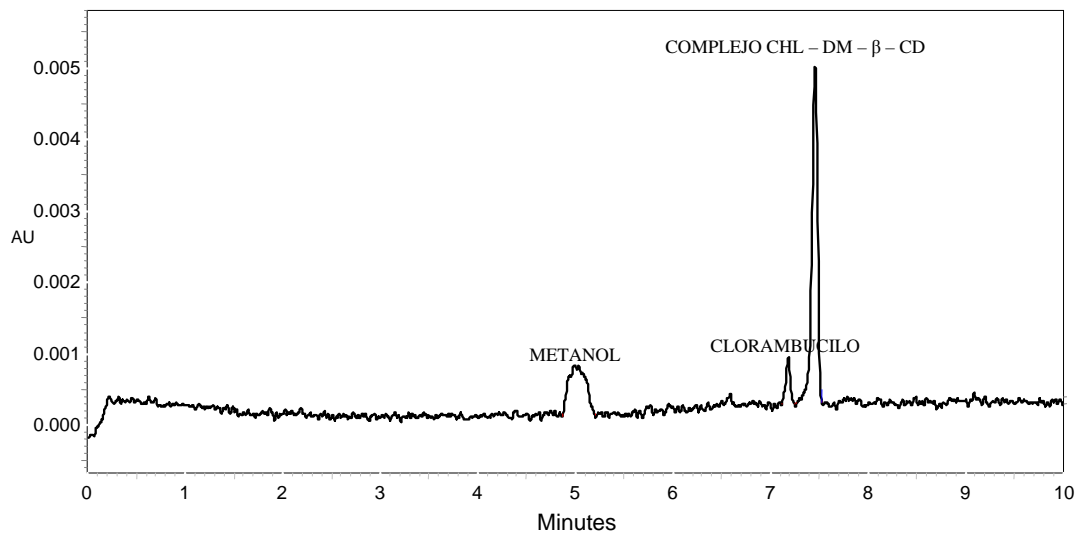
De acuerdo a la tabla 1 se observan las movilidades de las diversas concentraciones y son prácticamente constantes, con un 95% de confiabilidad de acuerdo al análisis de varianza (anexo 1) por lo tanto se demuestra que no hay un cambio en la velocidad del fármaco aun cuando se varíen las concentraciones y por lo tanto el flujo electroosmótico se mantiene prácticamente invariable lo cual fue ideal para el análisis realizado.

Con los datos de desviación estándar y coeficiente de variación se comprueba la confiabilidad del método empleado, porque la tendencia de alejarse los valores puntuales del promedio en una distribución es mínima, por otra parte el coeficiente de variación es menor al 2% el cuál es el rango máximo para aceptar tales valores como correctos.²⁹

Una vez realizado el estudio al fármaco se siguió con cada uno de los complejos clorambucilo –dimetil – β –ciclodextrina (CHL –DM – β –CD), clorambucilo –trimetil– β –ciclodextrina (CHL –TM – β –CD) y clorambucilo – 2 –hidroxipropil – β –ciclodextrina (CHL – 2 –HP – β –CD)

COMPLEJO DE CLORAMBUCILO-DIMETIL- β -CICLODEXTRINA (CHL -DM - β -CD)

El primero en analizar fue el complejo CHL -DM - β -CD, y los resultados del análisis se muestran en el electroferograma 2.



Electroferograma 2. Complejo de CHL -DM - β -CD. Las condiciones experimentales son iguales al electroferograma 1, excepto la concentración la cual es de $1.23E^{-04}$ M.

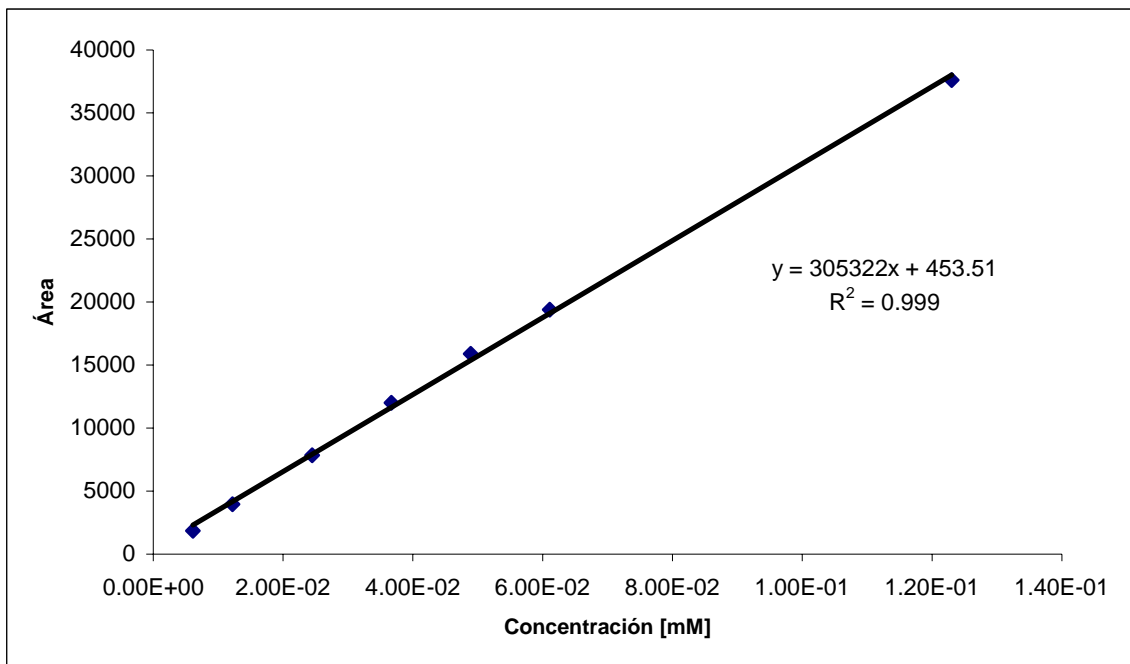
Como se observa en el electroferograma el flujo electroosmótico que tiene un tiempo de migración de 4.9 min. y esta marcado por el metanol y enseguida se observa el pico del complejo CHL -DM - β -CD, con un tiempo de migración de 7.3 min.

Las concentraciones empleadas fueron de 5 – 200 $\mu\text{g/mL}$, cada punto fue medido por triplicado.

El límite de detección para este complejo fue de 13.46 $\mu\text{g/mL}$ indicándonos de esta manera que los rangos de concentración deben estar por encima de 10 $\mu\text{g/mL}$, se comprobó experimentalmente en el pico de concentración 10 $\mu\text{g/mL}$, porque fue muy pequeño y no se observó un pico definido, es así, que para el complejo clorambucilo – dimetil - β -ciclodextrina a partir de 20 $\mu\text{g/mL}$ se observó un buen pico, Por otra parte el límite de cuantificación fue de 22.44 $\mu\text{g/mL}$, por medio de este valor sabemos la concentración precisa para determinar correctamente este complejo y

experimentalmente a concentraciones más elevadas que esta, los picos tuvieron una alta resolución, con esto se corrobora la certeza del método.

Los datos que se observaron en cada uno de los electroferogramas permitieron de acuerdo a las concentraciones anteriores llevar a cabo una curva de calibración la cuál se muestra en la gráfica 3.



Gráfica 3. Curva de calibración del complejo de CHL-DM-β-CD

En esta gráfica se puede observar que el coeficiente de determinación tiene un valor de 0.999, esto indica que la relación lineal es suficiente para determinar la proporción de variabilidad total de la variable dependiente respecto a su variable independiente y es explicada por el modelo de regresión.

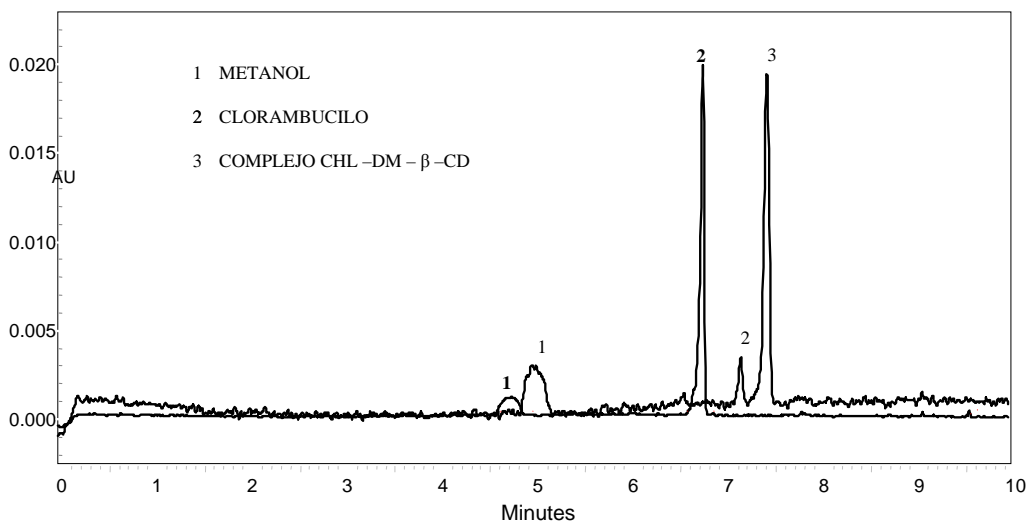
La tabla 2 nos muestra las movilidades, desviación estándar y coeficiente de variación de este complejo permitiendo reconocer que el complejo no mantuvo su movilidad constante a través de capilar con un 95% de confiabilidad de acuerdo al análisis de varianza (anexo 2), factores internos como el lavado del capilar, la viscosidad de la solución amortiguadora fueron posibles causantes de este resultado. Sin embargo al ver los resultados podemos decir que las movilidades no varían aparentemente entre si, y el análisis de varianza a un 90% o menor nos permite aceptar que las movilidades son invariables.

Pero debemos tener en cuenta que el 95% de confiabilidad es un parámetro que se estableció desde el inicio del análisis de resultados.

Tabla 2 Movilidad efectiva del complejo de clorambucilo –dimetil – β –ciclodextrina

Concentración ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Movilidad efectiva ($\text{cm}^2 / \text{V min.}$)	Desviación estándar	Coficiente de variación
10	-0.01	0.000282902	-2.81868115
20	-0.00970	0.0000251711	-0.25944843
40	-0.00967	0.000110883	-1.14682104
60	-0.00969	0.0000545035	-0.56223939
80	-0.00970	0.000146061	-1.50578895
100	-0.0101	0.000109432	-1.08414874
200	-0.00996	0.000143334	-1.43864422

El complejo de CHL –DM – β –CD está formado por una dimetil- β -ciclodextrina en la cuál se introdujo el clorambucilo, se deseaba conocer la estabilidad de este complejo, que tan afín es el fármaco a la β -ciclodextrina. Para ello fue necesario comparar los resultados de dicho complejo con los del fármaco iniciando con una comparación de sus electroferogramas que se muestran el electroferograma 3.



Electroferograma 3. CHL Y CHL –DM – β –CD. Las condiciones experimentales son las mismas que en los electroferogramas 1 y 2.

El flujo electroosmótico constantemente se ve afectado por diferentes variables, lo que provoca diferencias en tiempo de migración y por lo tanto en los analitos; cuando deseamos hacer una comparación de un pico y otro es importante apoyarse del tiempo de migración, sin embargo, es indispensable usar la movilidad efectiva como un parámetro mas certero y con ello verdaderamente ver las posibles diferencias de una señal y otra.

El pico del complejo de inclusión está bien definido respecto al de clorambucilo lo cuál nos indica que el complejo efectivamente está formado y por lo tanto presenta una señal diferente a la del clorambucilo.

Esto se hace evidente al comparar sus movilidades, ya que el CHL presenta menor movilidad que el complejo, es por esta razón que el CHL se detecta después que el complejo. El mismo comportamiento se observo en base a los tiempos de migración, sin embargo como se mencionó anteriormente no es acertado solo basarse en el.

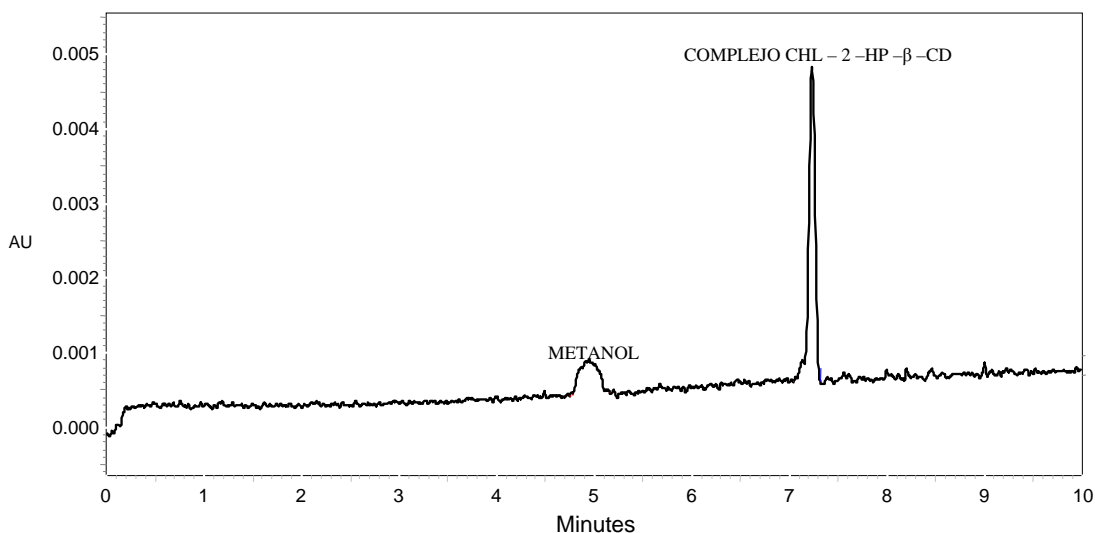
La absorbancia también permite corroborar la formación del complejo, ya que el CHL libre absorbe más que el complejo formado. Por último la forma para determinar rápida y certeramente fue el agregar un exceso de clorambucilo a la muestra de complejo analizado y evidentemente en el electroferograma se ve incrementado el pico de clorambucilo y no de complejo.

COMPLEJO DE CLORAMBUCILO – 2 –HIDROXIPROPIL – β – CICLODEXTRINA (CHL – 2 –HP – β –CD)

El segundo complejo a analizar fue el de CHL – 2 –HP – β –CD este complejo al igual que el anterior se disolvió en agua y se manejaron concentraciones de 5 a 200 $\mu\text{g/mL}$.

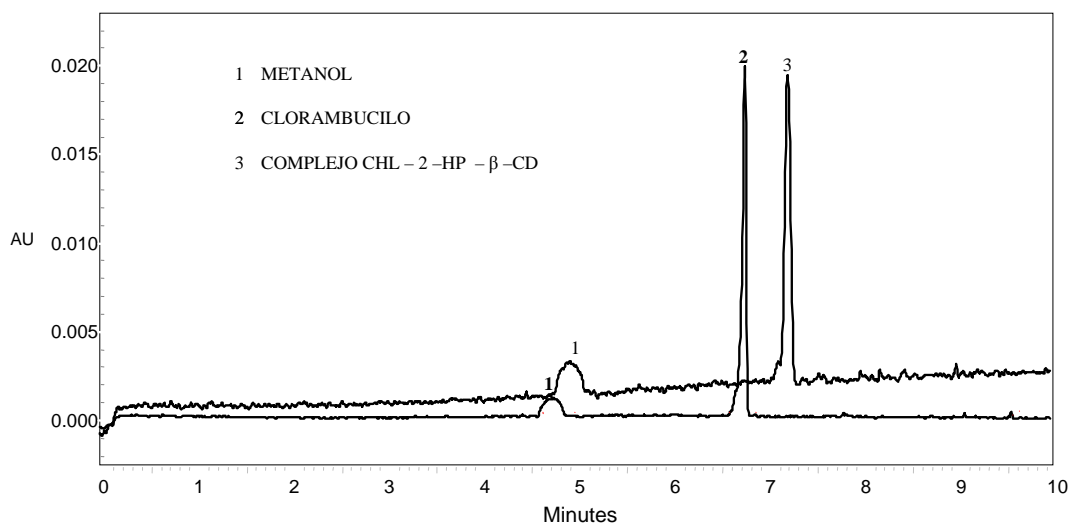
El límite de detección para este complejo fue de 0.7767 $\mu\text{g/mL}$, a partir de este valor se puede observar que el rango de concentraciones que se empleo es adecuado, y se mostró en los electroferogramas, ya que en todos se observó una buena identificación del pico y lo anterior se confirma con el valor de límite de cuantificación, el cuál tuvo un valor de 1.2945 $\mu\text{g/mL}$.

El electroferograma de este complejo se muestra a continuación.



Electroferograma 4. Complejo de CHL-HP- β -CD. Tiene una concentración de 1.18×10^{-05} M. Las condiciones experimentales son las mismas que el electroferograma 1.

Si se compara este electroferograma con el de clorambucilo, se observa una diferencia en el tiempo de migración, al recurrir al análisis de sus movilidades, efectivamente los dos picos que se muestran representan distintos compuestos, y con ello la certeza de la formación del complejo. Observar electroferograma 5



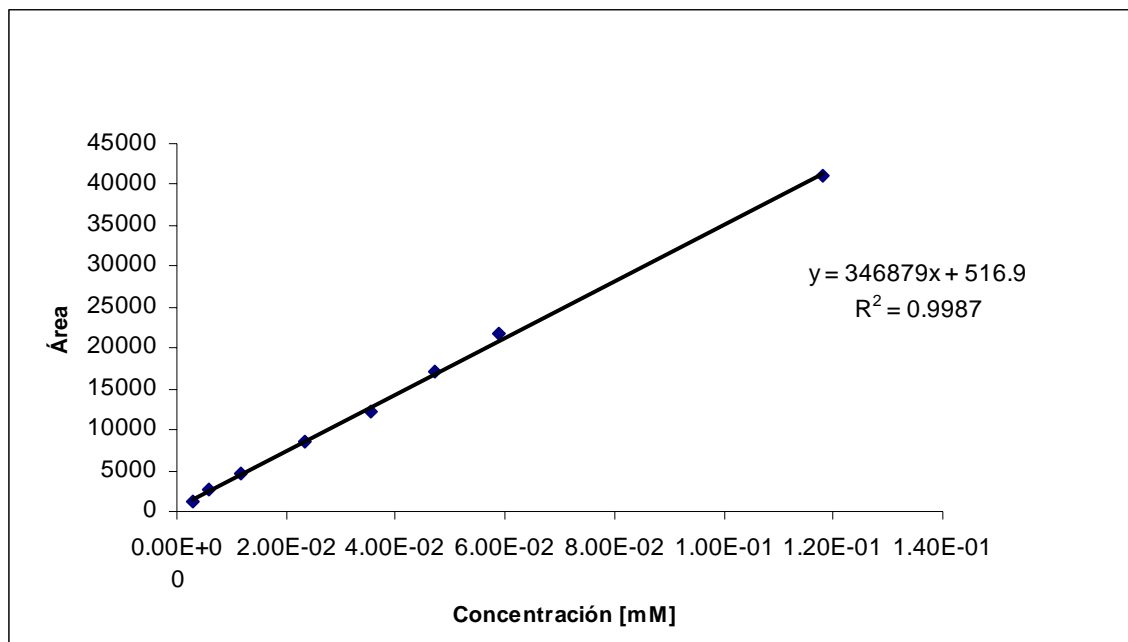
Electroferograma 5. CHL Y CHL - 2 -HP -β -CD. Las condiciones de trabajo son iguales a las de los electroferogramas 1 y 4.

Los resultados estadísticos de movilidades se encuentran en la tabla 3.

Tabla 3. Movilidad efectiva del Complejo clorambucilo – 2–hidroxipropil – β – ciclodextrina

Concentración ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Movilidad efectiva ($\text{cm}^2 / \text{V min.}$)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
5	-0.0097651	0.00034117	3.49373384
10	-0.00958006	0.00051142	5.33837616
20	-0.00978816	0.00029146	2.97768632
40	-0.00931085	0.000093958	1.00912515
60	-0.00977051	0.00030368	3.10811053
80	-0.0098245	0.00040565	4.12892659
100	-0.00992597	0.00018476	1.86139153
200	-0.00974576	0.00010773	1.10541999

Se observa que las movilidades son prácticamente constantes, con un 95% de confiabilidad de acuerdo al análisis de varianza (anexo 3) por lo tanto, se demuestra que no hay un cambio en la velocidad del fármaco aun cuando se varíen las concentraciones y es así que el flujo electroosmótico se mantiene prácticamente invariable, ideal para el análisis realizado y con ello tener la confianza de la precisión de la curva de calibración del complejo CHL – 2 –HP – β –CD gráfica 4.



Gráfica 4. Curva de calibración de CHL - 2 -HP -β -CD

En la gráfica 4 se observa un coeficiente de determinación de 0.9988 con la que se comprueba la relación lineal de la curva, lo cuál nos permitirá utilizarla para posteriores estudios.

COMPLEJO DE CLORAMBUCILO –TRIMETIL – β – CICLODEXTRINA (CHL –TM – β –CD)

El tercer complejo de inclusión fue CHL –TM – β –CD, la solución se preparó en solución buffer de Boratos pH 9, 20 mM, ya que no es soluble en agua, en cambio en buffer si. Una vez preparada la solución del complejo se realizaron las soluciones respectivas de 5 a 200 $\mu\text{g/mL}$, las cuales fueron analizadas por electroforesis capilar obteniendo los electroferogramas correspondientes y con ellos los tiempos de migración y áreas, los cuales permitieron realizar el análisis estadístico de dicho complejo de inclusión.

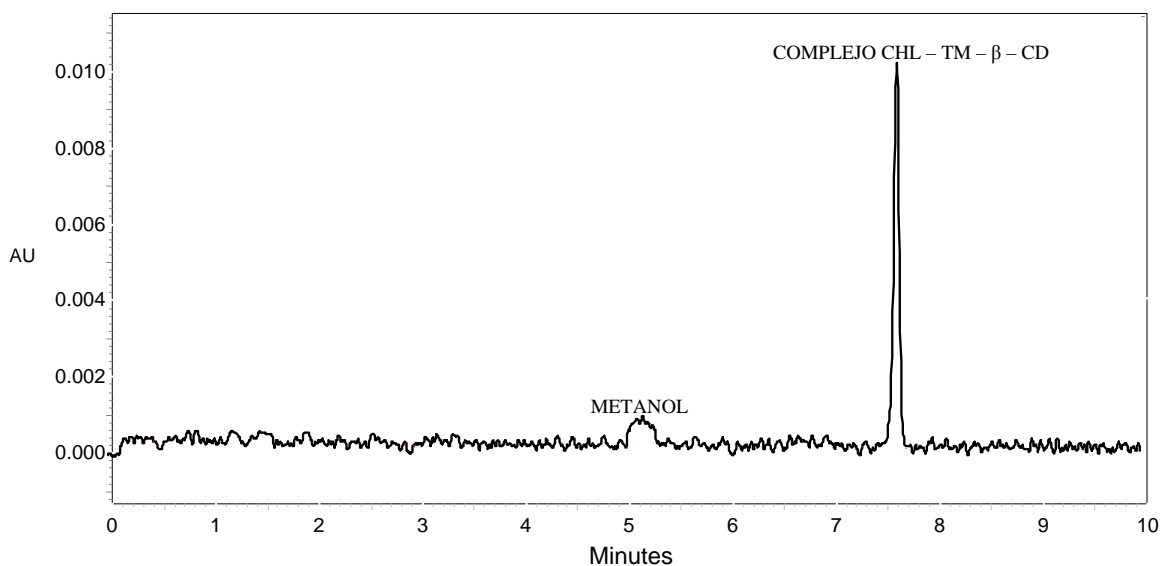
Nuevamente se hace referencia al límite detección, para el complejo CHL –TM – β –CD el valor es de 5.2458 $\mu\text{g/mL}$ y su límite de cuantificación es de 8.7430 $\mu\text{g/mL}$. Al haber obtenido estos datos solo complementan los resultados que se mostraron en cada uno de los electroferogramas a diversas concentraciones, los cuáles son picos definidos y claramente cuantificables.

En la tabla 4 se muestran los resultados estadísticos necesarios para evaluar la precisión de las mediciones.

Tabla 4 Movilidades efectivas del complejo de clorambucilo –trimetil – β –ciclodextrina

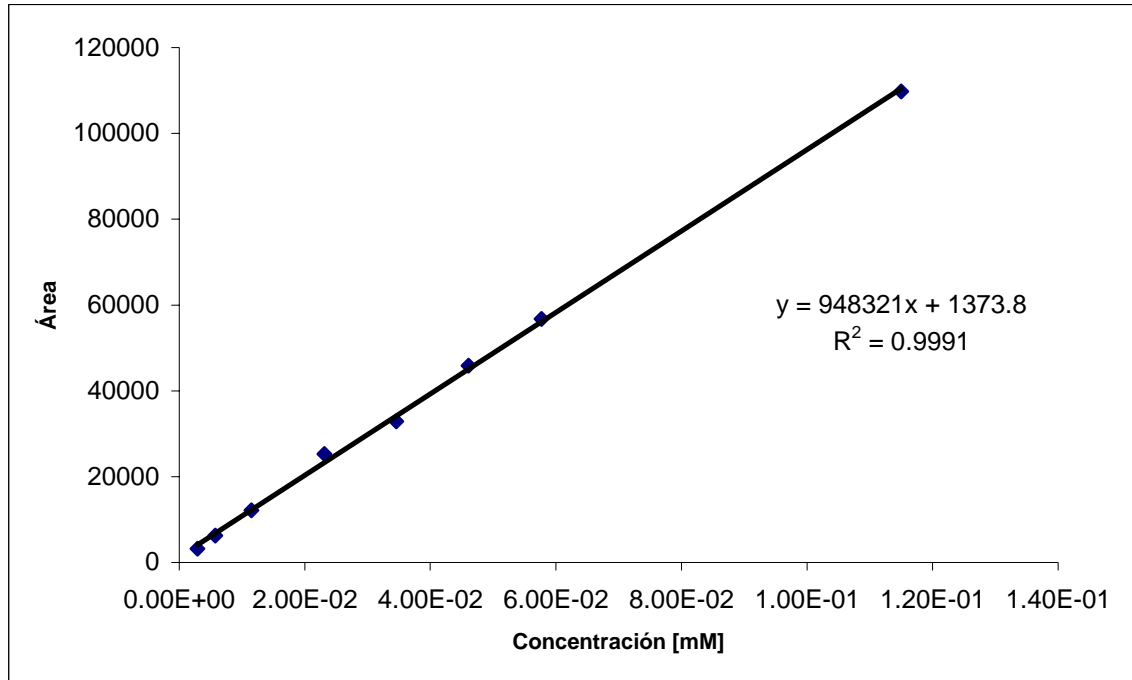
Concentración ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Movilidad efectiva ($\text{cm}^2 / \text{V min.}$)	Desviación estándar	Coefficiente de variación
5	-0.00924	-1.96166795	-1.96166795
10	-0.00929	-1.28336756	-1.28336756
20	-0.00944	-1.48763419	-1.48763419
40	-0.00953	-1.79102233	-1.79102233
60	-0.00952	-0.94694614	-0.94694614
80	-0.00951	-1.65844383	-1.65844383
100	-0.00964	-1.3300628	-1.3300628
200	-0.00962	-0.367515	-0.367515

A continuación se muestra en la figura 6 el electroferograma del complejo CHL –TM – β –CD.



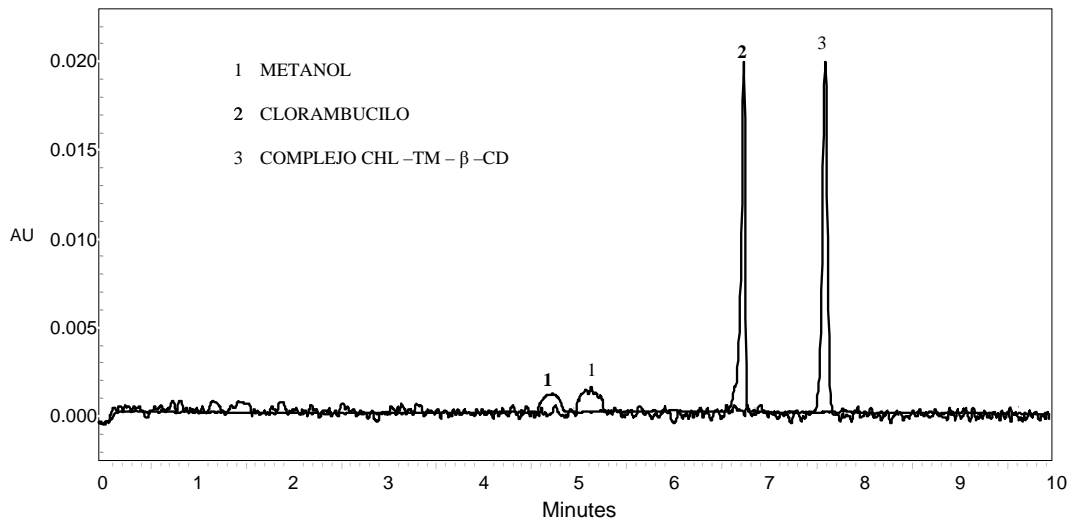
Electroferograma 6. Complejo de CHL –TM – β –CD. Las condiciones de trabajo son las indicadas en el electroferograma 1, excepto la concentración, es de $2.31 \times 10^{-05} \text{M}$.

La curva de calibración que se obtuvo a partir de los datos anteriores en la gráfica 5 por medio de la cuál se muestra que su coeficiente de determinación es de 0.9991 y con ello se tiene la certeza de que los datos tienen una relación lineal alta y por lo tanto es confiable utilizar dicha curva en estudios posteriores, porque la variabilidad de la concentración del complejo CHL –TM – β –CD es muy precisa respecto a la de el área.



Gráfica 5. Curva de calibración del complejo de CHL-TM-β-CD

Ahora se compara el electroferograma 7 de este complejo con el del clorambucilo.



Electroferograma 7. CHL Y CHL-TM-β-CD. Las condiciones de trabajo fueron las que se indican en el electroferograma 1 y 6.

Nuevamente se puede observar claramente que el complejo muestra una señal diferente a la del clorambucilo, así como en la movilidad efectiva, y por lo tanto, se

corroborar la formación de dicho complejo con un 95% de confiabilidad de acuerdo al análisis de varianza (anexo 4)

En la tabla 5 se muestran los resultados de las curvas de calibración de los tres complejos, demostrando de esta manera que tienen una alta relación lineal de acuerdo al método y las condiciones establecidas, por ello determinamos que con base a los rangos de concentración empleados, se puede determinar la concentración correctamente de los complejos CHL – DM – β – CD, CHL – 2 – HP – β – CD y CHL – TM – β – CD.

Tabla 5. Valores de las regresiones lineales de los tres complejos

COMPLEJOS	CONC ($\mu\text{g/mL}$)	m	b	r^2	r
DM β CD	5 - 200	87.8	401.84	0.9992	0.9995
TM β CD	5 - 200	346.52	436.21	0.9914	0.9956
HP β CD	5 - 200	204.6	493.32	0.9988	0.9993

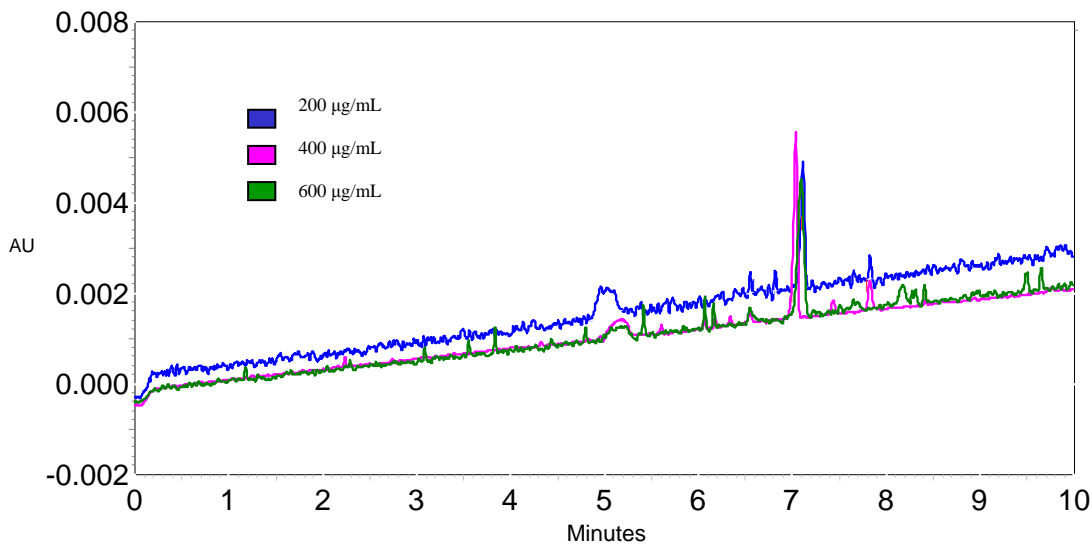
ESTUDIO DE LA MOVILIDAD DE LOS COMPLEJOS

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE LA DIMETIL- β -CICLODEXTRINA (DM - β -CD) EN LA MOVILIDAD DE SU COMPLEJO.

Se llevó a cabo este estudio para conocer el comportamiento del complejo agregando un exceso de dimetil - β -ciclodextrina en el buffer de trabajo. Obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 6. Movilidad efectiva del complejo clorambucilo -dimetil - β -ciclodextrina.

[DM - β -CD] $\mu\text{g} / \text{mL}$	MOVILIDAD $\text{cm.}^2 / \text{V min.}$	Desviación estándar	Coficiente de variación
200	-0.00864982	0.00010916	-1.26194701
400	-0.00770009	5.3364E-05	-0.69303207
600	-0.00801262	3.1419E-05	-0.39212002



Electroferogramas 8. Complejo CHL –DM – β –CD. Las condiciones de trabajo son las mismas que presenta el electroferograma 1.

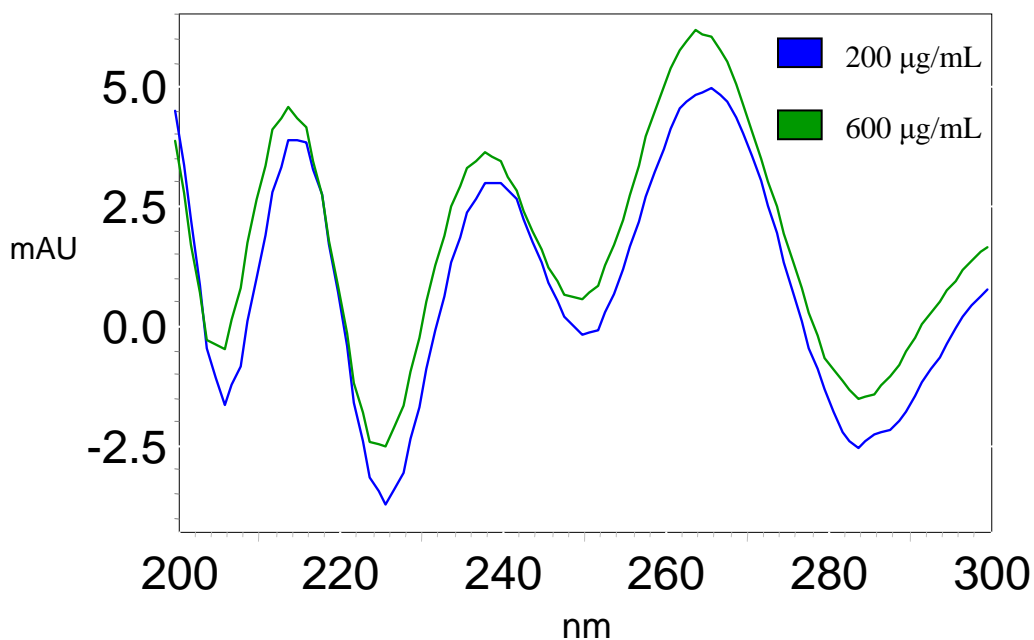


Figura 9. Diagrama de Absorbancia del complejo de CHL –DM – β –CD

De acuerdo a los datos de la tabla 6 se observa que la movilidad no se ve afectada por un exceso de DM – β –CD. Es importante mencionar que se manejaron las movilidades efectivas y no tiempos de migración debido a que la movilidad efectiva es un valor corregido respecto al flujo electroosmótico (FEO), por lo tanto es independiente de este,

en cambio el tiempo de migración es un valor que se ve afectado directamente por el FEO, por lo tanto aun cuando el FEO se mantenga lo más constante posible, siempre existirán pequeñas condiciones que así no lo permitan, y con ello los tiempos de migración ya no son un parámetro confiables para el estudio. En la figura 8 se muestra gráficamente el comportamiento del complejo a las tres concentraciones y se observa que efectivamente la movilidad no se ve afectada considerablemente.

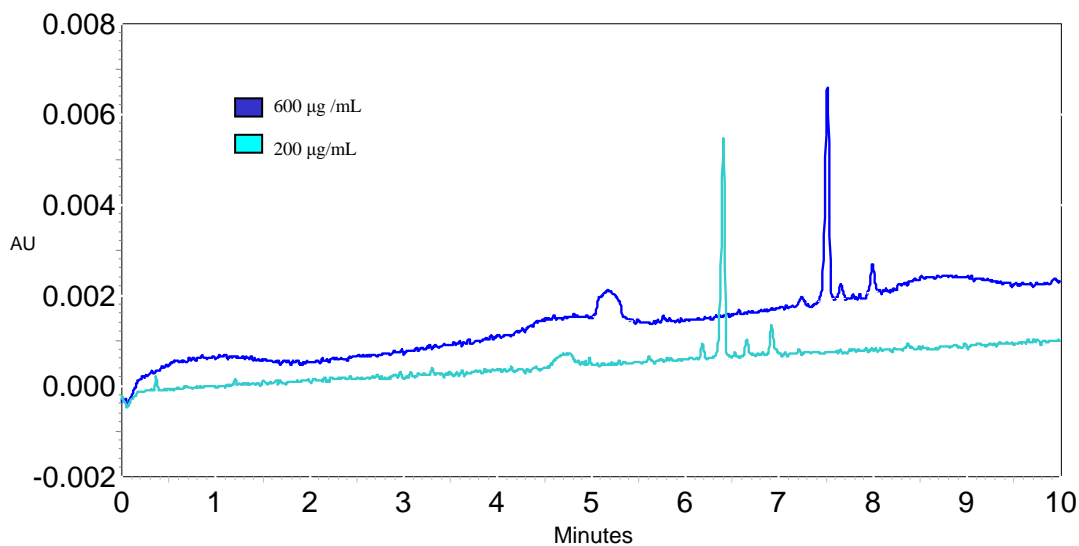
El signo negativo en las movilidades es porque la carga neta del complejo es negativa. En la figura 9 se observan los diagramas de absorbancia del complejo de CHL –DM – β –CD a dos concentraciones diferentes y de acuerdo a estos resultados a mayor concentración la absorbancia aumenta, sin embargo el incremento no es muy grande; por lo tanto podemos decir que la absorbancia del complejo CHL –DM – β –CD se ve poco afectada por un exceso de dimetil – β –ciclodextrina, presentándose así un comportamiento de hipercromia.

**INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE LA 2 -HIDROXIPROPIL - β -
CICLODEXTRINA (2 -HP - β -CD) EN LA MOVILIDAD DE SU COMPLEJO.**

En el caso de este complejo clorambucilo -hidroxipropil - β -ciclodextrina, las movilidades si presentan una diferencia aparente entre si, como se puede ver en la tabla 7, y se presenta el mismo fenómeno en el electroferograma 9; por lo tanto de acuerdo a estos datos la movilidad del complejo CHL - 2 -HP - β -CD si se ve afectado por las concentraciones de la 2 -hidroxipropil - β -ciclodextrina.

Tabla 7 Movilidad efectiva del complejo de inclusión para el Complejo 2-Hidroxipropil- β -Ciclodextrina

[HP β CD] $\mu\text{g} / \text{mL}$	Movilidad $\text{cm}^2 / \text{V min.}$	Desviación estándar	Coficiente de variación
200	-0.00902517	0.000090048	-0.99774397
400	-0.00837074	0.000096429	-1.1519801



Electroferograma 9. Electroferogramas de 2 -HP - β -CD. Las condiciones de trabajo son las indicadas en el Electroferograma 1.

En este complejo, respecto a la absorbancia, nuevamente se observa un cambio debido a un incremento de 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina en el complejo, este comportamiento se presenta en el figura 10.

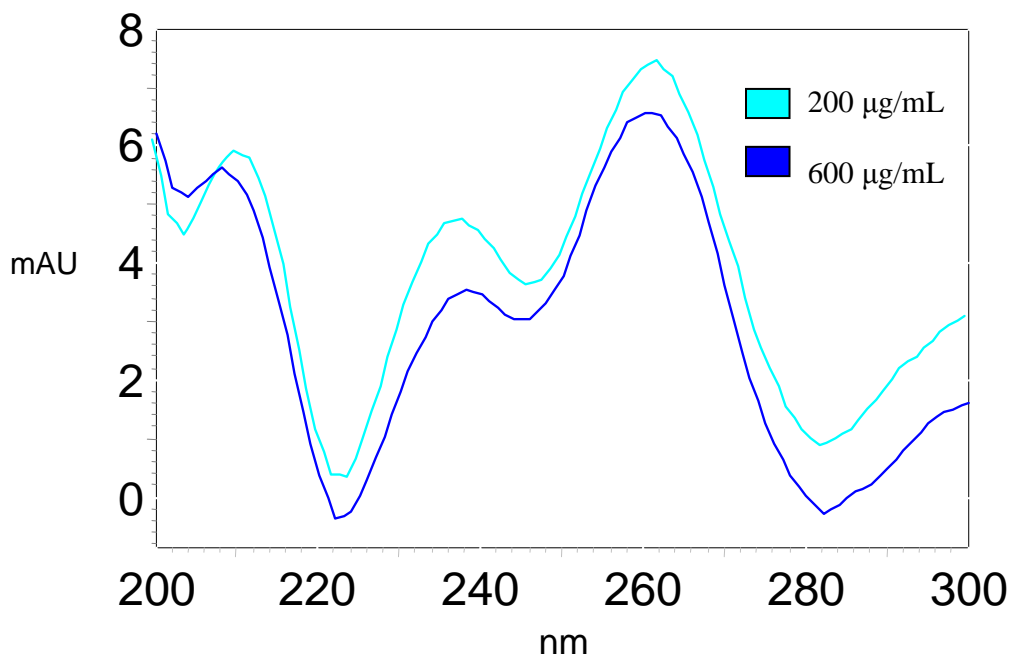


Figura 10. Diagrama de absorbancia del complejo de CHL-2-HP- β -CD

Se observa claramente que se presenta un comportamiento de hipocromía, ya que la absorbancia disminuye al aumentar la concentración de su β -ciclodextrina respectiva sin que cambie la longitud de onda máxima.

Para el complejo de clorambucilo-trimetil- β -ciclodextrina, no fue posible llevar a cabo el estudio de movilidad respecto a un exceso de trimetil- β -ciclodextrina debido a que no se contó en su momento con el relativo necesario.

Podemos decir que de acuerdo a la relación de similitud que existe entre el complejo clorambucilo-dimetil- β -ciclodextrina y el complejo clorambucilo-trimetil- β -ciclodextrina, este último también tiende a tener un comportamiento de hipercromía y por lo tanto sus movilidades podrían no ser afectadas.

Es claro que para decir que lo anterior es verídico, se debe realizar el estudio correspondiente, el cuál podría realizarse posteriormente más afondo y con objetivos diferentes para los tres complejos.

DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN.

DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO CLORAMBUCILO –DIMETIL – β –CICLODEXTRINA (CHL –DM – β –CD)

Para llevar acabo la determinación de esta constante se empleo la siguiente ecuación. ¹

$$\frac{\Delta\mu_{CHL-CD}}{[\beta-CD]} = [K_{obs}\Delta\mu_{max}^{CHL-CD}] - [K_{obs}\Delta\mu_{CHL-CD}] \quad \text{Ec. 1}$$

$\Delta\mu_{CHL-CD}$ = Diferencia de la movilidad efectiva del Complejo

$[\beta-CD]$ = Concentración de la β -ciclodextrina

K_{obs} = Constante de formación

$\Delta\mu_{CHL-CD}^{max}$ = Diferencia máxima de la movilidad del complejo

$$\Delta\mu_{CHL-CD} = \mu_{DMCD} - \mu_{CHL} \quad \text{Ec. 2}$$

μ_{DMCD} = Movilidad efectiva del complejo

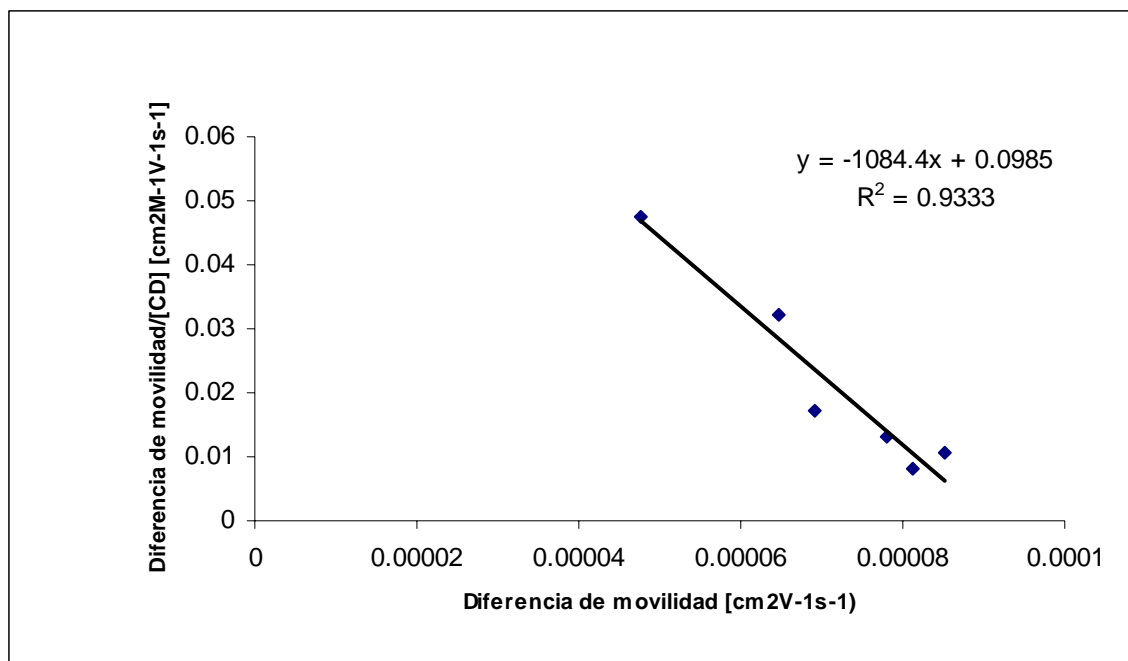
μ_{CHL} = Movilidad efectiva del Clorambucilo

El cálculo de la movilidad se muestra en la parte de la curva de calibración del Clorambucilo.

Una vez obtenida la movilidad se realiza el cálculo para tener la diferencia de movilidades de acuerdo a la ecuación 2.

Posteriormente se utilizó la ecuación 1 para graficar los datos y obtener el valor de la constante.

A continuación se muestra en la gráfica 6 la ecuación que corresponde al complejo CHL-DM- β -CD.



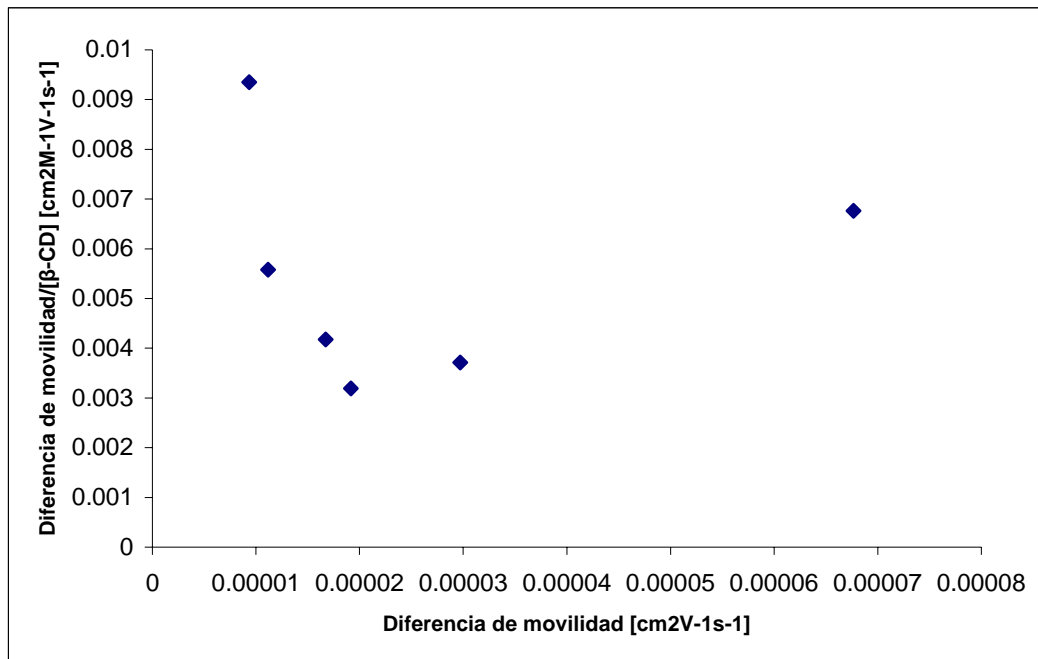
Gráfica 6. Curva del complejo clorambucilo -dimetil - β -ciclodextrina.

Como se puede ver, el valor de la constante es de 1084M, con un coeficiente de determinación de 0.9333. El cuál nos indica que existe una relación lineal del 93.3% entre la variable dependiente e independiente, por lo tanto la constante que se determino es aceptable de acuerdo a las condiciones del método empleado.

DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO CLORAMBUCILO –TRIMETIL – β –CICLODEXTRINA

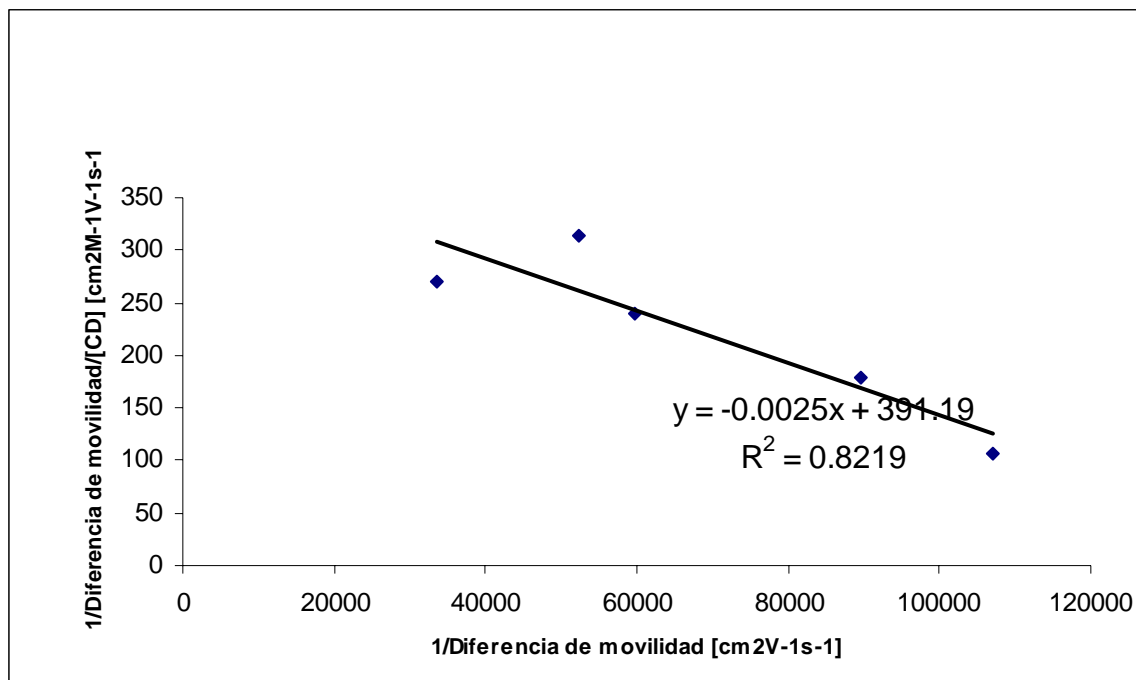
Para obtener la constante de este complejo, se utilizó la ecuación 1 mencionada en la determinación de la constante de formación del CHL –DM – β –CD.

A continuación se muestra la gráfica 7.



Gráfica 7. Curva del complejo de clorambucilo –trimetil – β –ciclodextrina.

Al observar la gráfica no tiene un comportamiento lineal, por lo que se decidió buscar un modelo que ajustara lo mejor posible, sin embargo, se decidió que la opción mas apropiada fuera realizar un truco algebraico para tener una interpretación lineal y con ello obtener una mejor comprensión de la curva.



Gráfica 8. Curva del complejo de trimetil β -ciclodextrina.

En la gráfica 8 se puede ver que ya presenta un modelo lineal, obteniéndose un coeficiente de determinación de 0.8219, lo que indica que existe una relación lineal de 82.19% entre las variables en cuestión. Aun cuando el coeficiente de determinación es bajo, por este método y las condiciones que se tomaron en cuenta, el valor de la constante es correcto.

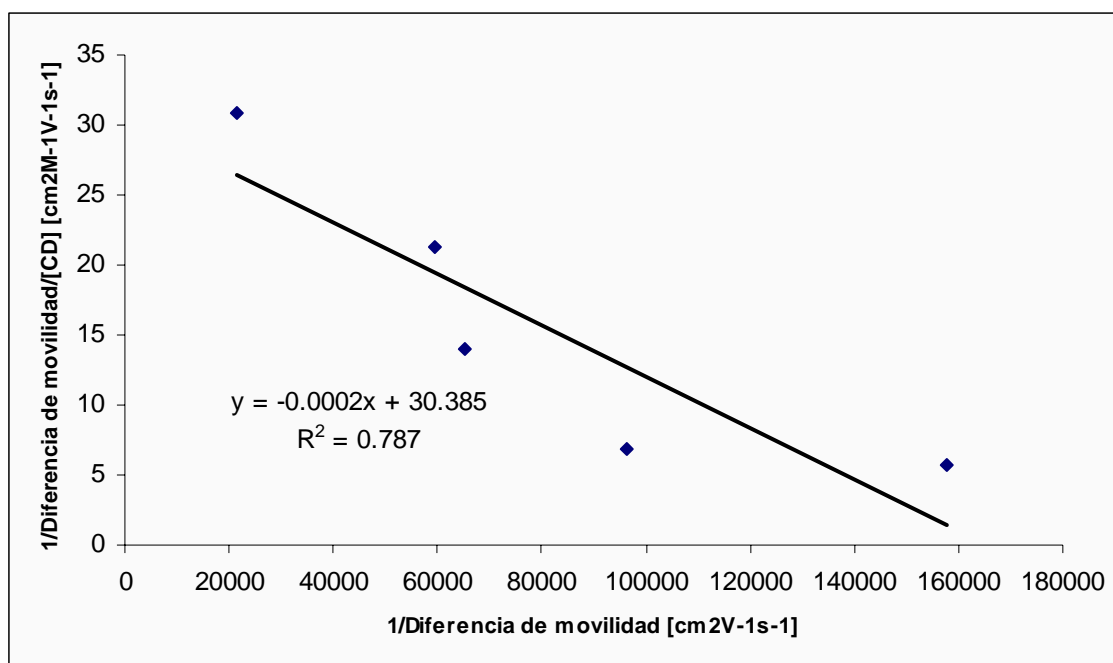
Para obtener el valor de la constante, se realizó un cálculo del inverso a la pendiente, la cuál es la constante, y de esta manera obtener el valor real, el cuál es de 400M.

DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE FORMACIÓN DEL COMPLEJO CLORAMBUCILO – 2 –HIDROXIPROPIL – β –CICLODEXTRINA

Nuevamente, los cálculos para obtener los datos necesarios para realizar la curva se presentan en la parte de curvas de calibración de los complejos y en la determinación de la constante de formación del complejo CHL –DM – β –CD.

Para este complejo su coeficiente de determinación fue de 0.787, el cuál es muy bajo, lo que indica que la relación lineal solo cubre el 78.7%, al aplicar otros modelos algebraicos no se obtuvo un mejor coeficiente de determinación, por lo tanto a las condiciones del método empleado el valor de la constante es correcta. El valor obtenido para la constante de este complejo fue de 5000M.

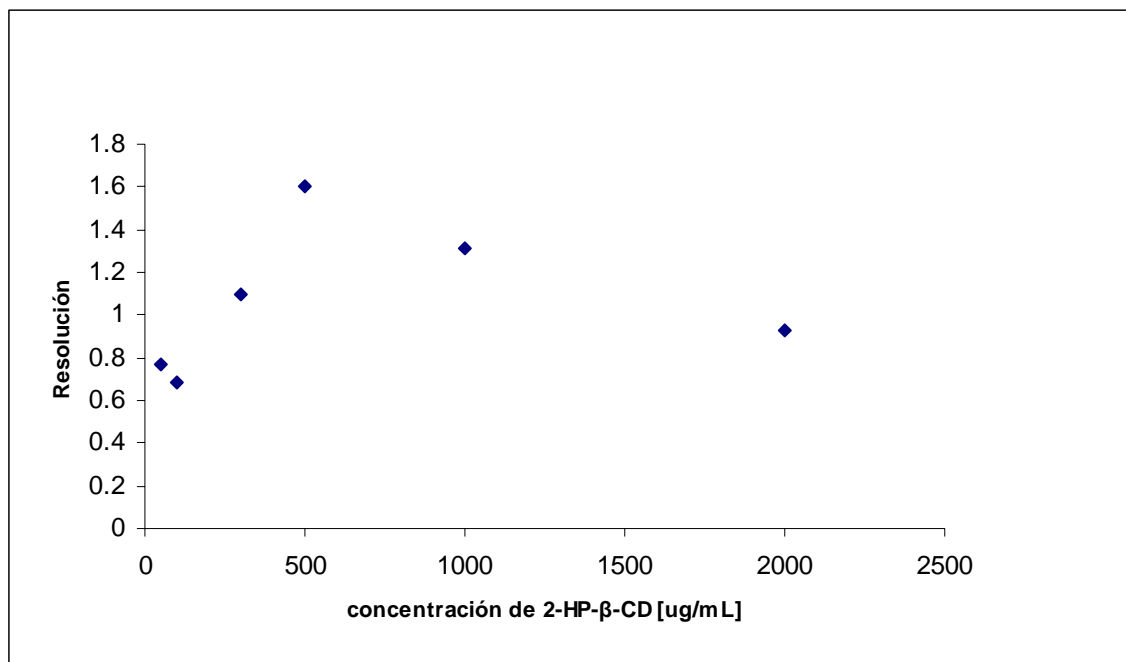
A continuación se muestra la gráfica 9 que describe lo explicado anteriormente.



Gráfica 9 Curva del complejo clorambucilo – 2 –HP – β –CD

Para este complejo fue necesario llevar a cabo un estudio de resolución respecto a las concentraciones de trabajo, debido a que es el único complejo aparentemente que se ve afectado por un exceso de ciclodextrina, por tal motivo sus movilidades no presentan una tendencia definida.

En la gráfica 10 se aprecia la resolución de este complejo de acuerdo a las diferentes concentraciones de trabajo.



Gráfica 10 Curva de resolución respecto a la concentración del complejo clorambucilo - 2 -Hidroxiopropil - β -Ciclodextrina.

Por el comportamiento de la gráfica 10, decimos que las condiciones que se establecieron para el método, permitieron determinar adecuadamente los valores de movilidad y esto justifica que si hay un efecto generado por un exceso de 2 -hidroxiopropil - β -ciclodextrina en su complejo.

11 CONCLUSIONES

1. Se desarrollo un método analítico por la técnica de electroforesis capilar para la identificación de complejos de inclusión de β -Ciclodextrina con Clorambucilo.
2. Los límites de detección (LD) para cada uno de los complejos fueron de 13.46 $\mu\text{g/mL}$ para DM $-\beta$ $-\text{CD}$, 5.2458 $\mu\text{g/mL}$ para TM $-\beta$ $-\text{CD}$ y 0.7767 $\mu\text{g/mL}$ para 2 $-\text{HP}$ $-\beta$ $-\text{CD}$. Así como sus límites de cuantificación (LC) fueron de 22.44 $\mu\text{g/mL}$ para DM $-\beta$ $-\text{CD}$, 8.7430 $\mu\text{g/mL}$ para TM $-\beta$ $-\text{CD}$ y 1.2945 $\mu\text{g/mL}$ para 2 $-\text{HP}$ $-\beta$ $-\text{CD}$. Estos valores fueron determinados de acuerdo con la relación señal ruido 1/3 LD y 1/5 para el LC.
3. En la determinación del comportamiento de la movilidad del complejo de CHL $-\text{DM}$ $-\beta$ $-\text{CD}$, se observó que aún cuando se aumenta el exceso de β $-\text{ciclodextrina}$ este no presenta un cambio notable.
4. Por otra parte el complejo de CHL -2 $-\text{HP}$ $-\beta$ $-\text{CD}$ si presenta una variación de acuerdo al incremento de β $-\text{ciclodextrina}$, ya que sus movilidades van aumentando.
5. El complejo de CHL $-\text{DM}$ $-\beta$ $-\text{CD}$ no presenta cambio en la movilidad aún con una cantidad elevada de ciclodextrina. La constante de formación para éste compuesto es de 1084M.
6. Los complejos CHL -2 $-\text{HP}$ $-\beta$ $-\text{CD}$ y CHL $-\text{TM}$ $-\beta$ $-\text{CD}$ tuvieron valores de constante de formación de 5000M y de 400M respectivamente, siendo



- importante destacar que un valor elevado de la constante como el de 5000M no indica que sea el complejo de mayor interés farmacológico.
7. El método mostró ser confiable para la cuantificación de los compuestos a las condiciones de trabajo, haciendo énfasis en el hecho de que las mediciones en su momento se realizarán en formas farmacéuticas que llevarán una carga moderada o elevada del compuesto activo.

 8. La Electroforesis Capilar es una técnica muy versátil, que nos permite realizar las determinaciones de diversos compuestos de interés farmacológico para el ser humano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Li, N.; Duan, J.; Chen, H.; Chen, G. *Talanta*. **59**, 19- 499, **2003**.
2. Skoog, D.; West, D.; Holler, J.; Crouch, S. *Fundamentos de Química Analítica*. Editorial Thomson. 8va. Edición. 1016-1024pp. **2005**.
3. Amram, M.B.; Lakkis, M.D.; Lagarde, F.; Leroy, M.J. F.; López-Sánchez, J.F.; Rauret, G.; Fresenius. *J. Anal. Chem.*, 345 420 **1993**.
4. Cousins, S.M.; Haddad, P.R.; Buchberger, W. *J. Chromatogr. A*, 671 397 **1994**.
5. Monclus, A...; Rodríguez, M.; Massana, I. *LC-GC Internacional*, 9 79 **1996**.
6. Blatny, P.; Fisher, C.H.; Rizzi, A...; Kenndler, E. *J. Chromatogr. A*, 7 17 157 **1995**.
7. <http://www.ifi.csic.es/pagpersu/cifu/Equipos.htm#PACE-2050>.
8. Handbook of laboratory safety. 2nd. Ed., Ed. By Norman E. Steere. *CRC Press, Inc.* Boca Ratono Pg 521 **1971**.
9. Guzman N.A. *Capillary Electrophoresis technology*. Marcel Decaer; New York, 1 – 83 **2001**.
10. Ruiz Marrondo, S. *Desarrollo de métodos de electroforesis capilar en fase micelar. Aplicación al análisis de herbicidas y de sus productos de degradación*. Universidad Politécnica de Cataluna **2001**.
11. Lee A. W. M.; Chan, W.F.; Yuen, F.S.Y.; Lo, C.H.; Chan, R.C.K.; Liang, Y. *Anal. Chim. Acta*, 339 123 **1997**.
12. Grimm, U. R.; Godel, H.; Schuster, K.; Ross, G.; Soga, T. *LC – GC Inter.*, 10 176 **1997**.
13. Wu, Q.; Claessens, H. A.; Cramers, C.A. *Chromatographia*, 34 25 **1992**.

-
-
14. Mac Taylor, C.E.; Swing, A.G.; *Electrophoresis*, 18 2279 **1997**.
 15. Thompson, T.J.; Foret, F.; Vourus, P.; Karge, B.L. *Anal. Chem.* 65 900 **1993**.
 16. Tagliaro, F.; Turina, S.; Pisi, P.; Smith, F.P.; Marigo, M. *J. Chromatogr. B*, 713 27 **1998**.
 17. Baker, D.R. *Capillary Electrophoresis. John Wiley & Sons Inc* **1995**.
 18. Jandik, P.; Bonn, G. *Capillary Electrophoresis of small molecules and ions. VCH Publishers, Inc. New York.* **1993**.
 19. Valkó, I.E.; Sirén, H.; Riekkola, M.L.; *J. Microcolumn Separations*, 8 421 **1996**.
 20. Carneiro, M.C.; Puignou, L.; Galceran, M.T. *J. Chromatog. A.* 669 217 **1994**.
 21. Galceran, M.T.; Carneiro, M.C.; *Chromatographia*, 39 581 **1994**.
 22. Masselter, S.M.; Zemann, A.J.; *Anal. Chem.*, 67 1041 **1995**.
 23. Contreras Quiñónez, H.J. *Encapsulamiento molecular de sustancias en derivados de amilasa y ciclodextrinas*. 3er. Seminario sobre Avances en Química de la Madera, Depto. de Madera, Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara, México **1997**.
 24. Davies, I.D.; Allanson, J.P.; Causon, R.C. *J.Chrom.* 732, 173 – 184 **1999**.
 25. Loukas, Y.L. *Pharm. Biomed. Anal.* 16, 275 – 280 **1997**.
 26. Budavari, S.; J. O’Nerl, M.; Smith, A.; *The Merck Index*. 11va. Edición. 318. **1989**.
 27. Hernández Balboa, Vela Arévalo V.; Abrego Reyes, V.H.; Velazques, A.M.; Quintanar Ganem, A.; Quintanar, D.; Camacho, B.; Nava Arzaluz, G.; Rosales Hoz, M.; Leyva, M.A.; Angeles, E. M. A. *Chromatographia*, 67 **2008**.

-
-
28. Abrego Reyes V. H. *Aplicaciones de la electroforesis capilar para la determinación de compuestos químicos a partir de diferentes matrices*. FESC-UNAM. 4-12 **2006**.
29. García, M.A.; Soberón, E.; Cortés, M.; Rodríguez, R.; Herrera, J.L.; Alcántara, A. *Métodos Analíticos. Guía de Validación*. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C. 54 **2002**.
30. Muñoz-Botella, S.; Del Castillo, B.; Martín, M. A. *Ars. Pharm.* 36, 187-98 **1995**.
31. www.tdx.cesca.es/TESIS-UPC/AVAILABLE/TDX-0130102-115958//04cap1.pdf -

ANEXO 1. Análisis de Varianza del clorambucilo.

conc. µg/mL	5.049	10.09	20.1	30.2	40.3	80.7
meff1	-0.00943002	-0.00937481	-0.00909276	-0.00920541	-0.00961957	-0.00959101
meff2	-0.009280992	-0.00949738	-0.009334281	-0.00939041	-0.00942994	-0.00929481
meff3	-0.009505824	-0.009548057	-0.009247114	-0.00946552	-0.00968114	-0.00936412

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Desv Est
Columna 1	3	-0.028216836	-0.009405612	1.3084E-08	0.00011439
Columna 2	3	-0.028420248	-0.009473416	7.9343E-09	8.9075E-05
Columna 3	3	-0.027674154	-0.009224718	1.4959E-08	0.00012231
Columna 4	3	-0.028061339	-0.00935378	1.7919E-08	0.00013386
Columna 5	3	-0.028730646	-0.009576882	1.7142E-08	0.00013093
Columna 6	3	-0.028249939	-0.009416646	2.4002E-08	0.00015493

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2.08234E-07	5	4.16468E-08	2.63	0.07896527	3.11
Entre grupos	1.90083E-07	12	1.58402E-08			
Total	3.98317E-07	17				

No se rechaza H_0 pues F calculada es menor que F crítica además P calculada es mayor que 0.05.

ANEXO 2. Análisis de Varianza del complejo de clorambucilo –dimetil – β – ciclodextrina.

conc. mcg/ml	10	20	40	60	80	100	200
meff1	-1.02E-02	-9.73E-03	-9.76E-03	-9.74E-03	-9.65E-03	-1.01E-02	-9.81E-03
meff2	-1.02E-02	-9.70E-03	-9.70E-03	-9.71E-03	-9.86E-03	-9.98E-03	-0.0101
meff3	-9.71E-03	-9.68E-03	-9.55E-03	-9.63E-03	-9.59E-03	-1.02E-02	-9.98E-03

Análisis de varianza de un factor

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	3	-0.03011	-0.01003667	8.0033E-08
Columna 2	3	-0.0291053	-0.00970177	6.3358E-10
Columna 3	3	-0.0290061	-0.0096687	1.2295E-08
Columna 4	3	-0.029082	-0.009694	2.9706E-09
Columna 5	3	-0.0290999	-0.00969997	2.1334E-08
Columna 6	3	-0.0302814	-0.0100938	1.1975E-08

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5.6688E-07	5	1.1338E-07	5.2634615	0.00866511	3.10587524
Dentro de los grupos	2.5848E-07	12	2.154E-08			
Total	8.2537E-07	17				

Se rechaza H_0 pues F calculada es mayor que F crítica, además P calculada es mayor que 0.05. No se rechaza H_1 .

Se concluye que las movilidades son diferentes debido a que la hipótesis planteada fue:

$H_0: \mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 + \mu_5 + \mu_n$

$H_1: \text{al menos } \mu_1 \neq \mu_n$

ANEXO 3. Análisis de Varianza del complejo de clorambucilo –2 –hidroxipropil –β – ciclodextrina.

conc mcg/ml	5	10	20	40	60	80	100	200
meff1	-0.01015563	-0.00915633	-0.00973431	-0.00923427	-0.01009098	-0.00956605	-0.01013643	-0.00974516
meff2	-0.00961462	-0.01014814	-0.00952739	-0.00928259	-0.00973353	-0.00961543	-0.00979048	-0.00985378
meff3	-0.00952503	-0.0094357	-0.01010279	-0.0094157	-0.00948701	-0.01029204	-0.009851	-0.00963832

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Desv Est.
Columna 1	3	-0.02929529	-0.0097651	1.1639E-07	0.00034117
Columna 2	3	-0.02874017	-0.00958006	2.6155E-07	0.00051142
Columna 3	3	-0.02936449	-0.00978816	8.4949E-08	0.00029146
Columna 4	3	-0.02793255	-0.00931085	8.8281E-09	9.3958E-05
Columna 5	3	-0.02931153	-0.00977051	9.222E-08	0.00030368
Columna 6	3	-0.02947351	-0.0098245	1.6455E-07	0.00040565
Columna 7	3	-0.02977791	-0.00992597	3.4137E-08	0.00018476
Columna 8	3	-0.02923727	-0.00974576	1.1606E-08	0.00010773

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7.4977E-07	7	1.0711E-07	1.10675051	0.40507014	2.6571966
Dentro de los grupos	1.5485E-06	16	9.6779E-08			
Total	2.2982E-06	23				

No se rechaza H_0 pues F calculada es menor que F crítica además P calculada es mayor que 0.05. Por lo tanto decimos que considerando un intervalo de confianza del 95% las movilidades son iguales debido a que la hipótesis planteada fue:

$H_0: \mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 + \mu_5 + \mu_n$

H_1 : al menos un par de medias son diferentes

ANEXO 4. Análisis de Varianza del complejo de clorambucilo –trimetil – β – ciclodextrina.

conc mcg/ml	5	10	20	40	60	80	100	200
meff1	-9.03E-03	-9.41E-03	-9.60E-03	-9.71E-03	-9.60E-03	-9.33E-03	-9.79E-03	-9.66E-03
meff2	-9.33E-03	-9.17E-03	-9.38E-03	-9.52E-03	-9.73E-03	-9.56E-03	-9.57E-03	-9.60E-03
meff3	-9.37E-03	-9.28E-03	-9.35E-03	-9.37E-03	-9.24E-03	-9.64E-03	-9.56E-03	-9.60E-03

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	Desv Est.
Columna 1	3	-0.0277276	-0.00924253	3.2873E-08	0.00018131
Columna 2	3	-0.0278673	-0.0092891	1.4212E-08	0.00011921
Columna 3	3	-0.0283301	-0.00944337	1.9735E-08	0.00014048
Columna 4	3	-0.0286029	-0.0095343	2.9159E-08	0.00017076
Columna 5	3	-0.0285642	-0.0095214	6.3998E-08	0.00025298
Columna 6	3	-0.0285344	-0.00951147	2.4883E-08	0.00015774
Columna 7	3	-0.028922	-0.00964067	1.6442E-08	0.00012823
Columna 8	3	-0.0288594	-0.0096198	1.2499E-09	3.54E-05

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4.3503E-07	7	6.2148E-08	2.4545804	0.06490656	2.6571966
Dentro de los grupos	4.051E-07	16	2.5319E-08			
Total	8.4014E-07	23				

No se rechaza H_0 pues F calculada es menor que F crítica además P calculada es mayor que 0.05.

Por lo tanto decimos que considerando un intervalo de confianza del 95% las movilidades son iguales debido a que la hipótesis planteada fue. $H_0: \mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 + \mu_5 + \mu_n$