

10



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

## " DESARROLLO DE UN PROGRAMA EN AMBIENTE MULTIMEDIA SOBRE ELECTROFORESIS CAPILAR "

2019

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A:

MIRIAM AIDE CASTILLO RODRÍGUEZ

ASESORES: DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO  
DRA. ALMA L. REVILLA VÁZQUEZ  
M. EN C. PATRICIA RIVERA GARCÍA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
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:

" Desarrollo de un Programa en Ambiente Multimedia  
sobre Electroforesis Capilar "

que presenta la pasante: Miriam Aide Castillo Rodríguez  
con número de cuenta: 9656478-9 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 09 de Julio de 2001

PRESIDENTE D.A.R. Juan José Díaz Esquivel

VOCAL Q.F.B. Martha P. Zúñiga Cruz

SECRETARIO Dr. Alma L. Revilla Vázquez

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. José A. Garduño Rosas

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera

**A Ma. Elena y Magdaleno, mis padres.**

Por estar conmigo, por su confianza, por darme su amor, apoyo y comprensión, por el gran sacrificio que han hecho para ayudarme, y por muchas cosas más. Esto es fruto de todo lo que han sembrado en mí, éste pequeño logro también es de ustedes, los amo.

**A Nadia, mi hermana.**

Por tu cariño, por tu apoyo y por darme ánimos cuando siento que no avanzo, porque aunque no lo demuestres tienes un gran corazón. Espero que esto te motive a seguir adelante y lograr todo lo que te propones. Confía en Dios, él te guiará siempre. Te quiero mucho.

**A Sergio, Edith y Jesús, mis hermanos.**

Por darme ánimo y confiar en mí, por su compañía y comprensión, por todo lo que hemos compartido juntos, siempre cuenten conmigo. Los quiero mucho.

**A Karen, Aline, Mariana, Itzel, Abigail, Sergio, Diego, Paola, mis sobrinos**

Como pequeño aliciente para que se cultiven y luchen por lo que quieren, porque tengo mucha confianza que serán personas de provecho, los quiero mucho a todos.

**A Edgar, el más pequeño de mis sobrinos.**

En especial a ti, porque desde ahora eres y serás la alegría del hogar, cuida siempre a nuestros papás y recuerda que lo más valioso no es lo que tienes en la vida, sino a quienes tienes en tu vida. Te quiero.

**A Dios**

Por seguir viviendo, por permitirme avanzar en mi camino, por ayudarme a ser más fuerte y por estar siempre conmigo.

**A mis Padres.**

Por brindarme su apoyo incondicional y preocuparse por mí, especialmente a mi madre que me ha enseñado a confiar en mí misma.

**A la F.E.S. Cuautitlán, U.N.A.M.**

Por la formación recibida, por ser parte de ella, estoy orgullosa de ser universitaria.

**A la Dra. Raquel**

Por el apoyo, comprensión y confianza, porque en su momento fue mi ángel guardián.

**A Alma Luisa**

Por su apoyo, confianza y su valiosa contribución en la realización de ésta tesis. Gracias por creer en mí.

**A mis asesores:**

Dra. Raquel López Arellano, Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez, M en C. Patricia Rivera García. Por ayudarme en la realización de éste trabajo. Muchas gracias.

**A mis sinodales:**

D.A.R. Juan José Díaz Esquivel, Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez, M. en C. Patricia Zúñiga Cruz, Q.F.B. José Antonio Garduño y Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera.

**A Dra. Gabriela Vargas.**

Por su confianza, sugerencias, comentarios y su ayuda con material e información reciente.

**A M en C. Armando Cervantes Sandoval.**

Por su apoyo, sugerencias y comentarios respecto al sistema desarrollado.

**A mis amigos Edgar y Agustín: Rocío, Sandra y Gris.**

Por apoyarme y estar conmigo en el último semestre, por comprenderme y ayudarme.

A todas las personas que han sido, son y serán parte de mi vida.

Gracias:

Miriam Aide

## INDICE GENERAL:

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE ESQUEMAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ABREVIATURAS	VIII
RESÚMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	7
PARTE I. ASPECTOS ELECTROFORÉTICOS	
1. INTRODUCCIÓN.	8
1.1. HECHOS HISTÓRICOS	8
2. GENERALIDADES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR	13
2.1. PROCESO ELECTROFORÉTICO	13
2.2. ELECTROFORESIS CAPILAR	14
2.3. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA	17
2.4. FACTORES QUE AFECTAN LA VELOCIDAD DE MIGRACIÓN	19
2.4.1. LA MUESTRA	19
2.4.2. EL MEDIO DE SOPORTE (CAPILAR)	20
2.4.2.1. ELECTROÓSMOSIS	20
2.4.2.2. ADSORCIÓN	22
2.4.3. EL ELECTROLITO SOPORTE	23
2.4.3.1. COMPOSICIÓN	23
2.4.3.2. CONCENTRACIÓN	23
2.4.3.3. PH	24
2.4.3.4. SELECCIÓN DEL BÚFER	25
2.4.4. EL CAMPO ELÉCTRICO	26
2.4.4.1. INTENSIDAD DE CORRIENTE	26
2.4.4.2. VOLTAJE	27
2.4.4.3. RESISTENCIA	28
2.5. PRINCIPALES VENTAJAS Y DESVENTAJAS	29
3. PRINCIPIOS DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA.	30
3.1. MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA	30
3.2. EL FLUJO ELECTROOSMÓTICO	31
3.3. MOVILIDAD APARENTE Y TIEMPO DE MIGRACIÓN	36
3.4. REPRODUCIBILIDAD, TIEMPO DE MIGRACIÓN, Y MOVILIDAD	37
3.4.1. FACTORES QUE AFECTAN LA REPRODUCIBILIDAD DEL TIEMPO DE MIGRACIÓN	37
3.5. FACTORES QUE AFECTAN LA EFICIENCIA	39
3.5.1. DISPERSIÓN	39
3.5.1.1. ELECTRODISPERSIÓN	41

3.5.2. CALOR DE JOULE Y GRADIENTES DE TEMPERATURA	44
3.5.3. LONGITUD DE LA INYECCIÓN	47
3.5.4. INTERACCIÓN PARED-ANALITO	47
3.6. EFICIENCIA Y RESOLUCIÓN EN EC	48
3.7. CONTROL DE LA RESOLUCIÓN EN EC	50
3.7.1. LA TEMPERATURA	51
3.7.2. FLUJO ELECTROOSMÓTICO	51
<b>4. MODOS DE SEPARACIÓN.</b>	<b>53</b>
4.1. ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA	54
4.2. CROMATOGRAFÍA CAPILAR ELECTROCINÉTICA MICELAR	55
4.2.1. SEPARACIONES QUIRALES	65
4.2.2. INMUNO ELECTROFORESIS CAPILAR	66
4.3. ELECTROFORESIS CAPILAR DE ENFOQUE ISOELÉCTRICO	69
4.4. ISOTACOFRESIS CAPILAR	74
4.5. ELECTROFORESIS CAPILAR EN GEL	78
4.6. ELECTROCROMATOGRAFÍA	85
<b>5. INSTRUMENTACIÓN</b>	<b>92</b>
5.1. INTRODUCCIÓN DE LA MUESTRA	94
5.1.1. INYECCIÓN HIDRODINÁMICA	95
5.1.2. INYECCIÓN ELECTROCINÉTICA	97
5.1.3. APILAMIENTO O PRECONCENTRACIÓN	99
5.2. EL CAPILAR	101
5.2.1. ACONDICIONAMIENTO	103
5.3. SISTEMA DE ENFRIAMIENTO	104
5.4. FUENTE DE PODER O VOLTAJE	105
5.5. SISTEMAS DE DETECCIÓN	105
5.5.1. DETECCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA ULTRAVIOLETA-VISIBLE	107
5.5.1.1. DETECCIÓN INDIRECTA	110
5.5.2. DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA	111
5.5.2.1. FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER	114
5.5.2.2. DERIVACIÓN	114
5.5.3. DETECCIÓN POR ARREGLO DE DIODOS	116
5.5.4. DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA	117
5.5.4.1. DETECCIÓN CONDUCTIMÉTRICA	118
5.5.4.2. DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA	119
5.5.4.3. DETECCIÓN POTENCIOMÉTRICA	120
5.5.5. DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	120
5.5.6. SISTEMAS ACOPLADOS	121
5.5.6.1. ESPECTROMETRÍA DE PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE - ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	122
5.5.6.2. ELECTRO - ASPERSIÓN-ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA	123
5.5.7. OTROS DETECTORES USADOS	124
5.6. AUTOMATIZACIÓN	126

6. APLICACIONES	128
6.1. INDUSTRIA FARMACÉUTICA	128
6.1.1. CONTROL Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS	129
6.1.2. DETERMINACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO	129
6.1.3. MONITOREO EN FLUIDOS BIOLÓGICOS	130
6.1.3.1. FÁRMACOS CON CARACTERÍSTICAS BÁSICAS, SOLUBLES EN AGUA	131
6.1.3.2. FÁRMACOS CON CARACTERÍSTICAS BÁSICAS, INSOLUBLES EN AGUA	131
6.1.3.3. FÁRMACOS CON CARACTERÍSTICAS ÁCIDAS, SOLUBLES EN AGUA	132
6.1.3.4. FÁRMACOS CON CARACTERÍSTICAS ÁCIDAS, INSOLUBLES EN AGUA	132
6.2. MEDICINA	133
6.3. CRIMINALÍSTICA, MEDICINA LEGAL	134
6.4. INDUSTRIA ALIMENTARIA	135
6.4.1. CARBOHIDRATOS	135
6.4.2. VITAMINAS	136
6.4.3. CATIONES INORGÁNICOS	137
6.4.4. COLORANTES Y PIGMENTOS	137
6.5. INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS	138
6.5.1. ELECTROFORESIS CAPILAR DE AFINIDAD (ECA)	140
6.5.2. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS	142
6.5.3. ANÁLISIS DE PÉPTIDOS	143
6.5.4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	144
6.5.5. ANÁLISIS GENÉTICO	146
COMENTARIOS DE LA PARTE I	147
PARTE II. ASPECTOS COMPUTACIONALES	
7. MARCO TEÓRICO COMPUTACIONAL	148
7.1. LAS COMPUTADORAS EN LA EDUCACIÓN	148
7.2. SISTEMAS MULTIMEDIA	149
7.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS SISTEMAS MULTIMEDIA	151
7.3.1. INTERACTIVIDAD	151
7.3.2. RAMIFICACIÓN	152
7.3.3. TRANSPARENCIA	152
7.3.4. NAVEGACIÓN	152
7.4. VENTAJAS DE MULTIMEDIA	152
7.5. DESVENTAJAS DE MULTIMEDIA	153
7.6. MULTIMEDIA Y EDUCACIÓN	154
7.7. SISTEMAS DE DESARROLLO MULTIMEDIA	155
7.8. SISTEMAS MULTIMEDIA EN FARMACIA INDUSTRIAL	159
7.8.1. PROYECTO MEZCLADO	159
7.8.2. BUPRAMA	160



---

7.8.3. FLUIDIZA	161
7.8.4. MACALI	162
7.8.5. DISPOLTAB	164
7.8.6. MACROMIL	165
7.9. REQUERIMIENTOS DE HARDWARE	167
7.10. REQUERIMIENTOS DE SOFTWARE	167
7.11. <i>ASYMETRIX MULTIMEDIA TOOLBOOK</i>	168
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>180</b>
8.1. SISTEMA MULTIMEDIA FEC	180
8.2. DESCRIPCIÓN DE FEC	181
8.3. EN EL SISTEMA MULTIMEDIA FEC SE CUENTA CON..	182
8.4. DESCRIPCIÓN DE LAS PANTALLAS	184
8.5. GUÍA DE INSTALACIÓN	187
8.6. DIAGRAMA DE FLUJO DE DATOS	188
8.7. PANTALLAS REPRESENTATIVAS DE FEC	189
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>194</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>197</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>199</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	EXPERIMENTO DE REUSS	9
2	SISTEMA GENERAL DE ELECTROFORESIS	16
3	REACCIONES DE LOS ELECTRODOS	18
4	INFLUENCIA DEL pH EN LA FORMA DE UN AMINOÁCIDO O PROTEÍNA	24
5	REPRESENTACIÓN DE UNA MACROMOLÉCULA	30
6	REPRESENTACIÓN DE LOS GRUPOS SILANOL DE ACUERDO AL pH.	32
7	COMPARACIÓN DEL PERFIL DE FLUJO EN EC Y CLAR	34
8	DISTRIBUCIÓN DEL CALOR DE JOULE DENTRO DEL CAPILAR	45
9	REPRESENTACIÓN DE AGREGADOS FORMADOS POR SURFACTANTES	57
10	REPRESENTACIÓN DE UNA BETA-CICLODEXTRINA	63
11	DÉRIVADOS DEL COLESTEROL PARA OBTENER SALES BILIARES	63
12	ESTRUCTURA DE LA VANCOMICINA	64
13	ESTRUCTURA DEL ÉTER	65
14	REPRESENTACIÓN DE UNA REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO	67
15	GRÁFICO DE SEPARACIÓN POR ENFOQUE ISOELÉCTRICO	71
16	ILUSTRACIÓN DE LA SEPARACIÓN POR ISOTACOFORESIS	75
17	REPRESENTACIÓN DE UN ISOTACOFEROGAMA	77
18	DIFERENCIA ENTRE GELES QUÍMICOS Y FÍSICOS	81
19	SISTEMA ELECTROFORÉTICO GENERAL	92
20	TIPOS DE INYECCIÓN HIDRODINÁMICA	96
21	INYECCIÓN ELECTROCINÉTICA	97
22	DETECTOR ULTRAVIOLETA/VISIBLE	107
23	MODALIDADES DE CAPILARES PARA MEJORAR LA DETECCIÓN	109
24	DETECTOR DE FLUORESCENCIA	112
25	DERIVACIÓN DEL CLORURO DE DINITROBENZOILO	115
26	DERIVACIÓN DE LA 2,4-DINITROFENILHIDRAZINA	115
27	DETECTOR POR ARREGLO DE DIODOS	116
28	DETECTOR CONDUCTIMÉTRICO	119
29	DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS	121
30	DETECTOR DE PAI-EM-EC	122
31	ELECTROASPERSIÓN NUBE ELECTROSTÁTICA CARGADA	124
32	REPRESENTACIÓN DE LA UNIÓN COMPLEJO-LIGANDO	140
33	REACCIÓN DEL 5-N, N-DIMETILAMINO-NAFTALENO	142
34	REACCIÓN DEL 9-FLUORENILMETIL CLOROFORMATO	142
35	COMPOSICIÓN DE UN SISTEMA EN TOOLBOOK	171
36	HERRAMIENTAS PARA DISEÑAR UN LIBRO EN TOOLBOOK	172

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	PROCESO DE SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA	13
2	REPRESENTACIÓN GENERAL DEL PROCESO ELECTROFORÉTICO	19
3	TEORÍA DE LA DOBLE CAPA Y POTENCIAL ZETA	22
4	CORRIENTE DE FLUJO EN EC.	27
5	DESPLAZAMIENTO DEL FEO.	28
6	FLUJO ELECTROOSMÓTICO, BAJO UNA CAMPO ELÉCTRICO	34
7	ELECTRODISPERSIÓN (alta conductividad de la muestra)	42
8	ELECTRODISPERSIÓN (baja conductividad de la muestra)	43
9	CONDUCTIVIDAD EQUIVALENTE	43
10	ILUSTRACIÓN DE UNA SEPRACIÓN ZONAL	54
11	MIGRACIÓN DE UNA MICELA ANIÓNICA	56
12	REPRESENTACIÓN DE UNA SEPRACIÓN MEDIANTE LA FORMACIÓN DE MICELAS	59
13	REPRESENTACIÓN DE UNA SEPARACIÓN MEDIANTE EL USO DE UNA CICLODEXTRINA	66
14	REPRESENTACIÓN DE UNA SEPARACIÓN POR ENFOQUE ISOELÉCTRICO	70
15	GENERACIÓN DEL GRADIENTE DE pH	70
16	INTRODUCCIÓN DE LA MUESTRA EN EL CAPILAR	72
17	SEPARACIÓN POR TAMAÑO EN ECG	80
18	COMPARACIÓN DE PERFILES DE FLUJO	87
19	ELECTROCROMATOGRAFÍA EN CAPILARES EMPACADOS CON PARTÍCULAS DE SÍLICA GEL	88
20	MECANISMO DE APILAMIENTO DE LA MUESTRA	100
21	MECANISMO DE DESPLAZAMIENTO PARA LA DETECCIÓN INDIRECTA	111
22	DÉTECTOR POR FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER	114

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	RESUMEN DE LOS TIPOS DE BÚFER MÁS USADOS EN EC.	26
2	VELOCIDAD RELATIVA DEL ANALITO	35
3	FACTORES QUE AFECTAN UNA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA	38
4	RESUMEN DEL ORIGEN DE ENSANCHAMIENTO DE PICOS	48
5	DETERGENTES BIOLÓGICOS	62
6	POLÍMEROS MÁS USADOS Y SU APLICACIÓN	83
7	FACTORES QUE AFECTAN LA PRECISIÓN DE LA INYECCIÓN	101
8	LÍMITES DE DETECCIÓN POR ELEMENTO USADO PAI/EM	123
9	RESUMEN DE LOS TIPOS DE DETECTORES Y SUS LÍMITES DE DETECCIÓN	125
10	APLICACIONES EN DIVERSAS ÁREAS	128
11	EJEMPLOS DE ALGUNAS FORMULACIONES FARMACÉUTICAS	133
12	DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS	
13	COLORANTES AZO DETERMINADOS POR ECZ	138
14	DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE UN PÉPTIDO LACTOGLOBULINA	143
15	LIBROS QUE CONSTITUYEN AL SISTEMA FEC	181

## ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
A	Amperios
AAMU	5-acetilamino-6-amino-3-metiluracil
Ac	Anticuerpo
ACES	Ácido etanosulfónico-2-[(2-amino-2-oxoetil)amino]
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AFMU	5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracilo
Ag	Antígeno
BCTA	Bromuro de cetiltrimetilamonio
BDTA	Bromuro de dodeciltrimetilamonio
BES	Ácido 2-[bis-2(2-hidroxietyl)amino]etanosulfónico
Bicina	N, N-bis[2-hidroxietyl]glicina
bis	Bisacrilamida
CCEM	Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar
CD	Ciclodextrina
CL	Cromatografía de Líquidos
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CMC	Concentración Micelar Crítica
CTAB	Bromuro de Cetiltrimetilamonio
CHAPS	Sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano
DABSYL	Derivados de cloruro de 4,4-dimetilamino azobenzene-4'-sulfonilo
DAD	Detector de arreglo de Diodos
DC	Detector de Conductimetría
DCS	Deoxicolato de Sodio
DER	Desviación Estándar Relativa (%)
DGP	Detector de Gradiente de Potencial
DNS	Derivados dansilados
DSS	Dodecil-sulfato de sodio
DSS-EGPA	Dodecil Sulfato de Sodio-Electroforesis en Gel Poliacrilamida
DTAB	bromuro de Dodeciltrimetilamonio
EC	Electroforesis Capila
ECA	Electroforesis Capilar de Afinidad
ECAR	Electroforesis Capilar de Alta Resolución
ECC	Electrocromatografía Capilar
ECEI	Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico
EC-EM	Electroforesis capilar- Espectrometría de Masas
ECG	Electroforesis Capilar en Gel
ECZ	Electroforesis Capilar de Zona
EDTA	Ácido Etilendiamino tetracético

## CONTINUACIÓN DE ABREVIATURAS

EM	Espectrometría de Masas
FDA	Food and Drug Administration
FIL	Fluorescencia Inducida por Láser
FITC	Isocianato de Fluoresceína
FMOOC	Derivados de fluorescamina y 9-fluorenilmetil cloroformato
HEPES	Ácido [N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-2-etanosulfónico]
HEPPSO	Ácido N-[2-hidroxi-etil]piperazina-N'-[2-hidroxi-propanosulfónico]
hGH	Hormone Growth Human
hHC	hormona Humana de Crecimiento
HPCE	High Performance of Capillary Electrophoresis
HPLC	High Performance of Liquid Chromatography
IC	Isotacoforesis Capilar
IEC	Inmuno Electroforesis Capilar
ITCF	Derivados de isotiocianato de fluoresceína
IU	Ácido 1-metilurico
IX	1-metilxantina
kV	kilovoltios
M	Molaridad
MES	Ácido etanosulfónico-2-[N-morfolino]
mM	milimolar
$\mu$ L	microlitros
$\mu$ m	micrometros
NDA	Derivados de naftaleno dicarboxaldehído
nL	nanolitros
nm	nanometros
OFA	Derivados de orto-ftaldialdehído
$\Omega$	Ohmios
OPA	Orto-ftaldehído
pI	Punto Isoeléctrico
PIPES	Ácido Piperazina-N,N'-bis-[etanosulfónico]
PTH	Derivados de feniltiohidantoína
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrilamide Gel Electrophoresis
TAA	Sales de Tetraalquilamonio
THC	11-nor-tetrahidrocannabinol-9-carboxiácido
TRIS	Tris(hidroximetil)amino-metano.
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
V	voltios

# RESÚMEN

## RESUMEN

Considerando que la Electroforesis Capilar es una técnica analítica de gran importancia, poco conocida en nuestro país, con gran auge en el mercado, y además utilizada en diversas áreas de investigación para la separación y cuantificación de moléculas pequeñas como iones y macromoléculas como aminoácidos, proteínas, péptidos, carbohidratos, y fragmentos de ADN<sup>1</sup>, entre otros. La Electroforesis Capilar comparada con otras técnicas analíticas (por ejemplo CLAR<sup>2</sup>), tiene grandes ventajas como alta resolución, eficiencia, bajo consumos de solventes orgánicos, tiempos cortos de análisis, además cuenta con distintos modos de separación que pueden adecuarse a las necesidades del analista.

La gran cantidad de información que existe respecto al tema frecuentemente se encuentra en el idioma inglés, además es extensa y compleja; por lo que ha sido necesario realizar un programa que integre información y al mismo tiempo facilite la transmisión y comprensión de ésta.

Por otra parte considerando que en la actualidad, la introducción del cómputo y diversos avances tecnológicos han invadido casi todos los ámbitos de nuestra sociedad, por lo que en éste trabajo se presenta el diseño y desarrollo de un Sistema Multimedia que explica los Fundamentos de la Electroforesis Capilar, denominado FEC; el cuál proporciona un medio adecuado para la transmisión de conocimientos acerca de dicha técnica de manera interactiva, combinando texto, imágenes, tablas, diagramas, gráficos, animaciones, vídeo y sonido mediante una computadora como herramienta física, por lo que el desarrollo de un sistema multimedia acerca de la Electroforesis Capilar, es una buena oportunidad para difundir información sobre

---

<sup>1</sup> Normalmente se determinan fragmentos de Ácido Desoxirribonucleico.

<sup>2</sup> Por sus siglas Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.



dicha técnica, tanto a estudiantes de las carreras de *Químico Farmacéutico Biólogo, Ingenieros Químicos, Químicos, y/o carreras afines*, así como personas que realicen trabajos de investigación en química analítica.

Para el desarrollo del sistema FEC, se recopiló, organizó, depuró y sistematizó una gran cantidad de información para poder plasmarla en cada una de las pantallas de FEC. El sistema FEC se realizó con el *authoring Asymetrix ToolBook*, cuenta con un tamaño de 200 MB aproximadamente; el sistema FEC, consta de 5 capítulos y lo conforman 100 pantallas, más de 200 imágenes, 30 animaciones, 8 videos, 11 archivos de sonido 20 tablas, y cerca de 30 gráficos.

## INTRODUCCIÓN

Los sistemas multimedia son herramientas de apoyo que facilitan la transmisión de información, siendo dinámicos, despiertan el interés y motivación del alumno, permitiendo la consolidación de conocimientos. Además se pueden realizar sistemas multimedia en una amplia gama de temas, generalmente complejos ya que el objetivo es hacerlo atractivo y ayudar al usuario a comprenderlos. Los sistemas multimedia estimulan los ojos, oídos, yemas de los dedos y la más importante la cabeza, mejorando también la interfase y tradicional basada sólo en texto, proporcionando beneficios importantes que atraen y mantienen la atención y el interés, mejorando la retención de la información presentada, y cuando está bien diseñada puede ser muy divertida; en éste caso, se plantea la creación de material de apoyo para el área de la Química Analítica, área que incluye una serie de temas complejos y la aplicación de diversos equipos analíticos, como lo es la técnica analítica "Electroforesis Capilar" que está tomando gran fuerza en la actualidad como técnica de separación y cuantificación de gran variedad de moléculas.

La Electroforesis Capilar es una técnica que ha tenido un desarrollo extraordinario en los últimos años y se caracteriza por la alta eficiencia y rapidez de sus separaciones, así como, por el bajo consumo de disolventes orgánicos; por sus ventajas es utilizada tanto en investigación como en el sector industrial, principalmente en el área química, también de gran interés en el área farmacéutica, alimentaria, biológica y de salud. (Rubinson, 2000, Capítulo 14; Skoog, 2001, Capítulo 30)

El sistema multimedia **Fundamentos de la Electroforesis Capilar**, llamado FEC pretende convertirse en una herramienta útil para todas aquellas personas interesadas en conocer dicha técnica, lo presenta de manera amena, fácil e interactiva, ya que establece una interface con el usuario mostrando videos, que describen los modos de la Electroforesis Capilar, las partes que integran un

instrumento para realizar separaciones por Electroforesis Capilar, las animaciones explican los aspectos electroforéticos o fenómenos que ocurren dentro del capilar en un momento dado, temas que de otra manera serían difíciles de entender.

Para la elaboración del sistema FEC, se diseñó un diagrama de flujo de datos para organizar la información por temas y ayudar a la realización de dicho sistema, además de elaborar un mapa de navegación que indica la forma de explorar el sistema adecuadamente. Se agregaron imágenes, sonido, animaciones y video al texto, los cuáles se integraron mediante el uso del *Authoring Asimetrix ToolBook*<sup>3</sup>, gracias a su fácil programación orientada a objetos. Todo esto involucró distintas etapas: planeación, concepción, desarrollo, depuración, corrección y empaquetamiento.

La información contenida en FEC es una síntesis de la información que se encuentra en éste trabajo escrito; se planteó de manera sencilla y concreta, para lograr los objetivos se desarrolló el presente trabajo escrito que se ha dividido en dos partes o secciones la primera, abarca los aspectos electroforéticos y la segunda los aspectos computacionales; en general contiene los siguientes capítulos:

### 1) Capítulo 1: Introducción.

En éste capítulo se da a conocer el término electroforesis y todo su contexto histórico es decir desde la electroforesis convencional a la electroforesis capilar.

---

<sup>3</sup> Un *authoring* es una herramienta integradora de medios para desarrollar aplicaciones multimedia que brinda el marco esencial para organizar y editar los elementos multimedia (gráficos, textos, sonidos, animaciones y secuencias de vídeo). Soporta muchos dispositivos de hardware y formatos de archivos. Además proporciona una estructura de navegación para estos elementos, usualmente en forma de una especie de sistema de hipertexto.

## 2) Capítulo 2 Generalidades.

En éste capítulo se explican los aspectos más generales; así como la definición de la electroforesis capilar, fundamento de la separación electroforética, partes mínimas que componen el sistema de separación, los factores que afectan los parámetros de separación, así como las ventajas y desventajas de la Electroforesis Capilar.

## 3) Capítulo 3: Principios de la Separación Electroforética.

Se describe lo que es la movilidad electroforética, el flujo electroosmótico, el tiempo de migración, los factores que afectan la eficiencia (explicando lo que es el calor de joule y los gradientes de temperatura, las interacciones pared-analito), así como el control de la resolución y todos los fenómenos involucrados en el proceso de una separación electroforética.

## 4) Capítulo 4: Modos de Electroforesis Capilar.

Se describen los distintos modos de electroforesis capilar que existen como: Electroforesis Capilar de Zona, Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar, Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico, Isotacoforesis Capilar, Electroforesis Capilar en Geles y Electro cromatografía.

## 5) Capítulo 5: Instrumentación.

En éste capítulo se describen los componentes de un equipo de Electroforesis Capilar, describiendo desde la introducción de la muestra (técnicas de inyección), equipo básico del que está formado un instrumento: el capilar, la fuente de poder, el sistema de enfriamiento, los sistemas de detección (Absorbancia UV-Vis, Fluorescencia, Espectrometría de Masas, Amperometría y Conductividad).

## 6) Capítulo 6: Campos de Aplicación.

En éste capítulo se describe a grandes rasgos la utilización de la Electroforesis Capilar en distintas áreas, principalmente: en la industria alimentaria, farmacéutica, medio ambiente e investigación bioquímica.

## 7) Capítulo 7: Aspectos Computacionales.

En éste último capítulo se describe de manera general los conceptos importantes para el desarrollo de FEC, los antecedentes de los sistemas multimedia en la educación, las ventajas y desventajas de hacer multimedia.

El resultado de la información obtenida se integró en el sistema multimedia FEC, es fácil de manejar, y a su vez muestra la información de manera sencilla, condensada, rápida, amena permitiendo que el usuario explore la información al ritmo que él lo desee.

El sistema multimedia FEC se presenta como una herramienta alternativa que pretende apoyar al profesor en la enseñanza de la Electroforesis capilar como técnica de separación, así como a todas aquellas personas que se interesan en desarrollar, investigar o simplemente conocer ésta técnica analítica.

Por último se presentan las referencias consultadas para la realización tanto del trabajo escrito en extenso, como para el sistema desarrollado FEC.

## **OBJETIVO GENERAL:**

Desarrollar un Sistema Multimedia que describa los Fundamentos de la Electroforesis Capilar y sus aplicaciones en el área de las Ciencias Químico Biológicas; con el fin de mejorar la transmisión de la información y presentarlo como una herramienta alternativa cuyo propósito es apoyar la enseñanza de la Electroforesis Capilar como técnica de separación.

## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- ☐ Recopilar, organizar, analizar, depurar y sistematizar la información necesaria respecto al tema.
- ☐ Diseñar y elaborar un diagrama de flujo de datos basándose en la información analizada y depurada, para facilitar la elaboración del Sistema.
- ☐ Capturar y editar material gráfico, de sonido y video a incluir en el Sistema Multimedia.
- ☐ Realizar el Sistema Multimedia.
- ☐ Depurar y corregir el Sistema Multimedia.
- ☐ Empaquetamiento del Sistema Multimedia FEC.

PARTE I

ASPECTOS

ELECTROFORÉTICOS

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo consideraremos en primer lugar los principios de las separaciones electroforéticas, en especial la **Electroforesis Capilar**, y las aplicaciones de esta técnica en diversas áreas.

Una de las técnicas de separación más utilizadas en la actualidad en los países de primer mundo es la **Electroforesis Capilar**, de gran importancia en el análisis y purificación de biomoléculas apoyando a un sin número de áreas lo que permite resolver gran variedad de problemas analíticos. Los científicos que trabajan con material de origen biológico han tenido la necesidad de separar y examinar las propiedades de moléculas con peso molecular alto, tales como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, lípidos, complejos y carbohidratos, y para hacerlo es necesario no dañarlas o mantener sus propiedades de tal forma que no sean modificadas significativamente. Esto es lo que nos lleva al mejoramiento de equipo y el desarrollo de nuevas técnicas.

La electroforesis convencional ha sido y continua siendo de gran utilidad, sin embargo este tipo de separación electroforética es lenta, laboriosa, difícil de automatizar, y además no proporciona resultados cuantitativos precisos. Lo que revolucionó ésta técnica de separación fue la investigación y aplicación de la electroforesis llevada a cabo en capilares lo que a dado un crecimiento explosivo con la aparición de varios instrumentos en el mercado. (Rivera, 1996, Pp. 1-2)

### 1.1. Historia

El término electroforesis es empleado para describir la migración de partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico; representa una de las técnicas de separación más ampliamente utilizada el área de la química.

El desplazamiento de sustancias bajo la acción de un campo eléctrico fue citado por Reuss en 1809 en las memorias de la Sociedad Imperial Natural (Moscow). En la figura 1, se observa el comportamiento migratorio de pequeñas partículas de arena en un medio de agua contenido en un recipiente de vidrio con un lecho de arena fina en su fondo y dos tubos conteniendo electrodos de una batería.

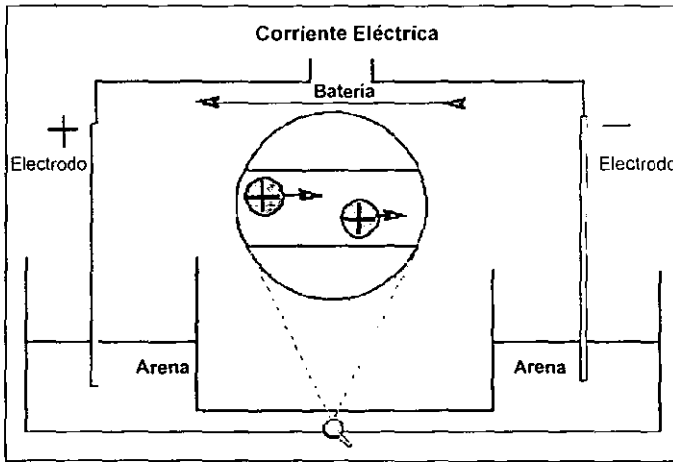


FIGURA 1. EXPERIMENTO DE REUSS

El paso de la corriente produce un enturbiamiento en las proximidades del polo positivo producido por la migración<sup>4</sup> de partículas de arena muy pequeñas que se movilizan por su carga eléctrica negativa. Este experimento puede ser considerado como el primer aporte bibliográfico que revela la polarización de la sílice, pues la arena es dióxido de silicio y fundida permite obtener los capilares que se emplean en la electroforesis capilar.

Varios años más tarde, en 1816, fue observado el transporte del agua por acción de la corriente generada por la polarización negativa del capilar que une los dos recipientes electrodoicos. En 1897 Kohlrausch derivó su ecuación básica de migración iónica en una solución de electrolitos. El papel y después los geles de poliacrilamida y agarosa, se

<sup>4</sup> Movimiento de iones bajo la influencia de un campo eléctrico.

emplearon en la electroforesis para tratar de disminuir la generación de calor y mejorar la disipación del mismo obteniéndose así las distintas técnicas de electroforesis de zona y electroforesis en gel. En 1899 Hardy descubre el denominado "Punto Isoeléctrico" y propone el nombre de *cataforesis* para esta técnica, que finalmente se conoce como enfoque Isoeléctrico. (Levêque, 1997, Pp.67)

En 1909 Michaelis sugiere el nombre de *electroforesis*, y hasta 1937 Anie Tiselius perfecciona un instrumento para llevar a cabo la electroforesis de zona<sup>5</sup>. Empleando un tubo en forma de "U" se añade la solución proteínica saturada, en mezcla con una solución reguladora; las proteínas migran en la solución hacia uno de los electrodos, dependiendo de la carga eléctrica que posean, cuando se pasa una corriente a través de la solución. Tiselius encontró que los componentes de la muestra habían migrado en una dirección y proporción determinada por su carga y movilidad; por este trabajo fue galardonado con el premio Nobel en 1948.

Sin embargo, la eficiencia de la separación en solución libre, se ve limitada porque al aplicar energía se calienta el sistema y se obtienen resultados que no son reproducibles, por ello, se ha realizado en medios anti-convectivos<sup>6</sup>, tales como geles de poliacrilamida o de agarosa. Aunque la electroforesis en geles que disipan el calor es la técnica de separación más extensamente usada, todavía en esta época sufría de tiempos de análisis largos, bajos rendimientos, y serias dificultades en la detección, el análisis cuantitativo y la automatización.

En los años que siguieron, las separaciones electroforéticas, por las razones anteriores, fueron la piedra angular de gran parte de la investigación de químicos y biólogos moleculares relacionados con la separación y análisis de proteínas, polinucleótidos y otros biopolímeros. Estas separaciones son muy eficientes y de una

---

<sup>5</sup> Éste término se le da porque los analitos se separan en zonas discretas a distintas velocidades dependiendo de su carga y su masa.

extensa aplicación pero; desafortunadamente, son técnicas lentas y laboriosas que tienen tendencia a ser poco reproducibles.

Una alternativa a los medios disipadores de calor que separaban las moléculas por tamaño molecular, fue la idea innovadora de utilizar capilares, de diámetro muy pequeño y que giraban en su propio eje para ser enfriados. El trabajo inicial en lo que hoy se conoce mundialmente como electroforesis capilar en tubo abierto fue descrito por Hjertén en 1967; él usaba un tubo de cristal con un diámetro interno de 1-3 mm y la capa interna recubierta de metilcelulosa para prevenir el denominado flujo electroosmótico o electroósmosis<sup>7</sup> (en una sección posterior ahondaremos en este término y lo que implica).

Posteriormente Virtanen en 1974 hizo una publicación sobre electroforesis de zona en tubos de cristal de 200-500  $\mu\text{m}$ ; y en 1979 Mikkers, Everaerts y Verheggen, realizaron electroforesis en tubos capilares de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  de diámetro interno hechos de cristal y de teflón respectivamente. En 1981 Jorgenson y Lukacs realizaron separaciones electroforéticas usando tubos capilares de 75 $\mu\text{m}$  de sílice fundida; así, popularizaron el uso de la electroforesis capilar, ofreciendo la posibilidad de automatizar equipos analíticos, tiempos cortos en el análisis y detección en líneas de separación de picos. El uso de capilares mejora en mucho la disipación del calor generado al aplicarse un cierto potencial o corriente al sistema, permitiendo así aumentar el potencial aplicado sin generar problemas de sobrecalentamiento o irreproducibilidad.

Otro paso significativo en el desarrollo de la electroforesis capilar fue realizado por Terabe y colaboradores en 1984; ellos desarrollaron la denominada Cromatografía

---

<sup>6</sup> Son sustancias que presentan una estructura microporosa, normalmente se utilizan geles porque ayudan a la disipación del calor generado en el sistema electroforético.

<sup>7</sup> Es el flujo del líquido que origina la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto con la superficie sólida cargada.

Electrocinética Micelar, la cual involucra la adición de surfactantes al electrolito soporte (también llamado sistema amortiguador o búfer), para formar micelas y así permitir la separación de sustancias neutras y aumentar la resolución de otros compuestos. (Sam F. y Li. , 1993, Pp. 1-7)

Desde entonces la Electroforesis Capilar ha crecido rápidamente como técnica analítica. En nuestros días se aplica a una amplia gama de problemas de separación, y ha experimentado un gran desarrollo en los últimos doce años. Esta técnica se caracteriza por su alta eficiencia de separación , así como su rapidez, así como, por el bajo consumo de reactivos y disolventes orgánicos. Estos factores son muy importantes ya que influyen sobre la productividad y el costo de los análisis. Las diferentes variantes de la EC<sup>8</sup> permiten resolver gran variedad de problemas analíticos, para determinar una gran variedad de moléculas, como se describe en el capítulo 6. (Fanali, 1990, Pp.693-702)

---

<sup>8</sup> Abreviatura que significa Electroforesis Capilar

# CAPÍTULO 2

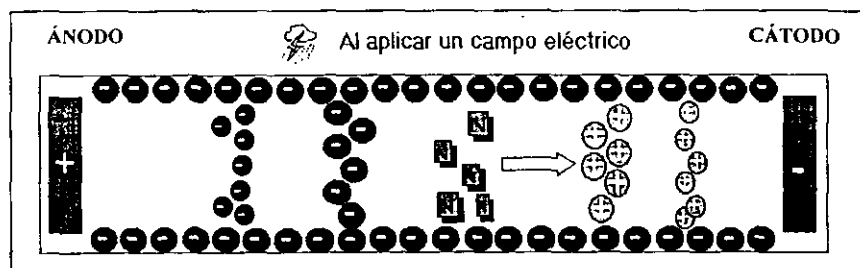
# GENERALIDADES

## 2. GENERALIDADES

Durante muchos años, las técnicas electroforéticas se realizaron en geles hidrofílicos y otros medios de soporte, pero en los últimos años se han llevado a cabo en capilares de sílice fundida de solo unas cuantas micras de diámetro interno, y se ha determinado su gran utilidad en la separación de diversas sustancias, especialmente macromoléculas. A fin de seguir un orden lógico y comprensible, primero se describe en que consiste el proceso electroforético en general y posteriormente la Electroforesis Capilar y sus ventajas.

### 2.1 PROCESO ELECTROFORÉTICO:

Es el fenómeno que se lleva a cabo cuando en un sistema dado, las especies cargadas (iones) se mueven y separan bajo la influencia de un campo eléctrico en función de su distinta velocidad de migración. Las partes básicas de dicho sistema son un par de electrodos, una fuente de poder y un medio conductor. La electroforesis clásica se ha utilizado tradicionalmente para analizar y purificar biopolímeros, sin embargo los métodos de separación para esta clase de compuestos son generalmente lentos y requieren intenso trabajo. (Marina, 1994, Pp. 1411-1433; Skoog, 1994, Pp. 785)



ESQUEMA 1. PROCESO DE SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA.

## 2.2. ELECTROFORESIS CAPILAR

La Electroforesis realizada en tubos capilares ha aumentado el interés en esta técnica analítica, mejorando realmente la modalidad clásica de electroforesis, cambiando largos tiempos de análisis, baja eficiencia y demás dificultades por alta eficiencia, cortos tiempos de análisis, etc., ampliado increíblemente el campo de aplicación de esta técnica.

La electroforesis se ha realizado en tubos capilares y ha aumentado el interés desde un punto de vista analítico. Sus principales ventajas son alta resolución, alta eficiencia de separación, corto tiempo de análisis, pequeñas cantidades de muestra y separación de un sinnúmero de compuestos, y una gama de mecanismos que proporcionan una separación selectiva. La EC se asemeja a las técnicas electroanalíticas de separación en las que las variables electrolíticas son decisivas en el proceso separativo, no obstante existe una diferencia fundamental, ya que no se produce electrólisis, pues los electrodos están suficientemente separados.

Esta nueva técnica electroforética, Electroforesis Capilar (EC), Electroforesis Capilar de Zona (ECZ) o en ocasiones Electroforesis Capilar de Alta Resolución (ECAR o HPCE<sup>9</sup>). Es importante hacer notar que aunque superficialmente este método se parece a la CLAR o HPLC<sup>10</sup>), la mayoría de los diversos tipos de EC no son cromatográficos, debido a que las separaciones dependen de las diferencias entre las propiedades eléctricas de los analitos más que de las diferencias en la forma en que se distribuyen entre una fase móvil y una estacionaria. En EC, los componentes de una mezcla se transportan a través de un tubo capilar dispuesto horizontalmente (parcialmente enrollado) por efecto de un elevado potencial de corriente continua que se aplica a lo largo de la longitud del tubo. (Skoog, 1994, Pp. 785)

<sup>9</sup> Por sus siglas en inglés *High Performance Capillary Electrophoresis*

<sup>10</sup> En español Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, en inglés *High Performance Liquid chromatography*



El mecanismo de separación en la EC es el mismo de la electroforesis convencional. La migración diferencial dentro de zonas discretas es debido a diferencias en las movilidades electroforéticas, las cuales a su vez están vinculadas a la relación masa/carga y a la conformación de los analitos. Esta técnica consiste en introducir en un capilar una mezcla de especies (cargadas o neutras), que se separan en función de su carga y su movilidad iónica en el medio en el que se encuentren bajo la influencia de un campo eléctrico.

Un sistema de EC consiste básicamente en las siguientes unidades, como se muestra en la figura 2:

- Electrodos (ánodo y cátodo)
- Depósito (viales) donde se colocan los electrodos respectivamente
- Capilar (compartimiento de la separación)
- Un sistema de enfriamiento capilar (típicamente en la forma de convección de aire forzado o de líquido)
- Un sistema de inyección y,
- Un detector

Nota: En el capítulo 5 (Instrumentación) explicaremos detalladamente dichas partes.

El capilar de separación se llena con electrolito soporte (usualmente búfer<sup>11</sup>) y se coloca entre dos depósitos que también lo contengan; los electrodos son conectados a una fuente de poder, que genera hasta 30 kV, y se sumergen en los depósitos por separado. La inyección de una muestra se realiza substituyendo un depósito de búfer por el contenedor (generalmente un vial) con la muestra durante este proceso. Un volumen de muestra definido es introducido en el tubo capilar, ya sea por presión o por la aplicación de un pequeño voltaje. Después se aplica una cierta cantidad de potencial (o de corriente) para realizar la separación. Las especies iónicas en la

---

<sup>11</sup> Es una solución de un ácido débil y su base conjugada en el cuál el pH se mantiene relativamente estable con la adición de otros ácidos o bases.

muestra migran con dirección y velocidad determinadas por su carga y masa; eventualmente pasan por un detector y la señal obtenida entonces se conoce como electroferograma. (Skoog, 1994, Pp. 785-787; Rivero, 1996, Pp. 3-4)

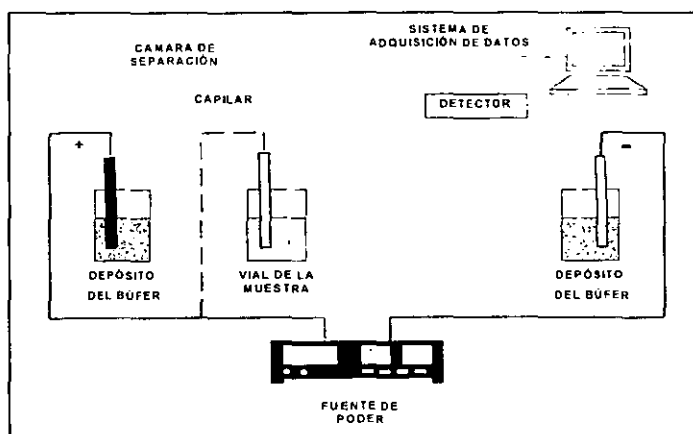


FIGURA 2. SISTEMA GENERAL DE ELECTROFORESIS.

La EC difiere de las técnicas clásicas de zona en dos aspectos:

- (1) Se realiza en capilares pequeños de un diámetro interno generalmente entre 10 y 200  $\mu\text{m}$ .
- (2) No es necesario usar un medio anticonvectivo<sup>12</sup>, aunque a veces geles sean usados como medios de tamiz.

Estas características proporcionan las siguientes ventajas:

- ↳ La disipación del calor en un tubo capilar es rápida y, por lo tanto, los cambios de temperatura generados por altos voltajes (corrientes); son muy pequeños.
- ↳ Debido a la rápida disipación del calor, es posible aumentar el voltaje aplicado y entonces disminuir considerablemente el tiempo de análisis y obtener una mejor resolución de picos.

<sup>12</sup> Los medios anticonvectivos son utilizados para disminuir la difusión térmica y ayudan a prevenir la adsorción de los analitos a las paredes del capilar.

- ◊ El tiempo del análisis es acortado también usando un detector "en línea" sobre la columna y la posibilidad de llevar a cabo el procesamiento de datos con una computadora.

### 2.3. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.

Muchas moléculas importantes en biología, tales como aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, poseen grupos ionizables y pueden tenerse en disolución en forma de especies con carga eléctrica, tanto como *cationes* (+) o como *aniones* (-). Además, las moléculas que tienen cargas similares poseen distintas relaciones *carga/masa*, debido a inherentes diferencias de peso molecular. En conjunto, estas diferencias constituyen base suficiente para una migración diferencial, cuando los iones en disolución se someten a un campo eléctrico.

Los cationes se trasladan hacia el *cátodo* (-) y los aniones hacia el *ánodo* (+) a velocidades que dependen del equilibrio entre la fuerza impulsora del campo eléctrico sobre los iones cargados de la muestra y las fuerzas de retardo entre las moléculas que migran y el medio circundante, que son principalmente fuerzas de fricción electrostáticas. El material de la muestra debe estar disuelto o suspendido en algún disolvente miscible con agua (e.g. búfer) para que tenga efecto el fenómeno electroforético. La corriente se mantiene por todo el circuito ya que los electrodos, están sumergidos en viales<sup>13</sup> que contienen búfer. Durante la separación en los electrodos se producen iones hidroxilo e hidrógeno en el cátodo, mientras que en el ánodo se forman oxígeno e iones hidrógeno como se muestra en la figura 3. (Smith, 1979, Pp. 131-143)

---

<sup>13</sup> Son depósitos o frascos pequeños, que sirven para contener al búfer o electrolito soporte.

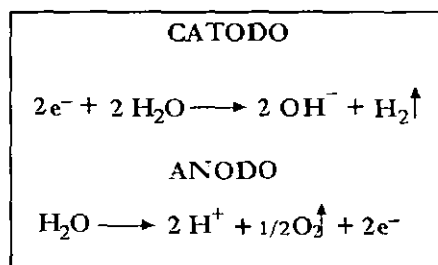


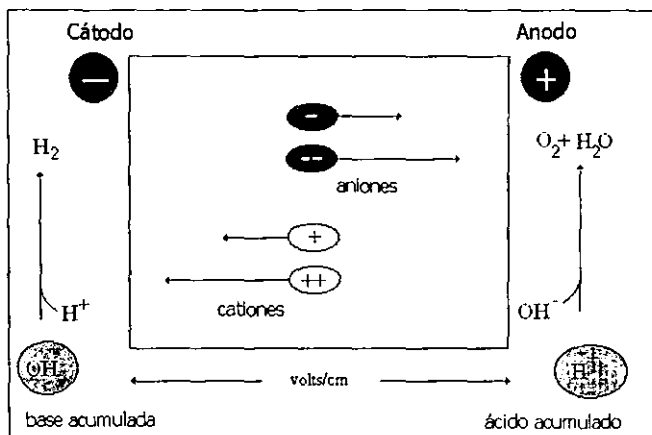
FIGURA 3. REACCIONES DE LOS ELECTRODOS

Los iones hidroxilo producidos en el cátodo incrementan la disociación del componente débilmente ácido (HA), del sistema búfer, lo que provoca la generación de iones  $A^-$ .<sup>14</sup> Por tanto la electroforesis es una forma incompleta de electrólisis. En disolución libre, hay una resistencia de fricción mínima entre los iones y la disolución, y tiene lugar una rápida migración de los iones. La versatilidad de la electroforesis para la separación de sustancias con carga eléctrica, desde pequeños iones inorgánicos hasta grandes moléculas, depende en gran parte de que se lleve a cabo sobre o en un medio de soporte inerte y relativamente homogéneo. Algunas veces puede idearse un medio que interactúe específicamente con los iones que hay que separar, para explotar así las diferencias de la relación carga/masa e introducir de este modo fuerzas de retardo especiales que convengan al análisis.

Las separaciones electroforéticas se originan por las diferentes movilidades de los analitos. La movilidad electroforética se ve afectada por la carga, la forma y tamaño del analito así como de la viscosidad del medio. Las propiedades del disolvente tales como la fuerza iónica, pH y la constante dieléctrica, también son importantes porque influyen sobre la carga efectiva del analito y, en el caso de moléculas grandes, sobre su forma y tamaño hidrodinámico.

En el Esquema No. 2 se observa cómo se da el proceso electroforético, esquematizando los iones seguidos de flechas como si fueran vectores, representando

así su velocidad de migración, es decir un catión (+) se moverá más rápidamente si su carga es mayor.



ESQUEMA 2. REPRESENTACIÓN GENERAL DEL PROCESO ELECTROFORÉTICO

## 2.4. FACTORES QUE AFECTAN A LA VELOCIDAD DE MIGRACIÓN DEL ANALITO.

### 2.4.1. LA MUESTRA.

La naturaleza de los compuestos con carga eléctrica afecta a su velocidad de migración de varias formas, como se describe a continuación.

- ✓ **Carga:** La velocidad de migración aumenta cuando hay un incremento de la carga del analito, generalmente, la magnitud de la carga depende del pH.
- ✓ **Tamaño:** La velocidad de migración es menor en las moléculas grandes, debido al incremento de las fuerzas de fricción y electrostáticas ejercidas por el medio circundante.

<sup>14</sup> Considerando que HA representa al ácido débil del búfer, y A<sup>-</sup> representa a la base conjugada del búfer.

- ✓ Forma: Las moléculas de tamaño similar pero con diferentes formas, tales como las proteínas fibrosas y las globulares, exhiben distintas características migratorias a causa de los diferentes efectos de las fuerzas de fricción y electrostáticas.

#### 2.4.2. EL MEDIO DE SOPORTE

Entiéndase como medio de soporte el material del cuál está hecho el capilar; se emplean materiales relativamente inertes. La composición específica del medio ejerce varios efectos sobre la velocidad de migración de un compuesto, y la selección de un medio determinado, depende del tipo de muestra que hay que utilizar. En la Electroforesis Clásica se han utilizado como medio de soporte papel, alúmina, lana de vidrio, almidón, agar-agar, gel de sílice y tiras de acetato de celulosa, entre otros. Actualmente se utilizan capilares hechos con sílice fundida porque posee una excelente transparencia a la radiación UV además de ser química y eléctricamente inertes, flexibles, robustos, y económicos.

##### 2.4.2.1. ELECTROÓSMOSIS.

Este fenómeno es el resultado de una carga relativa que se produce entre las moléculas del agua del búfer y de la superficie del medio de soporte. Fenómeno provocado por la carga relativa que se produce entre las moléculas del agua del búfer y de la superficie del medio de soporte, la ionización de éstos grupos generalmente produce iones oxonio ( $H_3O^+$ ), estos están cargados positivamente, por lo que al aplicar el voltaje se origina un flujo de disolvente debido al desplazamiento de los contraiones<sup>15</sup>.

Cuando el tubo capilar de separación es llenado con el electrolito, siempre se forma una doble capa en la pared interna de la superficie del capilar, debido a los grupos

---

<sup>15</sup> La mayoría de las sustancias iónicas contienen dos tipos de iones. Uno de ellos es el de interés y el otro se denomina contraión, éste es indispensable para la electroneutralidad.

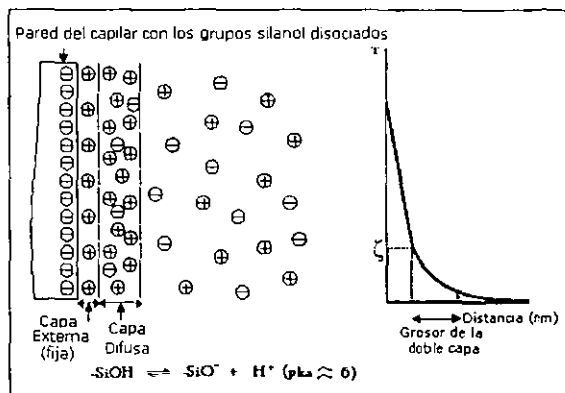
ionizables del material de la pared y/o iones adsorbidos sobre la pared del capilar. Por ejemplo, en los capilares de cuarzo, los grupos silanol presentes en la superficie de la doble capa eléctrica<sup>16</sup> fijos en la parte negativa. Una fracción de los iones forma parte de la doble capa, y siempre es fijada por las fuerzas electrostáticas cerca de la pared del capilar y las formas de la supuesta capa, el resto de esos iones forma, una capa móvil difusa.

La diferencia de potencial originada entre la pared del capilar (grupos silanol ionizados), y los contraiones del electrolito soporte, esa diferencia es el llamado potencial zeta,  $\zeta$  (en V). El potencial zeta de un compuesto cargado está en función de sus propiedades, la naturaleza y concentración del bufer, la atmósfera de contraiones y de la temperatura, el potencial zeta puede ser derivado de la teoría de la doble capa. Los valores del potencial zeta dependen fuertemente de la composición del material de la pared y de la solución del electrolito (búfer) en contacto con la pared. Comúnmente se usan capilares de cristal, sílice fundida y teflón llenos con solución de electrolitos (0.1-0.001M), el valor de potencial zeta varía en un rango de  $\pm 0.2V$ .

Esquemáticamente, si el grosor de la capa aumenta el potencial zeta también, ya que la doble flecha que muestra el gráfico del esquema 3, indica que es bidireccional, cuando se comprime la doble capa el potencial zeta disminuye.

---

<sup>16</sup> La doble capa es la región que consiste en una superficie cargada formada por los grupos silanol del capilar que son ionizados y constituyen la superficie de la sílice fundida (capa externa fija) y una región de solución con carga opuesta adyacente a la superficie formada por los iones del electrolito soporte (capa difusa), originando así una estructura de doble capa típica.



ESQUEMA 3. TEORÍA DE LA DOBLE CAPA Y POTENCIAL ZETA.

Sobre la aplicación de un campo eléctrico a través del capilar, los iones en una capa difusa se mueven hacia su respectivo electrodo, y también transportan su atmósfera de solvatación. Debido a las fuerzas de fricción entre las moléculas del solvente, este movimiento inmediatamente se extiende por el líquido entero y el perfil que resulta es casi plano.

#### 2.4.2.2. ADSORCIÓN.

Es la retención de moléculas de la muestra por parte del medio de soporte, como ocurre en la Cromatografía de Adsorción. La adsorción es la causa de la formación de una «cola» de la muestra, de suerte que está se traslada con la forma de un cometa en vez de una banda definida, con lo que se reduce la resolución de la separación. La adsorción puede también disminuir la velocidad de migración y tiende a ser mayor cuando se utiliza papel, pero puede resultar virtualmente eliminada con el empleo de acetato de celulosa como soporte, en la electroforesis clásica. (Sam F. y Li, 1999, Pp. 582)



### 2.4.3. ELECTROLITO SOPORTE (BÚFER O SISTEMA AMORTIGUADOR).

El búfer determina y estabiliza el pH del medio de soporte, por lo que afecta a la velocidad de migración de los compuestos en diversas formas.

#### 2.4.3.1. COMPOSICIÓN.

Los búferes más usados son: formiato, acetato, citrato, barbitona, fosfato, TRIS<sup>17</sup>, EDTA<sup>18</sup> y piridina. Para separar carbohidratos, con frecuencia se utiliza búfer de borato, pues tiene la ventaja de formar complejos con carga eléctrica con los carbohidratos. Dado que el búfer actúa como disolvente para la muestra, es inevitable que haya algo de difusión de la misma.

#### 2.4.3.2. CONCENTRACIÓN.

A medida que la fuerza iónica del búfer aumenta, la proporción de corriente conducida por éste crece y la participación de la muestra en dicha conducción de corriente disminuye, con lo que se reduce la velocidad de migración. Una elevada fuerza iónica del búfer incrementa la intensidad global de corriente y, consecuentemente, la producción de calor.

Con bajas fuerzas iónicas, la proporción de corriente conducida por el búfer se reducirá y la participación en la conducción de corriente por parte de la muestra crecerá, aumentando su velocidad de migración. Una fuerza iónica pequeña reduce la corriente global y se traduce en una menor producción de calor, pero la difusión y la pérdida de resolución resultantes son mayores.

Por ello, la selección de la fuerza iónica tiene que ser un compromiso, y generalmente se elige dentro de una gama de fuerzas iónicas comprendida entre 0.05-0.10 moles

<sup>17</sup> Tris (hidroximetil)amino metano.

<sup>18</sup> Ácido Etilen Diamino Tetracético conocido como EDTA

litro. La ecuación (1) es útil para obtener la fuerza iónica, a partir de la carga del analito y la concentración molar de éste.

$$\boxed{\text{Fuerza iónica} = \frac{1}{2} \sum c z^2} \quad (1)$$

Donde:  $c$  = concentración molar del analito.

$z$  = carga del analito.

### 2.4.3.3. pH.

Tiene poca influencia sobre los compuestos completamente ionizados tales como las sales inorgánicas, pero en los compuestos orgánicos el pH determina la magnitud de la ionización de los ácidos orgánicos, es decir aumenta con el pH, mientras que lo inverso ocurre con las bases orgánicas; por lo tanto, su velocidad de migración depende del pH. En compuestos tales como los aminoácidos (anfolitos), que tienen propiedades básicas y ácidas, se producen ambos efectos, ver figura 4.

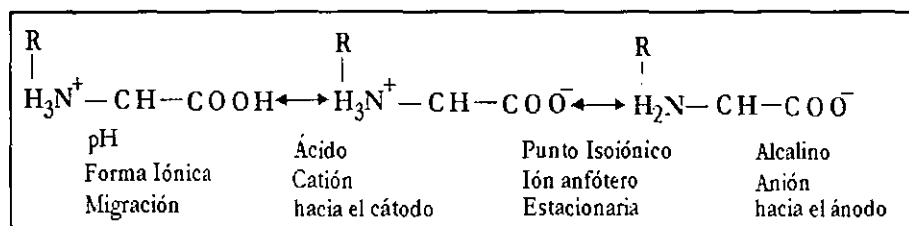


FIGURA 4. INFLUENCIA DEL pH EN LA FORMA DE UN AMINOÁCIDO O PROTEÍNA

La dirección, y también la magnitud de la migración de los anfolitos son por lo tanto, dependientes del pH, y se pueden emplear búferes que van desde un pH de 1 hasta un pH de 11 para producir las separaciones requeridas. (Smith, :979, Pp. 140-141)

#### 2.4.3.4. SELECCIÓN DEL BÚFER.

La sensibilidad del flujo electroosmótico <sup>19</sup>(FEO, sección 3.2) al pH requiere el uso de un búfer que pueda mantener un pH constante. Los sistemas efectivos de búfer tienen un rango de dos unidades de pH aproximadamente centradas alrededor del valor de pKa.

Un búfer para ser utilizado en EC debe poseer las siguientes características:

- ✓ Buena capacidad de amortiguación en el rango seleccionado.
- ✓ Baja movilidad, para minimizar la generación de corriente.
- ✓ Baja absorbancia a la longitud de onda de detección (cuando aplique). (Marina, 1994, Pp. 1411-1433; Heiger, 1997, Pp-44 -45)

#### Clasificación de los sistemas búfer:

##### Químicos.

- Citrato, rangos de pH (2.08 - 5.74)
- Acetato, rangos de pH (3.76 - 5.76)
- Fosfato, rangos de pH (1.14 - 3.14 / 6.20 - 8.20)
- Borato, rangos de pH (8.14 - 10.14)

##### Biológicos.

- MES ácido etanosulfónico-2-[N-morfolino]
- ACES ácido etanosulfónico-2-[(2-amino-2-oxoetil)amino]
- PIPES ácido Piperazina-N,N'-bis-[etanosulfónico]
- BES ácido 2-[bis-2(2-hidroxietyl)amino]etanosulfónico.
- HEPES ácido [N-2-hidroxietyl]piperazina-N'-2-etanosulfónico]
- HEPPSO ácido N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-[2-hidroxiopropanosulfónico]
- Bicina N, N-bis[2-hidroxietyl]glicina.

> TRIS Tris(hidroximetil)amino-metano. (Heiger, 1997, Pp.46)

TABLA 1. RESÚMEN DE LOS TIPOS DE BÚFER MÁS USADOS EN EC

TIPOS DE BÚFERES			
Químicos	Pka's	Biológicos	Pka's
Citrato	3.06, 4.74, 5.40	MES	6.15
Acetato	4.75	ACES	6.90
Fosfato	2.12, 7.21, 12.32	TRIS	8.30
Borato	9.24	HEPES	7.55
		Tricina	8.15

#### 2.4.4. EL CAMPO ELÉCTRICO.

La ley de Ohm establece la relación entre la intensidad de la corriente  $I$  (en amperios), el voltaje  $E$  (en voltios) y la resistencia  $R$  (en ohmios), de acuerdo a la ecuación 2:

$$I = \frac{E}{R} \quad (2)$$

La separación de iones en un campo eléctrico está, por lo tanto, influida por estos tres factores.

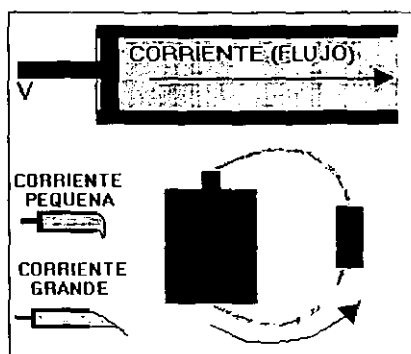
##### 2.4.4.1. INTENSIDAD DE CORRIENTE.

Entre los electrodos la corriente en la disolución es conducida completamente por los iones del búfer y de la muestra; por lo que la velocidad de migración es proporcional a la intensidad de corriente. La distancia recorrida por los iones será proporcional al

<sup>19</sup> Es el flujo del líquido que origina la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto con la superficie sólida cargada.

periodo de tiempo durante el cuál se ha suministrado la corriente, como se observa en el esquema No. 4.

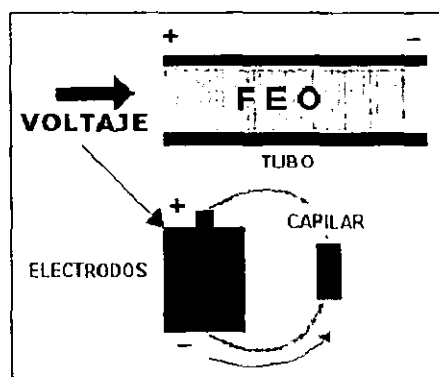
Por tanto, para asegurar una reproducibilidad máxima, la corriente debe mantenerse constante durante la electroforesis, es decir, debe utilizarse corriente continua.



ESQUEMA 4. CORRIENTE DE FLUJO EN EC.

#### 2.4.4.2. VOLTAJE.

El voltaje regula la corriente y, por lo tanto, la velocidad de migración es proporcional a la diferencia de potencial existente en el medio de soporte. El gradiente de voltaje generalmente es expresado como  $V\text{ cm}^{-1}$  (voltaje aplicado dividido por la longitud del medio de soporte). Los voltajes que se utilizan pueden ser bajos (100-500V) o elevados (500-30,000V), con gradientes hasta de 20 y 200V  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Los voltajes altos se utilizan, principalmente, para la separación de compuestos de bajo peso molecular. Bajo ciertas condiciones de voltaje, todos los analitos son transportados al cátodo por el flujo electroosmótico, pero la rapidez con que migran las moléculas varían de acuerdo a su carga; el FEO se desplaza a lo largo del capilar hasta llegar al cátodo (-), comparándolo con un circuito normal como se muestra en el esquema 5.



ESQUEMA 5. DESPLAZAMIENTO DEL FEO

#### 2.4.4.3. RESISTENCIA.

La velocidad de migración es inversamente proporcional a la resistencia, la cual depende del tipo y tamaño de medio de soporte y de la fuerza iónica del búfer. La resistencia aumenta con la longitud del medio de soporte, y disminuye con la anchura de éste y con el aumento de concentración iónica del búfer. Durante la electroforesis se produce calor en una cantidad igual a  $I^2 R$  voltios, y la resistencia disminuye cuando la temperatura aumenta.

En consecuencia, si el voltaje permanece constante, este calentamiento producirá un aumento de la corriente y un incremento de la evaporación del solvente del medio de soporte. Para que los resultados sean tan reproducibles como sea posible, se utilizan generadores de corriente estabilizados que pueden, automáticamente, mantener un voltaje constante o una corriente constante a pesar de los inevitables cambios de resistencia debidos a fluctuaciones de la temperatura. (Heiger, 1997, Pp. 37-43; [Http://webhome.idirect.com/~jadams/electronics/ohm.html](http://webhome.idirect.com/~jadams/electronics/ohm.html), Marzo 12, 2001)

## 2.5. PRINCIPALES VENTAJAS DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR

La implementación de la Electroforesis en tubos capilares en los últimos años ha aumentado el interés en esta técnica analítica, mejorando realmente la modalidad clásica de electroforesis e introduciendo sistemas completamente automatizados. Una nueva etapa en la vida de los científicos ha comenzado con el resurgimiento de esta técnica.

- 1) La disipación del calor en el tubo capilar es buena y, por lo tanto, los cambios de temperatura son muy pequeños y los resultados presentan mayor reproducibilidad<sup>20</sup>.
- 2) Dada la rápida disipación del calor, es posible utilizar voltajes muy altos (hasta de 30 kV), lo cual disminuye los tiempos de análisis y aumenta la resolución<sup>21</sup> entre los picos.
- 3) El gasto en disolventes, aditivos y demás reactivos es mínimo, de ahí sus bajos costos y los casi nulos daños al medio ambiente.
- 4) La cantidad de muestra necesaria se reduce a unos cuantos microlitros<sup>22</sup>.
- 5) El valor de cada capilar es insignificante en comparación con el de una columna cromatográfica u otra columna en general.
- 6) Se pueden utilizar una gran variedad de detectores tanto "en línea" o "fuera de línea" o bien varios a la vez.
- 7) Se cuenta con equipos completamente automatizados que permiten analizar más de 100 muestras sin necesidad de atención en el equipo.
- 8) Es posible acoplar los equipos de electroforesis capilar a otros equipos analíticos.

---

<sup>20</sup> Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes. Esto se refiere a los resultados de estudios entre diferentes analistas, en diferentes días en el mismo laboratorio o en distinto laboratorio.

<sup>21</sup> Es la diferencia en retención de picos adyacentes, dividida por su promedio del ancho del pico.

<sup>22</sup> El prefijo micro se refiere a que las unidades se consideran 1E-6 Litros.

# CAPÍTULO 3

## PRINCIPIOS DE SEPARACIÓN



### 3. PRINCIPIOS DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA

#### 3.1. MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA.

La separación electroforética esta basada en las diferencias de velocidad de los analitos en presencia de un campo eléctrico. (Heiger, 1997, Pp. 13-14; Marina, 1994, Pp. 1411-1433) La velocidad de un analito<sup>23</sup>, cuando ningún flujo electroosmótico está presente puede ser dado por la ecuación (3):

$$v = \mu E \quad (3)$$

Donde:  $v$  = la velocidad del analito  
 $\mu$  = la movilidad electroforética  
 $E$  = campo eléctrico

El campo eléctrico es una simple función de la aplicación del voltaje y la longitud del capilar (voltios/cm). La movilidad electroforética<sup>24</sup> depende de: la especie iónica, tamaño, carga, temperatura, naturaleza y concentración del analito, que se muestra en la figura 5.

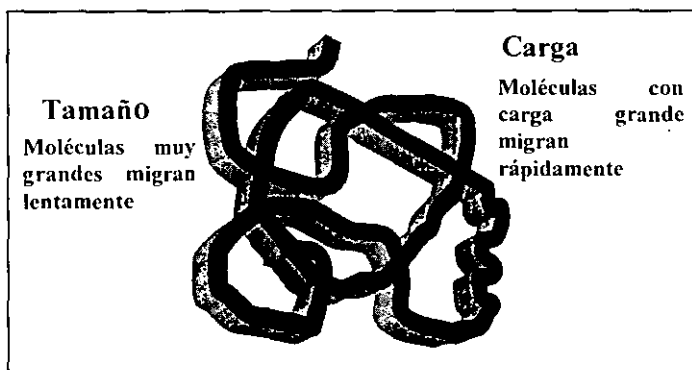


FIGURA 5. REPRESENTACIÓN DE UNA MACROMOLÉCULA.

<sup>23</sup> Compuesto químico a ser caracterizado o cuantificado en una muestra.

<sup>24</sup> Es la movilidad de las moléculas en solución bajo la influencia de un campo eléctrico.

De la ecuación (4) es evidente que especies o analitos cargados y pequeños tienen alta movilidad, mientras que especies cargadas con gran peso molecular muestran baja movilidad.

$$\mu = \frac{q}{6 \pi r \eta} \quad (4)$$

Donde :

$\mu$  = la movilidad electroforética del analito

$q$  = carga del analito

$\eta$  = viscosidad de la solución

$r$  = radio molecular

### 3.2. FLUJO ELECTROOSMÓTICO

Un constituyente fundamental de la Electroforesis Capilar es el llamado Flujo Electroosmótico FEO. El flujo electroosmótico es el flujo que origina la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto con una superficie sólida cargada. Por ejemplo, en un capilar de sílice fundida, la interfase se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito soporte, la superficie del sólido está con carga negativa debido a la ionización del grupo silanol (a pH mayor de 7-8) y conjuntamente con sus contraiones forman una doble capa eléctrica<sup>25</sup>.

(<http://www.ceandec.com/>, Marzo 12, 2001;

[http://www.ce.vt.edu/program\\_areas/environmental/teach/smprimer/icpms/icpms.html](http://www.ce.vt.edu/program_areas/environmental/teach/smprimer/icpms/icpms.html), Marzo 14, 2001;

<http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/cromal/html>, Marzo 12, 2001; Heiger, 1997, Pp. 15-

16)

---

<sup>25</sup> Región heterogénea que consiste en una superficie cargada y una región de solución con carga opuesta adyacente a la superficie

Los iones presentes en el sistema (incluyendo a los contraiones de los grupos silanol,  $H^+$ ) bajo la influencia del voltaje aplicado son desplazados hacia el cátodo o ánodo de acuerdo a su carga y arrastrando solvente con ellos dada su solvatación, originando así el denominado flujo electroosmótico.

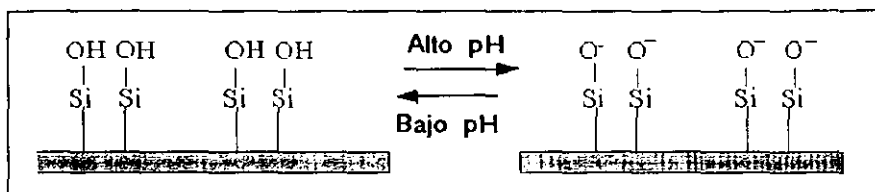


FIGURA 6. REPRESENTACIÓN DE LOS GRUPOS SILANOL EN EL CAPILAR DE SÍLICE FUNDIDA, DE ACUERDO AL pH

Bajo condiciones alcalinas la superficie del sólido posee un exceso de cargas negativas. Esto puede resultar de la ionización de la superficie (equilibrio ácido-base) y/o de la adsorción<sup>26</sup> de las especies iónicas a la superficie. Para la sílice fundida probablemente ocurren ambos procesos, aunque el FEO se controla más por el gran número de grupos silanol ( $SiOH$ ) que pueden existir en forma aniónica ( $SiO^-$ ). Aunque el punto isoelectrico exacto de la sílice fundida es difícil de determinar, se sabe que el FEO llega a ser significativo a pH mayor de 4. Los materiales no iónicos como el teflón exhiben también FEO, se presume que resulta de la adsorción de aniones. (Foret F., 1993, Pp.7-35, Heiger, 1997, Pp. 16-18; Marina, 1994, Pp. 1411-1433)

Los contraiones (en la mayoría de los casos cationes), los cuáles se localizan cerca de la superficie para mantener el balance de la carga, forman la doble capa y crean una diferencia de potencial muy cerrada a la pared. (Heiger, 1997, Pp. 16-18)

<sup>26</sup> Es el proceso de interacción entre el analito y la superficie de un adsorbente. Las fuerzas involucradas pueden ser fuertes (por ejemplo, los puentes de hidrógeno) o débiles (fuerzas de Van Der Waals).

Esta diferencia de potencial a través de la doble capa es denominada potencial zeta,  $\zeta$  dado por la ecuación (5):

$$\zeta = \frac{4\pi\eta\mu_{eo}}{\epsilon} \quad (5)$$

Donde:

$\eta$  = viscosidad del medio

$\epsilon$  = constante dieléctrica del medio

$\mu_{eo}$  = coeficiente de flujo electroosmótico

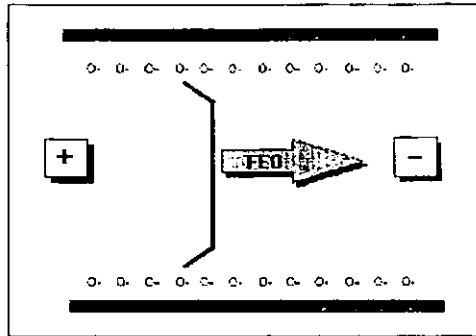
mientras que la velocidad lineal del flujo electroosmótico está dada por la siguiente ecuación:

$$v_{eo} = \frac{\epsilon E \zeta}{4\pi\eta} \quad (6)$$

El potencial zeta es determinado esencialmente por la carga de la superficie de la pared del capilar. Esta carga depende fuertemente del pH y entonces la magnitud del FEO varía con el pH. A un valor alto de pH, donde los grupos silanol están predominantemente desprotonados, el FEO es significativamente tan grande como a valores de pH muy bajos donde llegan a estar protonados. Dependiendo de las condiciones específicas, el FEO puede variar más en un orden de magnitud entre pH 2 y 12. (Heiger, 1997. Pp. 16-18)

El potencial zeta también depende de la fuerza iónica del búfer, como la teoría de la doble capa explica. El incremento de la fuerza iónica comprime la doble capa, originando disminución del potencial zeta, y del FEO.

Una característica única del FEO es que posee un perfil del flujo casi plano, en lugar de parabólico como es el caso cuando se impulsa un líquido a través de un tubo por presión hidrostática. (<http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/croma1/html>, Marzo 12, 2001; <http://www.ceandec.com/>, Marzo 12, 2001:)



ESQUEMA 6. FLUJO ELECTROSMÓTICO, BAJO UN CAMPO ELÉCTRICO

Manejando la fuerza de flujo uniformemente distribuida a lo largo del capilar (en las paredes) no hay gota de presión dentro del capilar y el flujo es uniforme. El perfil plano del flujo es benéfico porque no contribuye directamente a la dispersión de zonas del analito. El perfil de flujo y la proporción son generalmente independientes del diámetro del capilar. (Foret F., 1993, Pp.7-35, Heiger, 1997, Pp. --; Marina, 1994, Pp. 1411-1433)

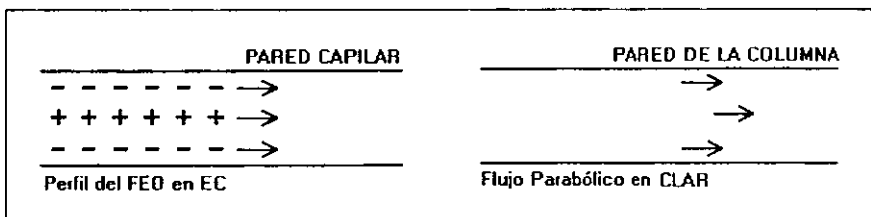


FIGURA 7. PERFIL DE FLUJO EN EC Y CLAR

Es importante señalar que el FEO puede modificar la migración<sup>27</sup> de los iones. Como se muestra en la tabla 2, los cationes son impulsados por el FEO a mayor velocidad: (<http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/croma1/html>, Marzo 12, 2001. <http://www.ceandec.com/>, Marzo 12, 2001)

<sup>27</sup> Movimiento de iones bajo la influencia de un campo eléctrico.

Si, por otra parte la especie se mueve en contra del FEO su velocidad disminuye. Una especie no cargada se moverá a la velocidad del flujo electroosmótico, este hecho es utilizado experimentalmente para determinar la velocidad del FEO en un sistema dado.

TABLA 2. VELOCIDAD RELATIVA DEL ANALITO

CARGA	TIPO DE ANALITO	VELOCIDAD RELATIVA DE MIGRACIÓN *
-	Anión monovalente pequeño	4
-	Anión monovalente grande	3
=	Anión divalente pequeño	2
=	Anión divalente grande	1
o	Molécula pequeña neutra	6
o	Molécula grande neutra	5
+	Catión monovalente pequeño	8
+	Catión monovalente grande	7
++	Catión divalente pequeño	10
++	Catión divalente grande	9

\* A mayor valor, más rápido se moverá el analito.

Un beneficio del FEO es provocar movimiento a todas las especies, prescindiendo de la carga, en la misma dirección. Bajo condiciones normales cuando la superficie del capilar esta cargada negativamente, el flujo va del ánodo al cátodo. Los cationes fluirán rápidamente hacia el cátodo dependiendo de la magnitud del flujo y puede ser en un orden mayor a sus movilidades electroforéticas. Por otro lado, los aniones tratarán de migrar hacia el ánodo pero si el FEO es mayor que su movilidad electroforética pueden ser arrastrados hacia el cátodo. Así, los cationes, neutrales y aniones, pueden ser separados y analizados en una corrida individual, ya que todos "migran" en la misma dirección.

Los cationes migran más rápidamente hacia el cátodo porque el FEO va en la misma dirección, mientras los neutros son acarreados a la velocidad del FEO pero no son separados, y los aniones migran más lento ya que ellos son atraídos hacia el ánodo pero son acarreados por el flujo electroosmótico hacia el cátodo. La modificación de la carga de la pared del capilar puede disminuir el FEO dejando la movilidad del analito

no afectada. En estas circunstancias los aniones y cationes pueden migrar en direcciones opuestas. (Foret F., 1993, Pp.7-35, Heiger, 1997, Pp. 16-18; Marina, 1994, Pp. 1411-1433)

En caso de pequeños iones (como sodio, potasio, cloro) la magnitud del FEO usualmente no es más grande que las movilidades del analito.

### 3.3 MOVILIDAD APARENTE Y TIEMPO DE MIGRACIÓN.

El tiempo requerido por un analito para migrar hasta el punto de detección es llamado "tiempo de migración" y esta dado por el cociente de la distancia y la velocidad de migración. (Claessens, 1995, Pp16) El tiempo de migración y otros parámetros experimentales pueden ser utilizados para calcular la movilidad aparente del analito, mediante la siguiente ecuación :

$$\mu_a = \frac{l}{tE} = \frac{lV}{tV} \quad (7)$$

Donde:  $\mu_a = \mu_e + \mu_{eo}$

$V$  = voltaje aplicado

$l$  = longitud efectiva del capilar (al detector)

$L$  = longitud total del capilar

$T$  = tiempo de migración

$E$  = campo eléctrico

En presencia del FEO la movilidad medida es llamada movilidad aparente,  $\mu_a$  La movilidad efectiva,  $\mu_e$ , es la movilidad del analito independiente de las condiciones experimentales y puede ser calculada de la movilidad aparente midiendo independientemente el FEO, usando un marcador neutral que se mueve a una velocidad igual a la del FEO.

La longitud efectiva es la distancia entre el punto de inyección y el punto de detección. Para la detección espectrofotométrica sobre el capilar, ésta longitud es

típicamente de 5-10 cm más corta a la longitud total. (Claessens, 1995, Pp16-17; Heiger, 1997, Pp. 22-24)

### 3.4. REPRODUCIBILIDAD<sup>28</sup>, TIEMPO DE MIGRACIÓN Y MOVILIDAD.

Se pueden obtener buenos valores en los tiempos de migración y en la movilidad: es decir menores a 0.5% DER (desviación estándar<sup>29</sup> relativa). Este valor depende de la condición de la pared capilar, de la composición, del pH y de la viscosidad del búfer, la naturaleza de la muestra, así como la calidad de la instrumentación

#### 3.4.1 FACTORES QUE AFECTAN LA REPRODUCIBILIDAD DEL TIEMPO DE MIGRACIÓN.

El cálculo de la movilidad y el uso de un estándar interno puede mejorar la reproducibilidad del tiempo de migración. Las variaciones en la temperatura, la interacción del búfer con la superficie (del capilar que esta en equilibrio), los cambios en la composición del búfer o la concentración pueden alterar el FEO pero generalmente no afectan la selectividad.

En la tabla No. 3 se presentan los factores que afectan a la reproducibilidad del tiempo de migración, un factor muy importante que presenta las desviaciones más grandes en las separaciones electroforéticas (Claessens, 1995 Pp16; Heiger, 1997, Pp. 22-24; Marino, 1994, Pp. 1411-1433)

---

<sup>28</sup> Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes. Esto se refiere a los resultados de estudios entre diferentes analistas, en diferentes días en el mismo laboratorio o diferente laboratorio.

<sup>29</sup> Definida como la raíz cuadrada de la suma de desviaciones cuadradas dividida por el número de muestras menos uno.



Tabla 3 FACTORES QUE AFECTAN UNA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA

FACTOR	EFEECTO	SOLUCIÓN
CAMBIOS DE TEMPERATURA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cambios en la viscosidad y el FEO</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Termorreguladores capilares</li> </ul>
ADSORCIÓN A LAS PAREDES CAPILARES	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cambios del FEO, causados por el búfer, aditivos o adsorción de la muestra.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recubrir el capilar permanente o dinámicamente</li> </ul>
CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DEL BÚFER	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cambios de pH debido a la electrólisis</li> <li>• Evaporación del Búfer</li> <li>• Cambios de corriente o voltaje</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tapar los frascos de búfer fresco en el carrusel</li> <li>• Usar viales de separación para colectar las soluciones</li> <li>• Primero se lava el capilar con el búfer de separación.</li> </ul>
CARGA DISTINTA DE LOS GRUPOS SILANOL	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Causada por el acondicionamiento del capilar, empleando un bajo o alto pH del búfer, origina un FEO inestable.</li> <li>• Diferente carga en la pared y variaciones del FEO</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evitar las diferencias de los pH's.</li> <li>• Dejar tiempo suficiente de equilibrio</li> <li>• Medir el FEO y normalizar si es necesario</li> </ul>
BAJO NIVEL DE BÚFER EN EL VIAL	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Flujo laminar no reproducible (perfil parabólico)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mantener el mismo nivel de líquido en el vial.</li> </ul>
VARIACIONES DE VOLTAJE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cambios proporcionales en el tiempo de migración</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No es accesible</li> </ul>

El estándar interno de una u otra manera puede ser adicionado a la mezcla de la muestra o puede ser un componente de la muestra original. En ciertos casos el FEO, se observa como un pico negativo debido al desplazamiento del búfer, puede ser una referencia de uso para calcular la movilidad o para usarlo como un estándar interno.

### 3.5 FACTORES QUE AFECTAN LA EFICIENCIA<sup>30</sup>.

La dispersión en EC puede tener muchas contribuciones adicionales al ensanchamiento de picos<sup>31</sup>, siendo las más importantes el gradiente de temperatura inducido por el calor de Joule, la longitud de la inyección y las interacciones del analito con la pared del capilar. Afortunadamente, estos fenómenos son controlables.

La separación en EC esta basada en las diferencias de la movilidad de los analitos y la diferencia necesaria para resolver dos zonas depende de la longitud de las zonas. La longitud de la zona depende fuertemente del proceso de dispersión que actúa sobre las zonas. La dispersión debe ser controlada, porque aumenta la longitud de la zona y la diferencia de movilidad necesaria para realizar la separación. (Heiger, 1997, Pp. 24-26; Marina, 1994, Pp. 1411-1433)

#### 3.5.1.1 DISPERSIÓN.

La dispersión, difusión de la zona del analito, resulta de la diferencia entre las velocidades del analito y la zona, que puede ser definida como el ancho del pico en la línea base,  $W_b$ . Para un pico Gaussiano:

$$\boxed{W_b = 4\sigma} \quad (8)$$

Donde:  $\sigma$  = desviación estándar del pico (en tiempo, longitud o volumen).

La *eficiencia* se expresa de acuerdo al número de platos teóricos  $N$ , y se puede obtener de la siguiente manera:

$$\boxed{N = \left( \frac{l}{\sigma} \right)^2} \quad (9)$$

Donde:  $l$  = longitud efectiva del capilar.

---

<sup>30</sup> Término general usado para expresar el pico producido por una separación, es medida en términos de No. de platos teóricos,  $N$ .

Y puede ser relacionada con la altura equivalente del plato teórico  $H$  (*Height* en inglés), por la ecuación (10):

$$H = \left( \frac{l}{N} \right) \quad (10)$$

Bajo condiciones ideales la sola contribución del ensanchamiento de la zona del analito se puede considerar como difusión longitudinal. El ensanchamiento convectivo no es importante debido a las propiedades anticonvectivas del capilar. Así, la eficiencia se puede relacionar con la difusión molecular definida en cromatografía, resultando:

$$\sigma^2 = 2Dt = \frac{2DlL}{\mu V} \quad (11)$$

Donde:

$\sigma^2$  = difusión molecular

$D$  = coeficiente de difusión del analito

$L$  = longitud total del capilar

Sustituyendo la ecuación 11 en la 9, obtenemos la expresión electroforética fundamental del número de platos teóricos, ecuación (12).

$$N = \frac{\mu V l}{2DL} = \frac{\mu E l}{2D} \quad (12)$$

Con base a la ecuación anterior es evidente que aplicando un campo eléctrico mayor el analito consume menor tiempo en el capilar y tiene menos tiempo para difundir. Además demuestra que para moléculas grandes como proteínas y ADN, que tienen pequeños coeficientes de difusión exhibirán menor dispersión que las moléculas pequeñas.

---

<sup>11</sup> También llamado difusión longitudinal, es un fenómeno causado por el calor de Joule, las interacciones pared-

El número de platos teóricos puede ser determinado directamente del electroferograma<sup>32</sup> usando la siguiente ecuación:

$$N = 5.54 \left( \frac{t}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (13)$$

Donde:  $t$  = tiempo de migración

$W_{1/2}$  = ancho del pico a la mitad de la altura del pico.

Sin embargo esta ecuación es válida solo para picos Gaussianos y por lo mismo es menos utilizada que la ecuación 12.

### 3.5.1.1 ELECTRODISPERSIÓN.

Las diferencias de conductividad<sup>33</sup> entre la zona del analito y el búfer pueden tener tres efectos:

1. Que el pico tenga una forma sesgada.
2. Enfoque o concentración del analito (muestra de baja conductividad) o desenfoque o dispersión del analito (muestra de alta conductividad).
3. Estados isotacoforéticos<sup>34</sup> temporales debido al exceso de cierto ion (por ejemplo Cl<sup>-</sup>)

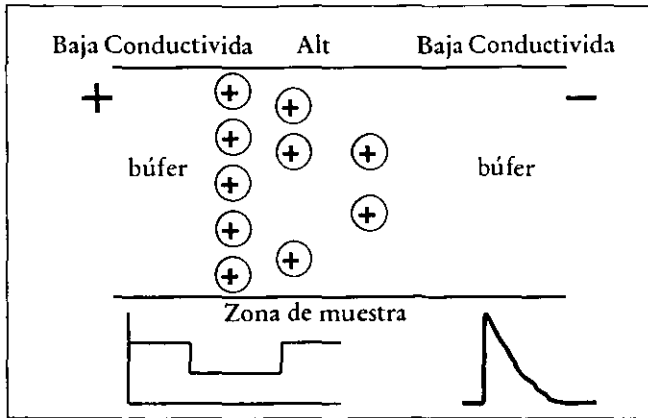
Como describe la función de *Khlausch* cuando la zona del analito tiene una movilidad más alta que la del búfer, el borde frontal de la zona del analito será difuso y el borde final se agudizará como se observa en el esquema 7.

analito, la longitud de inyección, entre otros, originando mala resolución.

<sup>32</sup> Es un gráfico en el que se representa la respuesta del detector en función del tiempo de migración.

<sup>33</sup> Es la habilidad que tiene una solución para conducir una corriente eléctrica.

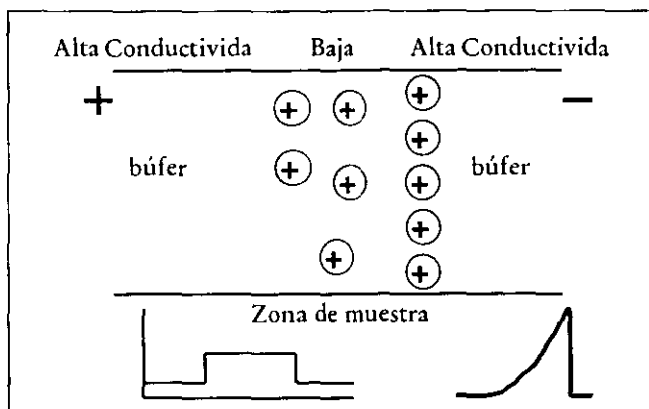
<sup>34</sup> Un estado isotacoforético, es cuando los analitos muestran velocidades de migración uniformes lo que complica la separación de la muestra.



ESQUEMA 7. ELECTRODISPERSIÓN (alta conductividad de la muestra)

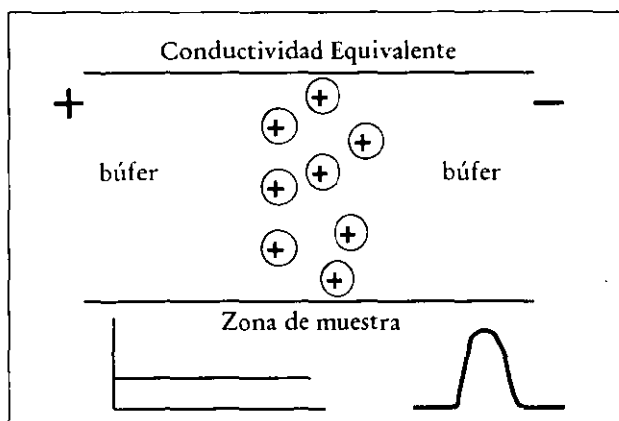
Las distorsiones en la forma de los picos son causadas por las diferencias en la conductividad, y por lo tanto en el campo de cada zona. Cuando la zona del analito tiene mayor movilidad (esto es alta conductividad y menor resistencia) que la del búfer, el frente del borde de la zona del analito, la cuál se difunde en la dirección de la migración, encuentra una caída de voltaje mayor cuando entra a la zona del búfer. Esto causa la difusión acelerada del analito (hablando de aniones, cuando el FEO va hacia el cátodo) fuera de la zona del analito, dando como resultado una zona con cabeceo. Sin embargo, cuando la zona del analito tiene menor movilidad que la del búfer, el borde frontal será agudo y el borde final será difuso.

Como los analitos en el borde final difunden hacia la zona del búfer, ellos también encuentran un incremento en la caída de voltaje pero en la misma dirección de la migración, y se aceleran de regreso hacia la zona del analito, manteniendo la orilla final aguda, como se muestra en el esquema 8.



ESQUEMA 8. ELECTRODISPERSIÓN (baja conductividad de la muestra)

Estas distorsiones siempre ocurren y pueden tener efectos pequeños con relación a otros efectos de dispersión como la difusión, sin embargo son particularmente evidentes en las muestras que contienen analitos con un amplio rango de movilidades. La forma de las distorsiones es perjudicial sólo si se pierde resolución y mientras éste fenómeno pueda ser eliminado igualando la conductividad del búfer y de la muestra, las distorsiones del pico no son frecuentemente de cuidado. Cuando la conductividad es equivalente no existen distorsiones en el pico. Las especies neutras no son afectadas por esas diferencias de conductividad ver Esquema 9. (Heiger, 1997, Pp. 36-38)



ESQUEMA 9. CONDUCTIVIDAD EQUIVALENTE

### 3.5.2 CALOR DE JOULE Y GRADIENTES DE TEMPERATURA.

La principal ventaja de llevar a cabo la separación electroforética en capilares es la reducción del efecto de calentamiento el cuál tradicionalmente limitaba a las técnicas electroforéticas. El calentamiento es un problema grave ya que provoca gradientes de temperatura no uniformes, cambios locales de viscosidad y subsecuentemente zonas de ensanchamiento. Las ecuaciones teóricas para la eficiencia y la resolución se abocan al uso de campos eléctricos altos, sin embargo el calor de Joule limita en última instancia la ventaja de este procedimiento, a pesar de las dimensiones capilares y el control de la temperatura.

El calor generado por el paso de corriente eléctrica<sup>35</sup> es llamado *Calor de Joule*. El incremento de temperatura depende del potencial generado (producto del voltaje y la corriente) y esta determinado por las dimensiones del capilar, la conductividad del búfer y el voltaje aplicado.

Temperaturas significativamente elevadas serán el resultado cuando la generación de poder eléctrico (en un rango de 0.5 a 5 W/m) exceda a la disipación. Incrementos de temperatura de 10° C no son raros y aún incrementos de 70° C o más pueden llegar a ocurrir. La excesiva elevación de la temperatura puede causar la destrucción de compuestos termolábiles, por ejemplo la desnaturalización de proteínas.

La disipación termal del calor hacia la pared del capilar conlleva a mayor temperatura en el centro que en las paredes por lo que el gradiente térmico entre el centro del capilar y los alrededores, muestran cómo la diferencia de temperatura depende del radio interno, grosor de la pared, grosor del recubrimiento de la poliimida y del coeficiente de transferencia de calor hacia los alrededores. Los gradientes de temperatura provocan que no haya homogeneidad en otros parámetros físico-químicos así como movilidades, pH, densidad, viscosidad, etc. Por lo tanto, es conveniente

utilizar capilares de diámetro interno pequeño y mayor diámetro externo, ya que los volúmenes pequeños limitan la cantidad de calor generado aún cuando se aplican varios cientos de voltios por centímetro. Además la gran proporción área superficial interna / volumen ayuda a disipar el calor generado a través de la pared del capilar. El mayor diámetro externo es una ventaja debido a la reducción de las propiedades de aislamiento del recubrimiento de polimida y al mejoramiento de la transferencia de calor a los alrededores; ver Figura 8. (Foret, 1993, Pp. 7-35; Heiger, 1997, Pp. 27-29; Marina, 1994, Pp. 1411-1433)

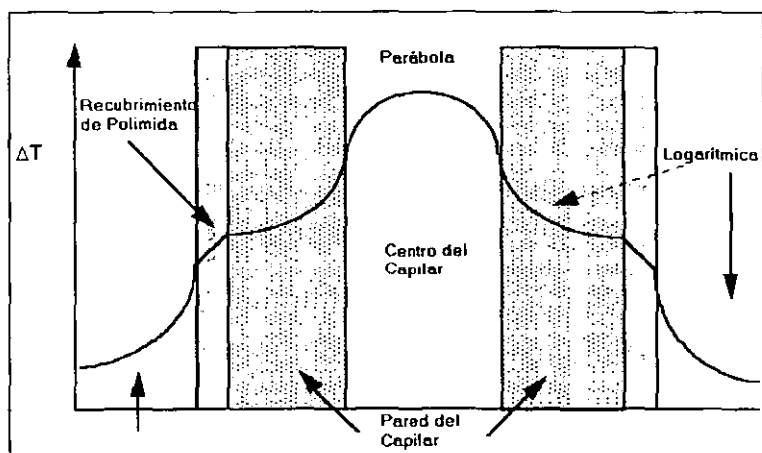


FIGURA 8. DISTRIBUCIÓN DEL CALOR DE JOULE DENTRO DEL CAPILAR

A continuación se presentan algunas estrategias para disminuir el calor de Joule, los gradientes de temperatura, y los efectos que ocasionan:

- Disminución del campo eléctrico:
  - ✓ Disminución proporcional del calor generado
  - ✓ Reducción de la eficiencia y resolución.
- Reducción del diámetro interno del capilar:
  - ✓ Disminución dramática de la corriente

<sup>35</sup> Intensidad de flujo de carga eléctrica que circula en un circuito (carga por unidad de tiempo)



- ✓ Disminución de la sensibilidad
- ✓ Puede causar un incremento en la absorción de la muestra.
- Disminución de la concentración o de la fuerza iónica del búfer.
  - ✓ Puede causar un incremento en la adsorción de la muestra.
  - ✓ Decremento proporcional en la corriente
- Control de la temperatura.
  - ✓ Regula la temperatura y elimina calor del capilar.

Una alternativa es el uso de búfer con baja movilidad, los cuáles contienen iones cargados pero menos ionizados, por ejemplo los búferes biológicos se caracterizan por tener baja conductividad y alto peso molecular, por tanto son una alternativa a usarlo como lo son: TRIS, boratos, histidina, y CAPS, (3-[ciclohexilamino]-1-propano ácido sulfónico). (<http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/croma1/html>, Marzo 12, 2001; <http://www.ceandec.com/>, Marzo 12, 2001:)

Una disminución dramática en las diferencias de temperatura es reduciendo el diámetro interno del capilar debido a la dependencia al cuadrado del área. Se han utilizado capilares con un diámetro interno tan pequeño como de 5-10 $\mu$ m. Sin embargo el diámetro interno no es práctico para el uso rutinario debido a la detección, introducción de la muestra, y dificultades de obstrucción del capilar. Diámetros internos del capilar de 25 a 50  $\mu$ m son considerados más prácticos.

Eliminar el calor de la pared externa del capilar es muy importante y se han hecho mejoramientos por el uso de sistemas de enfriamiento, los cuáles termorregulan al capilar con aire o líquido a alta velocidad. El enfriamiento líquido es más eficiente teóricamente, que el enfriamiento con aire a alta velocidad.

El control activo de la temperatura no es importante sólo para la disipación de calor sino también para mantener la temperatura del capilar constante. Del mismo modo en

ausencia del fenómeno del calor de Joule, las variaciones en el tiempo de migración pueden resultar de los cambios en la temperatura ambiente y el resultante 2 a 3% por cada 1°C por cambios en la viscosidad. (Foret F., 1993, Pp.7-35)

### 3.5.3 LONGITUD DE LA INYECCIÓN.

El término longitud de la inyección se refiere a la cantidad de muestra que es introducida en el capilar para realizar la separación electroforética. Durante la inyección es importante que la longitud de la muestra sea pequeña. Si la longitud es más larga que la dispersión provocada por la difusión, la eficiencia y la resolución son afectadas considerablemente. La contribución de la inyección al total de la varianza esta dada por:

$$\sigma_{inj}^2 = \frac{w_i^2}{12} \quad (14)$$

Donde:  $w_i$  = longitud de la inyección.

Idealmente la longitud de la muestra debe ser menor a la desviación estándar debida a la difusión,  $(2Dt)^{1/2}$ . La longitud exacta depende del coeficiente de difusión del analito y del tiempo de análisis. Un límite práctico de la longitud de la inyección es menor del 1-2% de la longitud total del capilar. Para un capilar de 70 cm un 1% corresponde a 7mm. (Heiger, 1997, Pp. 31-32)

### 3.5.4 INTERACCIONES PARED-ANALITO.

Las interacciones entre el analito y la pared del capilar son perjudiciales para el análisis, y depende del grado de interacción, del coeio del pico o aún de la adsorción total del analito. Las causas primarias de adsorción en las paredes de sílice fundida son las interacciones iónicas entre los analitos catiónicos y la pared cargada negativamente, y las interacciones hidrófobas. La gran proporción área superficial / volumen del capilar, que presenta ventajas para la transferencia de calor, de hecho

aumenta la probabilidad de adsorción. Grandes péptidos y proteínas presentan mayores efectos de adsorción puesto que poseen varias cargas y partes hidrófobas.

Hay una gran variedad de estrategias para reducir las interacciones pared-analito, entre ellas:

- ✓ Incrementar la concentración del electrolito soporte (y/o búfer),
- ✓ Usar sistemas búfer anfotéricos,
- ✓ Trabajar a valores extremos de pH (< 2 ó > 10), o bien
- ✓ Recubrir el capilar (ya sea de manera permanente o dinámicamente con algún aditivo).

Tabla 4 RESÚMEN DEL ORIGEN DE ENSANCHAMIENTO DE PICOS

ORÍGENES	COMENTARIOS
DIFUSION	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Define el límite fundamental de la eficiencia</li> <li>❖ Analitos con bajos coeficientes de difusión dan picos bien formados</li> </ul>
CALOR DE JOULE	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Siguiendo gradientes de temperatura y flujo laminar</li> </ul>
LONGITUD DE LA INYECCIÓN	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Las dificultades del límite de detección hacen necesario a menudo que la inyección de mayor longitud sea ideal.</li> </ul>
ADSORCIÓN DE LA MUESTRA	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ La interacción pared-analito del capilar usualmente provoca coleo en el pico.</li> </ul>
ELECTRODISPERSIÓN (mala conductividad de la muestra y del búfer)	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Analitos con conductividad mayor al búfer originan picos con cabeceo.</li> <li>❖ Analitos con menor conductividad que el búfer resultan en picos con coleo.</li> </ul>
VIALES DE BÚFER A DESNIVEL	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Generan flujo laminar</li> </ul>
TAMAÑO DE LA CELDA	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Debe ser relativamente pequeña en relación del ancho del pico.</li> </ul>

### 3.6 EFICIENCIA Y RESOLUCIÓN EN EC.

Por la analogía con la cromatografía es posible describir los picos en EC en términos de platos teóricos. Es posible derivar ecuaciones para predecir, la eficiencia y la resolución de la separación.

Con la presencia del FEO, la velocidad del analito puede ser expresada como:

$$v = \frac{(\mu \pm \mu_{eo})V}{L} \quad (15)$$

Donde L es la longitud total del capilar y V es el voltaje aplicado,  $\mu_{eo}$  es el coeficiente de flujo electroosmótico. El tiempo de migración de un ion (analito) puede ser expresado por:

$$t = \frac{L^2}{(\mu \pm \mu_{eo})V} \quad (16)$$

La eficiencia de separación es expresada por la siguiente ecuación:

$$N = \frac{(\mu \pm \mu_{eo})V}{2D} \quad (17)$$

o bien

$$N = \frac{\mu VI}{2DL} = \frac{\mu E l}{2D} \quad (18)$$

De acuerdo con la ecuación (17) y (18) es posible incrementar la eficiencia por el incremento del voltaje aplicado, siempre y cuando los efectos térmicos ocasionados por un alto voltaje sean despreciables. Según Gidding's la resolución ( $R_s$ ) puede ser definida como:

$$R_s = \left( \frac{N^{1/2}}{4} \right) \left( \frac{\Delta v}{v} \right) \quad (19)$$

Donde  $\Delta v / v$  es la diferencia de la velocidad relativa entre las dos zonas de los analitos. Se puede predecir la resolución entre dos zonas sustituyendo la ecuación (17) en la (19) obteniendo (20a) y (20b):

$$\Delta v = v_2 - v_1 = \frac{(\mu_2 - \mu_1)V}{L} \quad (20a)$$

$$v = \frac{(v_2 + v_1)}{2} = \frac{(\mu \pm \mu_{eo})V}{L} \quad (20b)$$

Donde  $\mu_1$  y  $\mu_2$  son la movilidad electroforética de ambos analitos y  $\mu$  es el promedio de su movilidad electroforética.

Combinando las ecuaciones 17, 18, 20a y 20b se puede obtener la siguiente ecuación:

$$Rs = 0.177 (\mu_2 - \mu_1) \left[ \frac{V}{D(\mu \pm \mu_{eo})} \right]^{1/2} \quad (21)$$

Donde  $D$  es el promedio de los coeficientes de difusión de los analitos. De hecho, una buena resolución se puede obtener para equilibrar el flujo electroosmótico enfrente de la migración electroforética, ( $\mu_{eo} = -\mu$ ). El costo de una alta resolución es un tiempo largo de análisis. Si el coeficiente del flujo electroosmótico tiene un valor absoluto más grande que las movilidades de todos los aniones, entonces todos los iones se moverán en la misma dirección. De acuerdo al orden de la elución del analito serían primero cationes, sustancias neutras, y finalmente, aniones. El flujo electroosmótico permite la automatización de la separación de especies con carga diferente que se mueven en la misma dirección permitiendo la detección simultánea; también, se ha visto que el flujo de electroosmótico puede controlar la resolución. (Marina, 1994, Pp. 1411-1433)

### 3.7 EL CONTROL DE LA RESOLUCIÓN EN EC.

Según la ecuación (21), la resolución electroforética,  $Rs$ , se compone de dos términos: el término de selectividad, dado por la diferencia de las movilidades de ambos analitos, y del término eficiencia, que depende del coeficiente de difusión, el flujo

electroforético y el voltaje. Así, la resolución puede ser influida por esos parámetros. (Heiger, 1997, Pp. 37-39)

### 3.7.1 LA TEMPERATURA.

Cuando no se tiene un control en la temperatura de los capilares, se puede ver modificada la viscosidad del búfer y por tanto tener cambios en la movilidad electroosmótica y electroforética, provocando con ello alteración en los perfiles de velocidad, y por lo tanto ensanchamiento de los picos y alturas aumentadas de plato. Así, el control de la temperatura se ha recomendado para reducir la gran dependencia en la selectividad del voltaje, la eficiencia, y la resolución que se observa en un sistema no termorregulado, mejorando así la separación y permitiendo el logro de un modelo electroforético reproducible. (Marino, 1994, Pp. 1411-1433)

### 3.7.2 FLUJO ELECTROOSMÓTICO.

El FEO afecta la cantidad de tiempo que los analitos permanecen en el capilar por la influencia del flujo sobre la movilidad del analito. Esto puede tener el efecto de alterar la longitud requerida del capilar para lograr una separación, pero aún así no afecta la selectividad. Se ha investigado la influencia del FEO en el tiempo de retención y la resolución en las separaciones de electroforesis capilar y se han propuesto procedimientos instrumentales para el control directo del flujo electroosmótico. El FEO puede ser alterado por cualquiera de los siguientes parámetros:

1. La modificación química de la pared capilar, como una alternativa para limitar la adsorción del analito.
2. El ajuste del pH del electrolito soporte o búfer.
3. Concentración del búfer.

4. Adición de surfactantes<sup>36</sup> (a concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica<sup>37</sup>), como el glicerol, etcétera, que puede actuar como agente de solubilización para analitos hidrófobos, como reactivo apareador de iones, o como modificador de pared.

5. La adición de solventes orgánicos, los cuáles disminuyen la velocidad del flujo electroosmótico.

6. La adición de selectores quirales, principalmente ciclodextrinas<sup>38</sup>.

Fundamentalmente el control del FEO requiere de la alteración de la carga de la superficie del capilar o de la viscosidad del búfer. Las condiciones que afectan la carga de la superficie de la pared del capilar pueden afectar también al analito (así como al pH del búfer).

El FEO puede ser afectado también ajustando la concentración y la fuerza iónica del búfer. Altas concentraciones de búfer son útiles pues limitan las interacciones coulombicas del analito con las paredes del capilar por decaimiento de la carga efectiva en la pared. Sin embargo, el calentamiento del capilar restringe el uso de búfer a altas concentraciones. Las concentraciones típicas de búfer están entre 10-50 mM, pero 100-500 mM y aún más altas se han utilizado. ([http://www.ce.vt.edu/program\\_areas/environmental/teach/smprimer/icpms/icpms.html](http://www.ce.vt.edu/program_areas/environmental/teach/smprimer/icpms/icpms.html), Marzo 14, 2001; <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/cromal/html>, Marzo 12, 2001; Heiger, 1997, Pp. 20-22; Marina, 1994, Pp. 1411-1433; <http://www.ceandec.com/>, Marzo 12, 2001)

---

<sup>36</sup> Son moléculas que poseen dos extremos con distinta solubilidad. Un extremo denominado cola, consiste en una larga cadena hidrocarbonada soluble en compuestos orgánicos, no polares. El otro, llamado cabeza, a menudo es una sal de sodio o potasio, soluble en agua que sirve para disminuir la tensión superficial.

<sup>37</sup> Es la concentración a la cuál comienza la formación de micelas.

<sup>38</sup> Son ciclos de oligosacáridos con 6, 7 u 8 unidades de glucosa, llamadas alfa, beta y gamma ciclodextrinas respectivamente, tienen la forma de un cono hueco, el diámetro de su cavidad está determinado por el No. de unidades de glucosa. La cavidad es relativamente hidrófoba mientras la superficie externa es hidrofílica. Son ampliamente usadas como selectores quirales.

# CAPÍTULO 4

## MODOS DE

## SEPARACIÓN



#### 4. MODOS DE SEPARACIÓN.

El corazón de la Electroforesis Capilar, es el tubo capilar, fácil de reemplazar, barato y con gran poder de disipación de calor. Generalmente se utiliza de sílice fundida con una longitud máxima de 1 metro y con diámetros internos entre los 50 y 100  $\mu\text{m}$ .

La Electroforesis Capilar es una poderosa técnica analítica para la separación, determinación y cuantificación de moléculas grandes y pequeñas. Su alta eficiencia en la separación, corto tiempo de análisis, sensibilidad, automatización y pequeñas cantidades de muestra, han permitido que sea utilizada en varias áreas tales como Química, Bioquímica Clínica y General, Biotecnología, Farmacia, Industria Alimenticia, Ambiente, Ciencias Médicas, Ciencias Veterinarias, Ciencias Forenses, etc.

La necesidad de optimizar separaciones para una gran variedad de compuestos tiene como resultado diferentes modalidades de trabajo que se han desarrollado para expandir el número de aplicaciones de esta técnica con la gran ventaja de que se pueden realizar usando el mismo equipo. Las diferentes modalidades que se trabajan hasta el momento son:

- Electroforesis Capilar de Zona (ECZ en inglés *CZE*).
- Cromatografía Capilar Electrocínética Micelar (CCEM, en inglés *MECC*).
- Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico (ECEI, en inglés *CIEF*).
- Isotacoforesis Capilar (en inglés *ITPC*).
- Electroforesis Capilar en Gel (ECG, en inglés *CGE*).
- Electro cromatografía Capilar (ECC en inglés *CEC*).

Es importante hacer notar que aunque superficialmente estos métodos se parecen a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, la mayoría de los diversos tipos de Electroforesis Capilar no son cromatográficos, debido a que las separaciones dependen de las diferencias entre las propiedades eléctricas de los analitos, más que

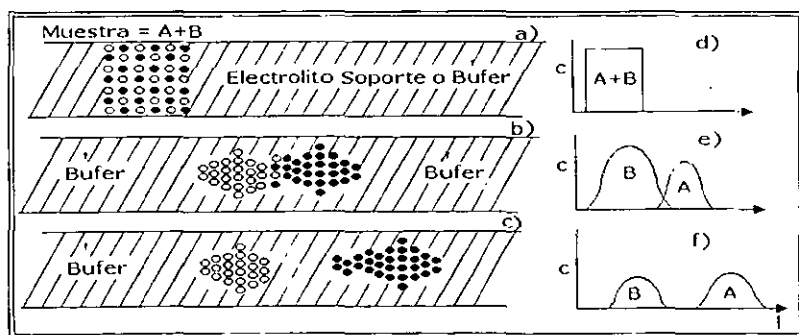
de las diferencias en la forma que se distribuyen entre una fase móvil y una estacionaria. Sin embargo, uno de los modos de EC, se basa en la distribución del analito en las fases por lo que se asemeja a un procedimiento cromatográfico.

#### 4.1. ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA.

La Electroforesis Capilar de Zona (ECZ) es por mucho la más utilizada como modo de separación, debido a la simplicidad de operación y su versatilidad.

La ECZ es la forma más simple de EC principalmente porque el capilar es llenado sólo con un electrolito soporte y la migración de los analitos se da en zonas discretas y a diferentes velocidades. La separación de mezclas con analitos aniónicos y catiónicos es posible debido a la influencia del flujo electroosmótico (FEO). Los analitos neutros no migran por sí solos, pero coeluyen en presencia del FEO.

El nombre de Electroforesis Capilar de Zona a veces confunde porque parece implicar que es el único modo en que la electroforesis es zonal. Sin embargo, la Cromatografía Electrocinética Micelar Capilar y la Electroforesis Capilar en Gel también son técnicas zonales; en contraste, la Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico esta definida como técnica de enfoque. (Heiger, 1997, Pp. 42-75)



ESQUEMA 10. ILUSTRACIÓN DE UNA SEPARACIÓN ZONAL.

El esquema 10 representa lo que sucede en la Electroforesis Capilar de Zona:

- a) El capilar se llena con el búfer o Electrolito soporte y se introduce la muestra (mezcla de analitos),
- b) Los analitos A y B se separan en base a su distinta movilidad electroforética, al aplicarse un cierto potencial eléctrico,
- c) Los analitos A y B se han separado en zonas discretas.

Los incisos d-f representan el perfil de concentración a lo largo del capilar:

- d) Es el comienzo,
- e) Durante el proceso de separación y
- f) La continuación de la migración de A y B, mostrando dispersión.

Cuando se tiene flujo electroosmótico (pH entre 4 - 12) y polaridad positiva, las especies cargadas positivamente se mueven a lo largo del capilar con una velocidad que es mayor que la del FEO, puesto que su movimiento se ve acelerado por la atracción de sus cargas al electrodo negativo. Los analitos cargados negativamente se mueven en sentido contrario y más lentamente y en contra del flujo electroosmótico debido a que son atraídos por el electrodo positivo. Los analitos neutros se mueven a través del capilar con el FEO por lo general durante éste movimiento no se produce separación entre las especies no cargadas.

Este tipo de modalidad se utiliza para separar en general compuestos de bajo peso molecular, que no sufran de adsorción en la superficie del capilar. (Heiger, 1997, Pp. 42-75; <http://chem.fsu.edu/tvickers/31seps/CZE.htm>, Marzo 22, 2001)

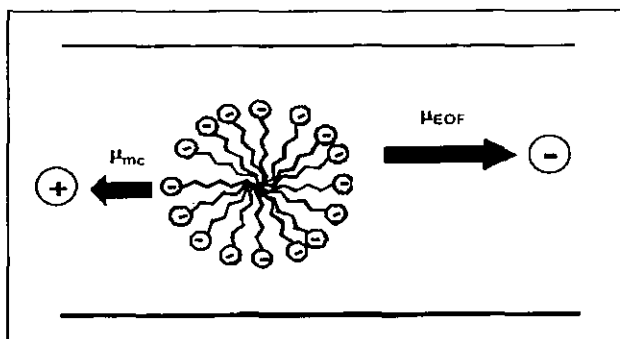
## 4.2 CROMATOGRAFÍA CAPILAR ELECTROCINÉTICA MICELAR.

La Cromatografía Electrocinética Micelar Capilar (CCEM) es un híbrido de la electroforesis y la cromatografía y fue introducida por Terabe y compañía en 1984 (Schmutz, 1994, Pp. 1295-1303) Aquí se describe una modificación del método que permite

la separación de fenoles y nitrocompuestos aromáticos de bajo peso molecular por la adición de surfactantes o tensoactivos, como el dodecil sulfato de sodio (DSS) al electrolito soporte, las micelas formadas ayudan a la separación de especies cargadas y neutras.

Generalmente a bajas concentraciones los surfactantes se presentan como monómeros. Las micelas se forman usualmente en disoluciones acuosas cuando la concentración de una especie iónica que tiene una cola de hidrocarburo de cadena larga, se aumenta hasta su concentración micelar crítica (CMC). En éste punto los iones empiezan a agregarse y forman partículas esféricas constituidas entre 40 y 100 iones cuyas colas de hidrocarburo están en el interior de la esfera, y los extremos cargados en contacto con el agua exterior.

Las micelas se constituyen como una segunda fase estable que es capaz de absorber a compuestos no polares en su interior, solubilizando de éste modo las especies no polares.



ESQUEMA 11. MIGRACIÓN DE UNA MICELA ANIÓNICA

Las micelas son caracterizadas por su naturaleza, el número de agregación (usualmente de 30-140), el punto de Kraft, la temperatura bajo la cuál se da el número

de agregación, y la conformación espacial de la organización del ensamble. (Heiger, 1997, Pp. 42-75; Sam F. y Li, 1998, Pp. 232-236; Sánchez, 2001, Pp34)

Las micelas se pueden clasificar como:

- ✓ *Micelas normales* en soluciones acuosas o polares, los extremos hidrofóbicos se dirigen al centro del agregado.
- ✓ *Micelas invertidas* en solventes no polares; la cabeza de los grupos polares es orientada al interior del agregado.

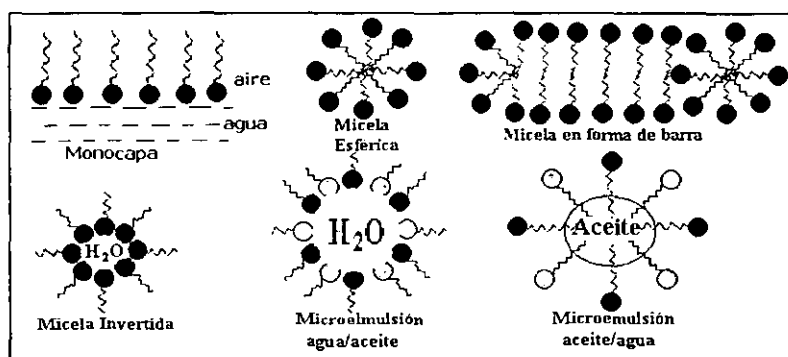


FIGURA 9 REPRESENTACIÓN DE AGREGADOS FORMADOS POR SURFACTANTES.

La formación micelar es un proceso dinámico en la escala del tiempo micro/milisegundos. Generalmente las micelas esféricas tienen diámetros entre 40-80 Å<sup>39</sup>. El número de agregación, la CMC y el tipo de organización del ensamble es fuertemente influenciado por:

- ❖ La naturaleza y concentración del surfactante
- ❖ La composición del búfer
- ❖ Los aditivos (orgánicos) en el búfer
- ❖ La Temperatura (Claessens, 1995, Pp. 101-105; Sánchez, 2001, Pp34)

<sup>39</sup> Amstrongs, unidades del orden de 1 E -18.

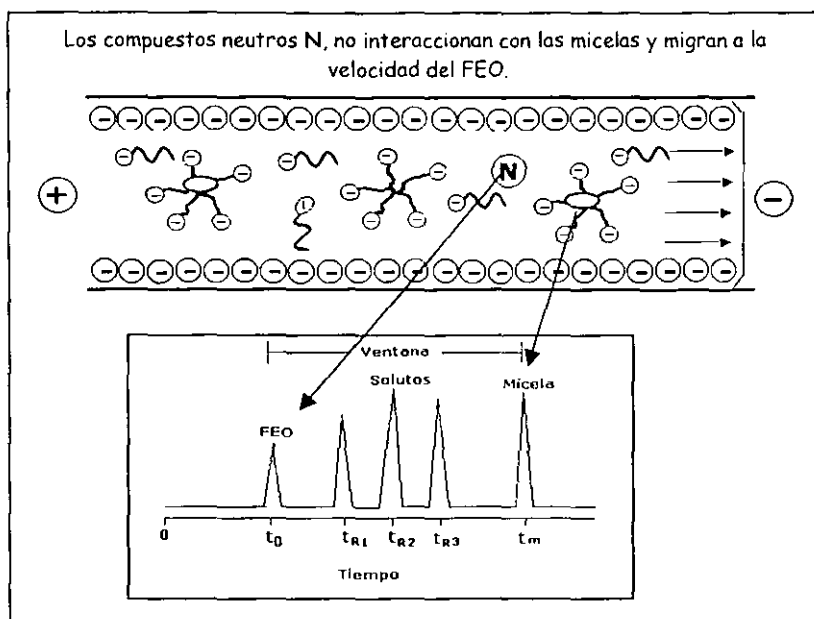
En la Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar, se añaden al búfer cantidades de surfactante o tensoactivo<sup>40</sup> que exceden de la concentración micelar crítica a fin de obtener las respectivas micelas. Hasta ahora en la mayoría de las aplicaciones los surfactantes que han sido más utilizados son dodecil-sulfato de sodio (DSS), bromuro de cetiltrimetilamonio (BCTA) y bromuro de dodeciltrimetilamonio (BDTA). (Heiger, 1997, Pp. 42-75)

El siguiente esquema ilustra como la superficie de las micelas aniónicas tiene una carga negativa, lo que les confiere una movilidad electroforética hacia el electrodo positivo. Sin embargo, dado que la mayor parte de las disoluciones reguladoras utilizadas en esta modalidad presentan un flujo electroosmótico alto hacia el electrodo negativo, esto provoca que las micelas aniónicas sean arrastradas hacia dicho electrodo, con una velocidad menor a la del flujo electroosmótico. De éste modo, durante el proceso, la mezcla reguladora esta formada por una fase acuosa que se mueve rápidamente y una fase micelar que lo hace con más lentitud. Cuando se introduce una muestra en el sistema los componentes se distribuyen entre la fase acuosa y el interior hidrófobo de las micelas. La distribución de los analitos y los equilibrios que resultan dependen de la polaridad de los analitos. 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. (Skoog, 2001, Pp. 685-689)

Para especies neutras, el equilibrio entre la micela y el electrolito soporte rige su movilidad electroforética y por lo tanto sus posibilidades de separación. Cuando el analito neutro no interacciona con la micela es simplemente acarreado por el FEO, sin embargo, 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. (Heiger, 1997, Pp. 42-75)

---

<sup>40</sup> Son moléculas que poseen dos extremos con distinta solubilidad. Un extremo denominado cola, consiste en una larga cadena hidrocarbonada soluble en compuestos orgánicos, no polares. El otro, llamado cabeza, a menudo es una sal de sodio o potasio, soluble en agua que sirve para disminuir la tensión superficial.



**ESQUEMA 12. REPRESENTACIÓN DE UNA SEPARACIÓN MEDIANTE LA FORMACIÓN DE MICELAS**

La resolución es mejorada extendiendo el rango de elución, también llamado "ventana analítica". Mientras la ventana analítica es moderadamente pequeña, la capacidad del pico puede ser muy alta debido a la alta eficiencia. Esto es deseable para emplear condiciones que pueden ampliar la ventana analítica, y se hace disminuyendo el FEO e incrementando la velocidad de las micelas.

El sistema que se ha descrito es bastante similar al que existe en la columna cromatográfica de reparto líquido-líquido excepto en que la fase estacionaria se mueve a lo largo de la columna pero con una velocidad mucho más pequeña que la fase móvil. En los dos casos el mecanismo de separación es idéntico, y depende de las diferencias en las constantes de distribución de los analitos entre la fase acuosa móvil y la fase pseudo estacionaria constituida por las micelas. El proceso es de este modo

un verdadero proceso cromatográfico, de aquí que se le denomine cromatografía capilar electrocinética micelar (CCEM).

La cromatografía capilar en presencia de micelas tiene un futuro prometedor, dada su aceptación por la comunidad química. Sus ventajas sobre la CLAR son la eficiencia de columna (100,000 platos o más) y la facilidad con la que se puede modificar la fase pseudo estacionaria en comparación con el cambio de fase estacionaria en CLAR. En CCEM, cambiar la composición micelar del búfer, provoca un esfuerzo mínimo que proporciona una segunda fase distinta que influirá en la eficiencia de separación. En CLAR la segunda fase sólo se puede alterar empleando una columna con otro tipo de relleno. (Skoog, 2001, Pp. 685-689)

El mecanismo de separación de moléculas neutras en CCEM es esencialmente cromatográfico: ahora bien los analitos que no interaccionan con la micela son eluidos cerca del FEO ( $t_o$ ) mientras que los analitos que interaccionan con la micela, son "retenidos" por lo que eluirán más lentamente que los anteriores (ver esquema 3). Los compuestos con extremo hidrófobo que interaccionan fuertemente con el centro de la micela, son generalmente detectados al mismo tiempo que las micelas ( $t_m$ ). El factor de capacidad,  $k'$ , para especies neutras puede calcularse en CCEM usando la ecuación: (Heiger, 1997, Pp. 42-75)

$$k' = \frac{(t_r - t_o)}{t_o (1 - t_r / t_m)} = K \left( \frac{V_s}{V_m} \right) \quad (22)$$

donde

$t_r$  = tiempo de retención del analito

$t_o$  = tiempo de retención del analito no retenido o "tiempo muerto"

$t_m$  = tiempo de retención micelar

$K$  = coeficiente de partición

$V_s$  = volumen de la fase micelar

$V_m$  = volumen de la fase móvil



La resolución de dos especies en CCEM puede ser descrita por:

$$R_S = \left[ \left( \frac{N^{1/2}}{4} \right) \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{\kappa'_2}{\kappa'_2 + 1} \right) \begin{matrix} 1 - (t_0 / t_m) \\ 1 - (t_0 / t_m) \kappa'_1 \end{matrix} \right] \quad (23)$$



Donde:

Eficiencia

Selectividad

Retención

$$\alpha = \frac{\kappa'_2}{\kappa'_1}$$

La resolución puede ser mejorada optimizando la eficiencia, selectividad y/o el factor de capacidad. Este puede ser fácilmente ajustado variando la concentración del surfactante. Sin embargo, un problema potencial con el uso de surfactantes iónicos, especialmente a elevadas concentraciones, es que este incremento genera corriente. De ahí la importancia de tener un sistema que regule la temperatura del capilar.

La selectividad puede ser manipulada fácilmente en CCEM, variando la naturaleza física (como tamaño, carga, geometría) de la micela. Usando diferentes surfactantes u otros aditivos como alcoholes se logran cambios dramáticos en la selectividad. (Heiger, 1997, Pp. 42-75)

Tipos de Surfactantes:

- Aniónicos
- Catiónicos
- No iónicos
- Zwitteriónicos <sup>41</sup>

<sup>41</sup> Son compuestos que llevan en su estructura ambas cargas, positiva y negativa en una solución

TABLA 5. DETERGENTES BIOLÓGICOS MÁS USADOS EN CCEM

DETERGENTES BIOLÓGICOS		CMC (MM)	NÚMERO DE AGREGACIÓN
ANIÓNICOS	Dodecil sulfato de sodio DSS	8.2	62
CATIÓNICOS	Dodeciltrimetilamonio, bromuro de DTAB	14	50
	Cetiltrimetilamonio, bromuro de CTAB	1.3	78
NO IÓNICOS	Octilglucósidos	----	----
	n-Dodecil- $\beta$ -D-maltosido	0.16	----
	Triton X-100	0.24	140
ZWITTERIÓNICOS	3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano, sulfonato de CHAPS	8	10
	3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano, sulfonato de CHAPSO	8	11
SALES BILIARES	Acido cólico	14	2-4
	Acido deoxicólico	5	4-10
	Acido taurocólico	10-15	4

Existen otros aditivos que actúan de manera "similar" a los surfactantes, ya que de alguna manera interaccionan con el analito para poder ser determinados, dentro de ellos están:

- > Ciclodextrinas
- > Sales biliares
- > Éteres Corona
- > Antibióticos macrocíclicos
- > Solventes Orgánicos.

**Ciclodextrinas.** Son polisacáridos macrocíclicos, neutros y naturales que contienen 6, 7 u 8 unidades de (+)-glucosa y son llamadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  ciclodextrinas respectivamente. Las Ciclodextrinas (CD) se obtienen por un tratamiento enzimático del almidón. Su forma es similar a un cono hueco, el diámetro de su cavidad está determinado por el número de unidades de glucosa. La cavidad es relativamente hidrófoba mientras la superficie externa es hidrófila. Las CD pueden formar complejos por inclusión o por

huésped-anfitrión y se usan como selectores quirales para separar isómeros ópticos, de posición y de estructura. (Landers, 1993, Pp. 26-28, 64-66)

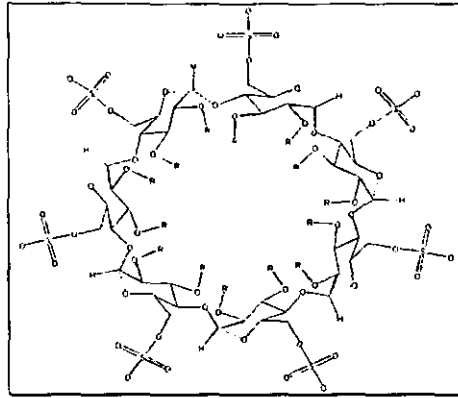


FIGURA 10. REPRESENTACIÓN DE UNA  $\beta$  CICLODEXTRINA

**Sales Biliares:** Se han utilizado para mejorar la separación de corticosteroides, el glicodeoxicolato de sodio y taurocolato de sodio, tienen distinta selectividad y se usan como una alternativa del DSS, ya que presentan diferentes propiedades de agregación y estructura. Las micelas formadas por las sales de bilis se consideran más polares que las micelas formadas por el DSS. (Landers, 1993, Pp. 26-28, 64-66; Winefordner, 1998, Pp.99: <http://ac1.mta.ca/Courses/Biochemistry/BC4511B-Lipid/Corey/bile.gif>, Marzo 22, 2001)

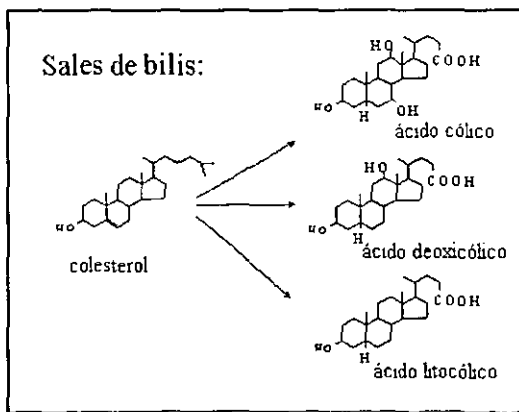


FIGURA 11. DERIVADOS DEL COLESTEROL PARA OBTENER SALES BILIARES

La estabilidad de los complejos por inclusión depende de varios parámetros como son:

- Estructura química e hidrofobicidad de la molécula huésped
- Contraíón
- pH
- Solvente orgánico
- Temperatura
- Concentración del agente acomplejante. (Claessens, 1995, Pp. 101-105)

**Antibióticos Macrocíclicos.** Son detergentes catiónicos. La Vancomicina es un antimicrobiano de naturaleza glicopeptídica producido por *Streptomyces orientalis*. (Claessens, 1995, Pp. 101-105; Landers, 1993, Pp. 26-28, 64-66)

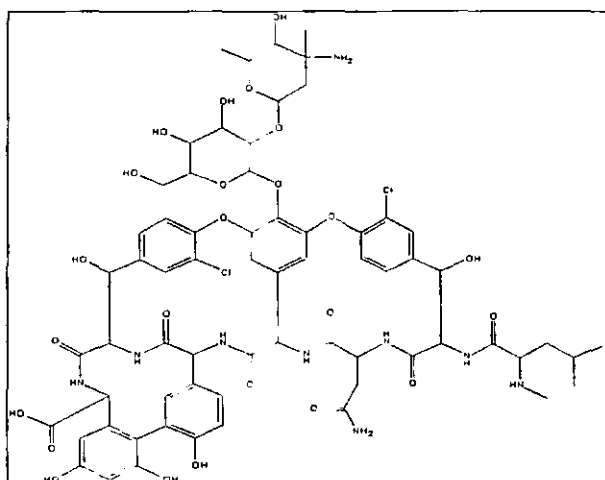


FIGURA 12. ESTRUCTURA DE LA VANCOMICINA

**Solventes Orgánicos.** Se han utilizado para mejorar la resolución en CCEM, juegan un papel importante en el control de la retención y un cambio en la selectividad. Normalmente la adición de solventes orgánicos permite incrementar el tamaño de la ventana analítica. Provocan disminución del FEO debido a la disminución del potencial zeta, resultando baja corriente y disminución del calor de Joule. Los más usados son el

metanol, el 2-propanol y el acetonitrilo. (Claessens, 1995, Pp. 101-105; Landers, 1993, Pp. 26-28, 64-66; Winefordner, 1998, Pp.99)

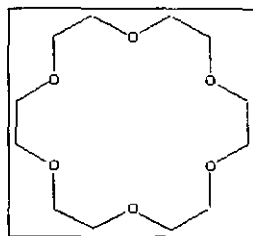


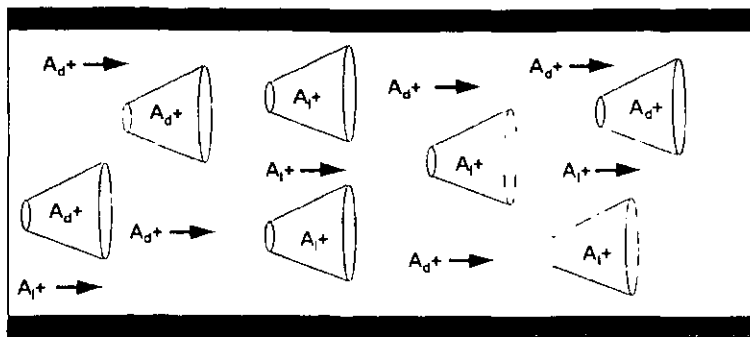
FIGURA 13. ESTRUCTURA DE UN ÉTER CORONA

#### 4.2.2 SEPARACIONES QUIRALES

Generalmente la separación de analitos iónicos se realiza adicionando al electrolito soporte selectores quirales así como ciclodextrinas, proteínas, carbohidratos, éteres corona y antibióticos macrocíclicos. Las separaciones quirales de analitos neutros se realiza generalmente con CCEM con selectores quirales en micelas, usando sales de bilis o mezclas de surfactantes o bien selectores quirales como ciclodextrinas. Los analitos no cargados puede ser separados usando ciclodextrinas iónicas.

Los principales medios para obtener separaciones quirales en EC es agregando ciclodextrinas en el electrolito soporte. Como los dos enantiómeros<sup>42</sup> migran a lo largo el capilar entonces uno de ellos interactúa mas fuertemente que el otro (véase esquema 13). Por lo tanto el enantiómero que interactúa más fuertemente , será detectado después que el que interactúa menos. Típicamente la  $\beta$ -ciclodextrina y los derivados químicos de la ciclodextrina así como la ciclodextrina dimetilada y la hidroxipropilada se agregan en el electrolito en las concentraciones del 1-100mM. (Quang C., 1994, Pp. 609 ;Thormann,1993, Pp. 137-148)

<sup>42</sup> Son imágenes especulares que no pueden superponerse entre sí.



ESQUEMA 13. REPRESENTACIÓN DE UNA SEPARACIÓN MEDIANTE  
EL USO DE UNA CICLODEXTRINA

Donde  $A_d$  y  $A_l$  son los enantiómeros a analizar y la estructura cónica representa una ciclodextrina. (<http://aci.mta.ca/Courses/Biochemistry/BC4511B-Lipid/Corey/bile.gif>, Marzo 22, 2001)

#### 4.2.1 INMUNO ELECTROFORESIS CAPILAR

Son técnicas analíticas basadas en el inmunoensayo (en inglés *Capillary Electrophoretic Immunoassay*) se centran en la reacción inmuno - específica entre un anticuerpo (Ac) y un antígeno (Ag) para la determinación de cualquiera de los reactivos en solución (ver figura 14). Esta poderosa técnica es muy importante en la Química Clínica, Biofarmacéutica y Ambiental por su selectividad única, límites de detección extremadamente bajos y puede ser aplicada a una amplia gama de compuestos. La Electroforesis Capilar basada en el Inmunoensayo se ha denominado InmunoElectroforesis Capilar (IEC).

Las ventajas de la Inmuno Electroforesis Capilar (IEC) sobre otras Técnicas de Inmunoensayo son:

- ✓ Requiere menor cantidad de muestra y por lo tanto consume menos reactivos
- ✓ El procedimiento de IEC es muy simple y fácil de automatizar.

- ✓ La visualización de los inmunocomplejos por IEC es directa. Simplifica la interpretación de los resultados del ensayo.
- ✓ Con la IEC prácticamente se pueden utilizar todas las técnicas de detección existentes (Espectrofotometría Ultravioleta/Visible, Fluorescencia, Espectrometría de Masas, etc.)

Cuando se utiliza la IEC con enzimas marcadas, es posible determinar la sustancia de interés por separación y detección del sustrato y el producto de las enzimas marcadas. Al igual que los métodos convencionales de inmunoensayo la IEC puede utilizar los formatos tanto competitivo y no competitivo. (<http://relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/cromal/html>, Marzo 22, 2001; <http://ntr.tamuk.edu/ce/laser-induced.html>, Marzo 22, 2001).

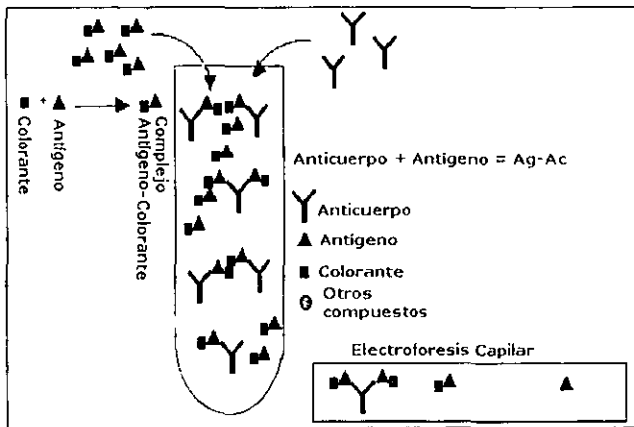


FIGURA 14. REPRESENTACIÓN DE UNA REACCIÓN ANTÍGENO ANTICUERPO

**INMUNO ELECTROFORESIS CAPILAR (NO COMPETITIVA)**

Esta modalidad está basada en la separación de complejos Ag-Ac o bien Ag y/o Ac libre. Si la sustancia puede ser analizada directamente por detección UV o fluorescencia<sup>43</sup>, la cantidad del complejo formado puede ser directamente

<sup>43</sup> luminiscencia presentada por ciertas sustancias después de haber sido iluminadas por rayos visibles o ultravioleta, y persiste después de haber cesado la radicación excitante.

cuantificado. Los reactivos pueden ser marcados para ampliar su sensibilidad de detección.

#### INMUNO ELECTROFORESIS CAPILAR (COMPETITIVA)

Esta modalidad, se utiliza principalmente cuando la reacción Ag-Ac o bien Ag y/o Ac libres no pueden ser analizados por sí solos, por lo tanto se basa en la formación de complejos, utilizando un aditivo, por ejemplo como se muestra en el diagrama se utiliza un colorante que nos permita la detección.

En Inmuno Electroforesis Capilar pueden usarse distintos métodos de detección que puede ser clasificada en dos grupos dependiendo si se utiliza un marcador o no:

- ✓ Inmunoensayo marcado: Ultravioleta
- ✓ Inmunoensayo no marcado: RIA<sup>44</sup>, ELISA<sup>45</sup>,
- ✓ Inmunoensayo Fluorescente,
- ✓ Inmunoensayo Electroquímico y
- ✓ Fluorescencia Inducida por Láser

(<http://relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografias/croma1/html>, Marzo 22, 2001).

Esta técnica podría entrar dentro de lo que es la CCEM, ya que se utiliza una solución búfer, y se le adiciona ya sea antígenos o bien anticuerpos para estudiar las interacciones y monitorearlas, además de poder caracterizarlas y separarlas.

---

<sup>44</sup> La técnica de RIA (*radioimmunoassay*), el anticuerpo conocido es conjugado con un elemento radioisotópico, que permite cuantificar la reacción antígeno anticuerpo mediante una cámara gama. El radio inmunoensayo es sumamente sensible y específico. (<http://www.caduceus.com.pe/en-linea/no-01/metodos.html>)

<sup>45</sup> La técnica ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente. (<http://porthos.bio.ub.es/~mreina/psc/sub/elisa.htm>)



### 4.3 ELECTROFORESIS CAPILAR DE ENFOQUE ISOELÉCTRICO.

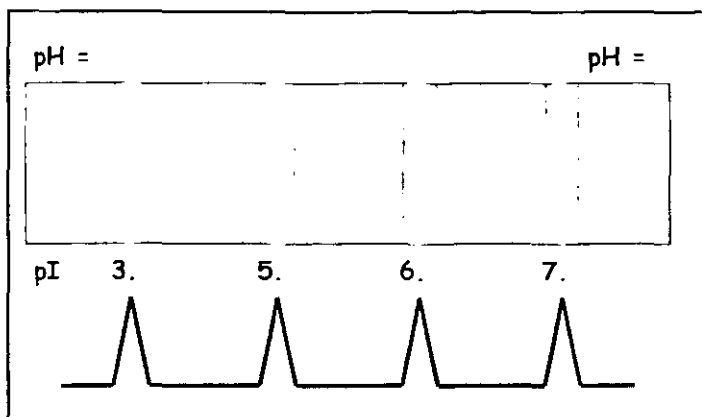
La Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico (CIEF en inglés *Capillary Isoelectric Focusing*) es una técnica de alta resolución usada generalmente para separar péptidos y proteínas basándose en su punto Isoeléctrico (pI)<sup>46</sup>. Esta técnica es usada para la separación de especies zwitteriónicas las cuáles cuentan con grupos funcionales que bajo ciertas condiciones la molécula tiene carga positiva o negativa, o bien ambos cargados pero la molécula en electro neutralidad y tiene una diferencia de 0.005 unidades o menos respecto a su pI<sup>47</sup>.

El flujo electroosmótico necesita ser reducido o eliminado en esta modalidad a fin de evitar la adsorción de las moléculas cargadas en la pared del capilar. La disminución o eliminación de éste puede realizarse por medio de un recubrimiento dinámico o covalente; el recubrimiento dinámico tiene la ventaja de ser simple, pero difícilmente se obtiene un flujo electroosmótico reproducible (más información en el capítulo 5 en la sección de tipos de capilares).

En Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico (ECEI) el electrolito soporte es una mezcla (ácido /base o de anfólitos) que generan un gradiente de pH durante la aplicación de voltaje. La muestra es inyectada a bajo pH en el capilar y como está positivamente cargada entonces migrará a lo largo del capilar hacia el cátodo. Cuando el analito alcanza la posición donde  $\text{pH} = \text{pI}$  (a lo largo del gradiente de pH en el capilar) el número de cargas positivas es exactamente igual al número de cargas negativas, por lo que el analito queda neutro, deja de migrar y se mantiene en esa posición, en el esquema 14 se ilustra lo anterior.

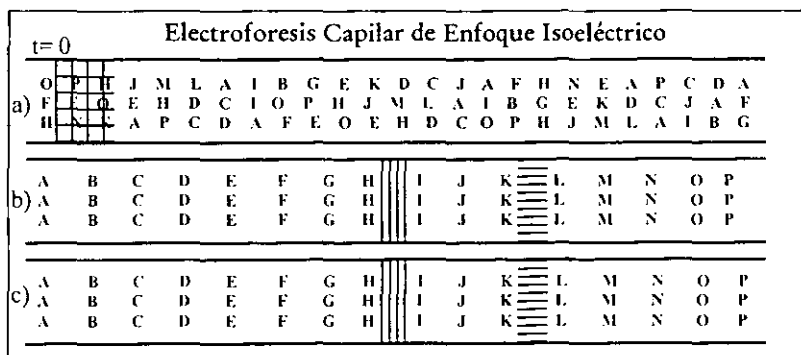
<sup>46</sup> Es el valor de pH en el cuál las cargas positivas y negativas de una molécula están exactamente en balance.

<sup>47</sup> La cantidad de cargas positivas es la misma que de cargas negativas.



ESQUEMA 14. REPRESENTACIÓN DE UNA SEPARACIÓN POR ENFOQUE ISOELÉCTRICO

Otra forma de representar la separación una muestra por enfoque isoelectrico se observa en el esquema 6, donde las letras representan al electrolito soporte (mezcla de anfolitos); al aplicarse voltaje se genera un **gradiente de pH**, por lo que se ordenan entre sí, y en éste gradiente de pH puede separarse la muestra. (Sánchez, 2001, Pp.34)



ESQUEMA 15. GENERACIÓN DEL GRADIENTE DE pH

- a) Capilar con electrolito soporte y la muestra
- b) Generación del gradiente de pH
- c) Movilización (conservando su posición)

El estado del proceso de enfoque es indicado por la corriente. Una vez alcanzado un estado estable la corriente del flujo es pequeña (ver Figura 15).

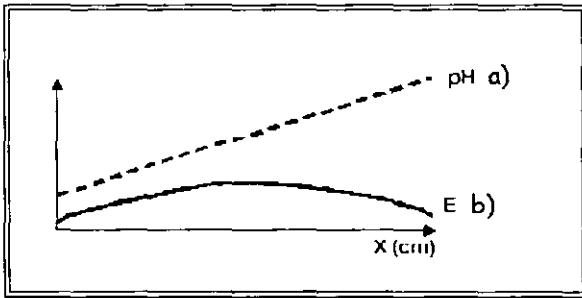


FIGURA 15. GRÁFICO DE LA SEPARACIÓN POR ENFOQUE ISOELÉCTRICO.

Etapas: a) Perfiles del campo eléctrico

b) pH a lo largo del capilar

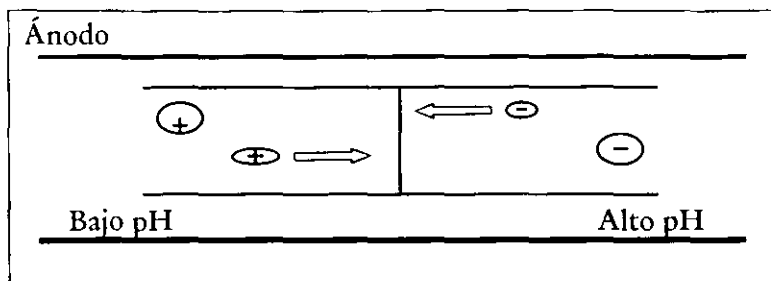
La precipitación de proteínas dentro de las zonas puede ser el resultado de concentraciones elevadas, y usualmente es el factor límite de la cantidad de muestra a utilizar. Los anfólitos a emplear se seleccionan dependiendo de los valores de pI de los analitos a separar y para cubrir el intervalo de pH de interés según la muestra a analizar. Los anfólitos deben tener las siguientes características: ser conductores de corriente, buena capacidad amortiguadora al valor del pI, baja absorbancia a la longitud de onda de detección, solubles en agua, no interaccionar con los analitos de la muestra.

Los analitos se pueden comportar de dos maneras diferentes durante la separación :

- a) A valores de pH por arriba del pI (los analitos tienen carga negativa) por lo que son acarreados hacia el ánodo.
- b) Cuando se desplazan en un gradiente de pH, cuando el pI iguala al pH, la carga neta del analito es cero por lo que el movimiento cesa. (Sánchez, 2001, Pp.34)

Los tres pasos básicos de la ECEI son: la Carga, el Enfoque y la Movilización.

**La carga:** La muestra es mezclada con los anfólitos acarreadores apropiados. Se realiza la inyección a presión o por vacío para llenar la mayor parte del capilar.

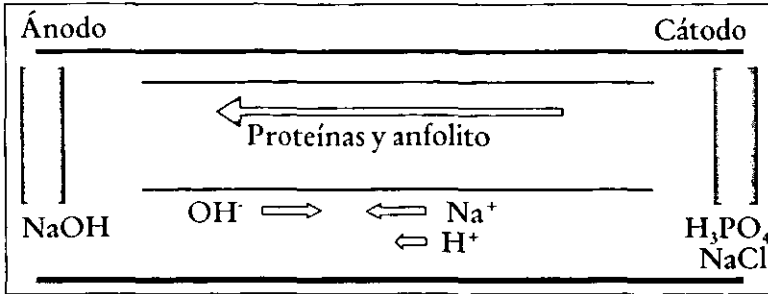


ESQUEMA 16. INTRODUCCIÓN DE LA MUESTRA EN EL CAPILAR.

**El enfoque:** Los depósitos de búfer se llenan con hidróxido de sodio (cátodo) y ácido fosfórico (ánodo). Se aplica un campo eléctrico de 500-700V/m originando una corriente menor a 1  $\mu\text{A}$ , para provocar que los analitos se separen por gradiente de pH, es decir se ordenarán de acuerdo a su punto isoeléctrico. (Sánchez, 2001, Pp.34)

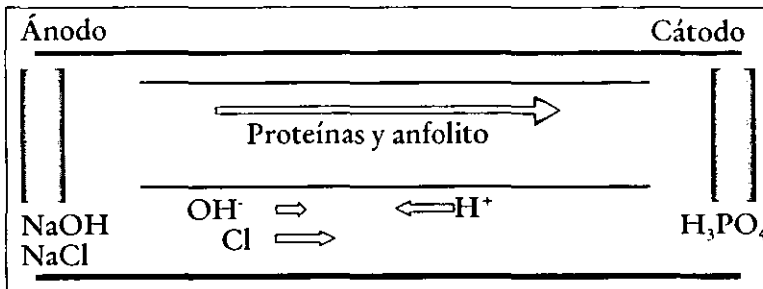
**La Movilización:**

- 1) *Movilización Hidrodinámica:* El contenido del capilar puede ser bombeado o aspirado hacia el detector. El ensanchamiento de picos es reducido aplicando el voltaje durante la elusión.
- 2) *Movilización por Electroósmosis:* El FEO es solamente reducido y es suficiente para asegurar el enfoque antes de la migración del analito hacia el paso del detector.
- 3) *Movilización electroforética de la sal:* Se agregan al búfer sales o anfólitos como aditivos, para cambiar el pH en el capilar cuando el voltaje es aplicado. La movilización se da por el requerimiento de la electroneutralidad, y la movilización siempre incrementa la corriente.



ESQUEMA 17. EJEMPLO DE UNA MOVILIZACIÓN ANÓDICA.

La movilización electroforética de la sal puede ser anódica o bien catódica, dependiendo hacia donde se desplace la muestra a analizar, como se observa en los esquemas 17 y 18. (Altria, 1998, Pp. 13)



ESQUEMA 18. EJEMPLO DE UNA MOVILIZACIÓN CATÓDICA.

El ancho de la zona,  $\sigma$  (desviación estándar), en ECEI esta dada por:

$$\sigma = \left[ \frac{D}{(d\mu_i/dpH) (dpH/dx)} \right]^{1/2} \tag{24}$$

y la resolución con respecto a la diferencia de pI esta dada por:

$$\Delta pI = 3 \left[ \frac{(dpH/dx)}{E(-d\mu/dpH)} \right]^{1/2} \tag{25}$$

Donde:

$D$  = coeficiente de difusión ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )

$E$  = campo eléctrico ( $\text{V}/\text{cm}$ )

$dpH/dx$  = gradiente de pH de la zona

$d\mu/dpH$  = movilidad al pI (depende de la carga de la proteína más cerca del pI).

Una mejor resolución se obtiene aplicando altos voltajes, para tener altas movilidades en el pI y evitar los cambios de pH.

La Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico ha sido usada para medir el pI de proteínas y para la separación de isomorfos y otros tipos de proteínas problemáticas por otros métodos analíticos como son las inmunoglobulinas y hemoglobinas. (Altnia, 1998, Pp. 13; Heiger, 1997, Pp. 42-75, (Sam.F. y Li, 1998, Pp. 12-17)

#### 4.4 ISOTACOFORESIS CAPILAR.

Isotacoforesis significa electroforesis a velocidad uniforme. Esto quiere decir que el tiempo de recorrido en el capilar bajo condiciones isotacofóricas es independiente de la velocidad. Es una técnica de separación por desplazamiento. Antes de iniciar la corrida, el capilar se debe llenar con un electrolito líder o guía en un extremo. Éste debe tener una gran movilidad, mayor que la de todos los componentes a separar. Luego se introduce la muestra, seguida del electrolito terminal, cuya movilidad debe ser menor que cualquiera de los componentes de la muestra.

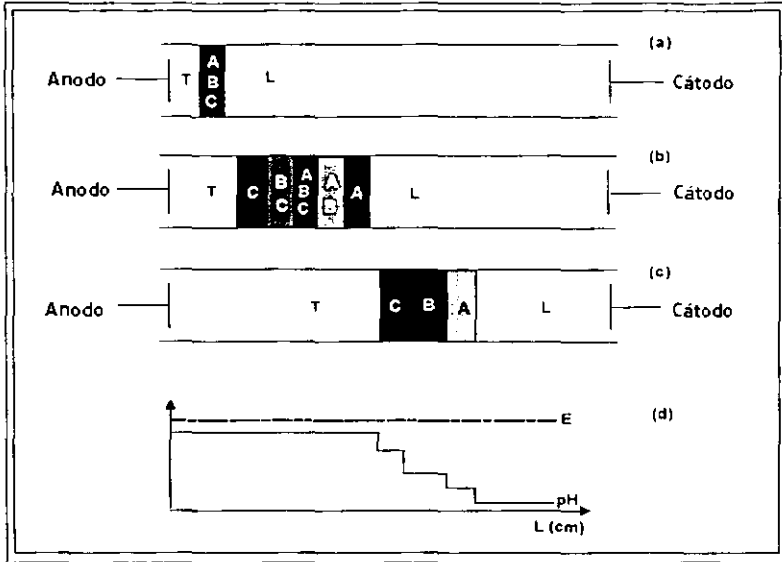


FIGURA 16. ILUSTRACIÓN DE LA SEPARACIÓN POR ISOTACOFRESIS:

- a. Estado inicial,
- b. Al aplicar voltaje,
- c. Se ha llevado a cabo la separación;
- d. Perfil del campo eléctrico y pH a lo largo del capilar.

Nota: El electrolito líder sale primero, posteriormente los analitos y al final el electrolito terminal.

La selección del electrolito líder y terminal depende del conocimiento de los valores de las movilidades y del pKa para todos los componentes de la muestra. Todas las zonas se mueven a la misma velocidad y se intercalan entre los electrolitos líder y terminal.

En Isotacoforesis los picos están siempre en contacto con la zona adyacente. Esta característica es necesaria para mantener la continuidad eléctrica a lo largo del sistema, dado que no hay un electrolito de soporte homogéneo. El electrolito líder, debe tener una velocidad de migración mayor que la del electrolito terminal, para que el analito se separe en base a su velocidad de migración.

Esta técnica puede ser usada para determinar cationes y aniones, sin embargo, se requiere usualmente de corridas separadas para determinar cada forma iónica, de allí que existan dos modos de isotacoforesis: catiónica y aniónica.

Generalmente la Isotacoforesis Capilar (IC) se ha efectuado bajo condiciones de cero FEO aunque no es una restricción. Los isotacofogramas pueden mostrar diferencias en el orden de migración en presencia o no de FEO. (Sánchez, 2001, Pp.34)

Los factores que influyen en la separación isotacoforética son principalmente: pH del búfer, fuerza iónica del electrolito, aditivos al búfer como disolventes orgánicos, tensoactivos y/o ciclodextrinas, voltaje aplicado, temperatura, longitud y diámetro del capilar, etc. Estos actúan de forma distinta respecto a otras técnicas de separación de mayor tradición, por lo que, en la mayoría de los casos, los resultados son complementarios (Sánchez, 2001, Pp. 34:

<http://relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/croma1/html>, Marzo 22, 2001).

Para el análisis de aniones se selecciona como electrolito guía el búfer que contiene al anión con una movilidad efectiva más alta que la de los analitos. De manera similar el anión terminal debe tener la movilidad más baja con respecto a los analitos. Cuando el campo eléctrico es aplicado los aniones comienzan a migrar hacia el ánodo. Puesto que el anión principal tiene la más alta movilidad, se mueve más rápido y es seguido del anión con la siguiente movilidad más alta y así sucesivamente. En Isotacoforesis Capilar los aniones individuales migran en zonas discretas, pero todas se mueven a la misma velocidad definida por la velocidad del anión principal. Un estado constante de velocidad en Isotacoforesis Capilar ocurre puesto que el campo eléctrico varía en cada zona. El campo es ajustado para mantener la velocidad constante (velocidad = movilidad x campo) es decir el valor más bajo de campo con el valor más alto de movilidad. Un ion difunde a una zona vecina y estos cambios de velocidad inmediatamente regresan a su propia zona.



Este modo de operación es distinto a los otros modos de electroforesis capilar, caracterizada por las zonas de la muestra, que cambian continuamente su forma y posición relativa. En el caso típico en ECZ el electroferograma<sup>48</sup> obtenido contiene los picos pertenecientes a la muestra similares a los obtenidos en las separaciones cromatográficas y en el caso de Isotacoforesis Capilar el isotacoferograma obtenido contiene una serie de pasos donde cada paso representa una zona del analito. En otros modos de Electroforesis Capilar la cantidad de muestra presente puede ser determinada por el área bajo la curva como en cromatografía, la cuantificación en IC esta basada principalmente en medir la longitud de la zona, la cuál es proporcional a la cantidad de muestra presente. (Sam.F y Li, 1998, Pp. 12-17)

Otra cosa interesante en Isotacoforesis Capilar es que cada zona tiene una concentración constante, determinada por la concentración del electrolito guía. Puesto que la IC usualmente se realiza a corriente constante, una proporción constante debe existir entre la concentración y la movilidad de los iones en cada zona. La zona más (o menos) más concentrada que el electrolito guía, es delgada (o ancha) para adaptarse a dicha concentración(ver figura 17). (Heiger, 1997, Pp. 42-75)

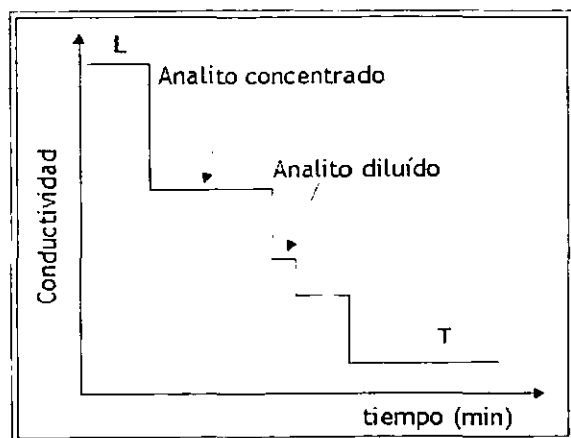


FIGURA 17. REPRESENTACIÓN DE UN ISOTACOFEROGAMA.

<sup>48</sup> Es un gráfico en el que se representa la respuesta del detector en función del tiempo de migración.

La detección en Isotacoforesis se realiza con detectores, que miden propiedades de la solución electrolítica, un ejemplo es el detector<sup>49</sup> de conductividad. También se han utilizado detectores térmicos (mide el calor de Joule producido dentro de cada zona) o detectores que miden la caída de voltaje de cada zona. Por ejemplo en la figura 17 se representa una muestra de tres componentes con un detector de conductividad.

A pesar de la cantidad de instrumentación comercial con una extensiva teoría y aplicaciones, la Isotacoforesis Capilar no se ha convertido hasta el momento en una técnica de separación de rutina en muchos laboratorios analíticos.

#### 4.5 ELECTROFORESIS CAPILAR EN GEL (ECG).

La mayoría de las moléculas de gran tamaño de interés biológico tienen carga y por ello es factible separarlas y analizarlas por métodos electroforéticos. En el pasado, éstos análisis se llevaban a cabo en muchos casos a macro-escala y en geles poliméricos, en los que se minimizaban las perturbaciones convectivas debidas al calentamiento eléctrico. El desarrollo de la Electroforesis Capilar en Gel y los capilares recubiertos han venido a revolucionar la separación al emplearse las técnicas de la electroforesis capilar.

La Electroforesis Capilar en Gel (ECG) es directamente comparable con la electroforesis en gel<sup>50</sup> tradicional ya que los mecanismos de separación son idénticos. La electroforesis capilar ofrece numerosas ventajas sobre la electroforesis en gel plana, incluyendo el uso de un campo eléctrico 10 a 100 veces más alto, sin los efectos del calentamiento de Joule (aunque recientemente los geles ultrafinos se han utilizado para limitar este efecto), la detección en línea en el capilar y la posibilidad de automatización instrumental. En adición, debido a la naturaleza anticonvectiva del

---

<sup>49</sup> Es la parte del equipo electroforético que permite "ver" y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida del capilar.

<sup>50</sup> Consiste en dos partes: el medio dispersivo (porción sólida) y el medio dispersante (el solvente).

capilar no es necesario utilizar un gel que sea por sí mismo anticonvectivo. La capacidad de las separaciones preparativas consideradas como la mayor ventaja de la electroforesis en gel convencional puede ya realizarse con el uso de la ECAR (Electroforesis Capilar de Alta Resolución) utilizando capilares con diámetro interno mayor de 100-200  $\mu\text{m}$  y campos eléctricos bajos.

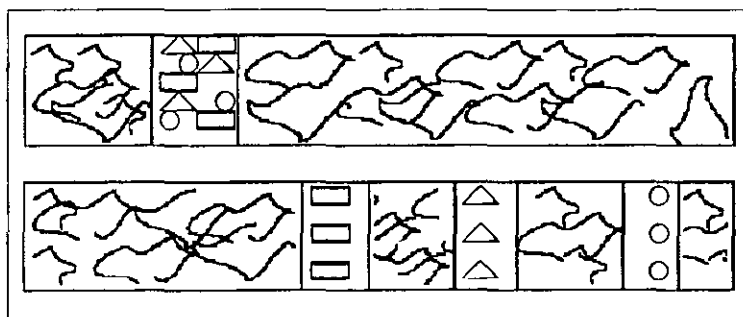
En la electroforesis capilar en gel, los tubos capilares son llenados con un gel, el cuál actúa como un "tamiz molecular" para producir una separación basada en el tamaño de las partículas. La electroforesis capilar en gel ha sido utilizada en la separación de macromoléculas, como fragmentos de ADN, proteínas y ácidos nucleicos, porque contienen proporciones diferentes de masa y carga en las que no varía el tamaño. El principio de separación de ECG es el mismo que el tubo de electroforesis en gel, los geles usados en ECG pueden ser enlaces covalentes cruzados o soluciones lineales de polímeros. (Marina, 1994, Pp. 1411-1433)

Hjerten y Zhu emplearon poli(acrilamida) y agarosa en capilares de 150  $\mu\text{m}$  de diámetro interno para la separación electroforética de moléculas grandes y pequeñas. Karger y colaboradores realizaron una separación extremadamente eficiente (con arriba de 30 millones de platos teóricos por metro) usando columnas capilares llenas con gel. Los capilares fueron llenados con gel de poli(acrilamida) el cuál contenía dodecil sulfato de sodio. Ésta técnica se conoce como DSS-EGP<sup>51</sup> y ha sido usada para la separación de proteínas, poli-nucleótidos y fragmentos de ADN. El éxito notable alcanzado por la técnica es en parte atribuido al entrecruzamiento de los monómeros de acrilamida y bisacrilamida dentro de los capilares de sílice fundida. La poli(acrilamida) resultante tiene una estructura enrollada al azar que puede ser enlazada a la pared del capilar con la adición de un reactivo bifuncional. (Altria, 1998, Pp. 11-12)

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

<sup>51</sup> Por sus siglas significa Dodecil sulfato de sodio - electroforesis en gel de poli(acrilamida)

Los geles son utilizados porque permiten la separación basada en "un tamizado molecular", (ver esquema 17) sirven como medios anticonvectivos, ya que ellos minimizan la difusión del analito, el cuál contribuye a la zona de ensanchamiento, además previenen la adsorción del analito a las paredes del capilar y ayudan a eliminar el FEO. Sin embargo, el gel debe poseer ciertas características, así como estabilidad en la temperatura y un tamaño de poro apropiado. Además la técnica no puede aplicarse a moléculas neutras que no migrarían a través del gel, puesto que el flujo electroosmótico está suprimido en éste modo de operación. (Heiger, 1997, Pp. 42-75)



ESQUEMA 17 . SEPARACIÓN POR TAMAÑO EN ELECTROFORESIS CAPILAR EN GEL.

El término "gel" en ECG es ambiguo, ya que un gel usualmente implica una estructura sólida. Puesto que muchos geles usados en ECG no poseen ésta propiedad por lo tanto el término más conveniente puede ser "red del polímero". Sin embargo, esa es la nomenclatura utilizada desde el inicio de la electroforesis y la mantendremos a lo largo de esta sección.

Existen dos tipos de geles:

**Geles químicos:** después de ser preparados por polimerización de acrilamida y agentes reticulantes, por ejemplo: N, N'-metileno bis-acrilamida más un iniciador radical  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , resultado una matriz<sup>52</sup> de gel de poliacrilamida. El tamaño de los poros

<sup>52</sup> Se refiere a todos los componentes de la muestra excepto al analito o los analitos de interés.

esta entre 2-8nm. Los problemas que se tienen con ellos son la formación de burbujas y la contracción del gel.

**Geles físicos:** geles lineales de poliacrilamida, químicamente enlazados a la pared de sílice con enlaces vinílicos o silanólicos. Geles de agarosa, son redes de polisacáridos que pueden ser preparados rápida y fácilmente sin aplicación de catalizadores e iniciadores. Dentro de sus propiedades más importantes se tiene que son:

- Químicamente estables en pH 4-9
- Diámetro del poro entre 100nm-1 $\mu$ m
- Alta fuerza mecánica
- Biológicamente inertes

Generalmente muestran menos problemas comparados con los geles reticulantes.

(Sánchez, 2001, Pp.34)

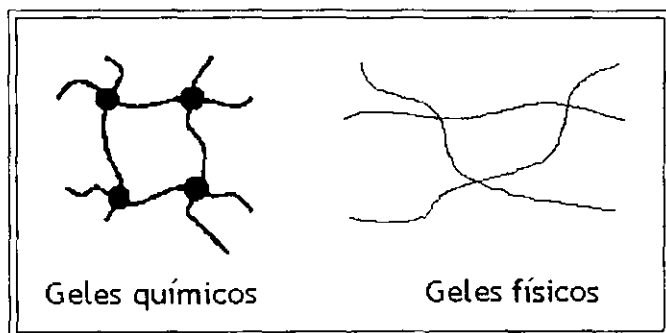


FIGURA 18. DIFERENCIA ENTRE GELES QUÍMICOS Y FÍSICOS.

Los poros en los geles químicos están formados por enlaces covalentes mientras que en los geles físicos los poros los define el grado de entrecruzamiento de los polímeros.

**Soluciones Poliméricas:** además de los geles físicos preparados in situ, también se pueden emplear polímeros hidrofílicos disueltos en el búfer. A ciertas concentraciones interacciones físicas ocurren y se forma una red polimérica.

Ejemplos de polímeros que pueden ser utilizados para este fin:

- Hidroximetil Celulosa
- Dextrán
- Polietilenglicoles
- Agarosa. (Claessens, 1995, Pp. 101-105)

Como ya se mencionó, los polímeros en Electroforesis Capilar en Gel pueden ser:

- i) entrecruzados covalentemente (e.g. bis-poliacrilamida),
- ii) entrecruzados por enlaces de hidrógeno (e.g. agarosa), o bien
- iii) soluciones lineales de polímeros (como poliacrilamida o metilcelulosa).

Aunque la estructura del polímero no-entrelazado es radicalmente diferente al del gel entrelazado, el mecanismo de separación es idéntico, por lo tanto, las macromoléculas pueden ser separadas en base a su tamaño usando cualquier tipo de gel. (Heiger, 1997, Pp. 42-75)

La poliacrilamida es una matriz ampliamente usada; normalmente es polimerizada *in situ* y no se remueve del capilar. La preparación de éstos geles no requiere de mucho tiempo. La polimerización rápida se utiliza para soluciones no desgasificadas, pero los productos impuros conducen a menudo a la formación de burbujas o geles inestables. Una desventaja potencial de la poliacrilamida reticulada es su naturaleza rígida, las muestras con algunas impurezas, obstruyen los extremos o forman burbujas durante el uso de éste y ocasionan que el capilar sea no-utilizable. Debe hacerse notar que la rigidez del gel imposibilita el uso de la inyección hidrodinámica de la muestra, por lo que sólo se emplea la inyección electrocinética. (Sam. F. y Li, 1998, Pp. 12-17)

Los polímeros lineales ofrecen una alternativa a los geles reticulados. Esencialmente las soluciones de polímeros son mucho más flexibles y las soluciones de polímeros lineales pueden ser polimerizadas *in situ*, aunque no es siempre necesario. Cuando un polímero es pre-polimerizado puede ser disuelto en un búfer y cargado

hidrodinámicamente en el capilar. Para la acrilamida puede usarse un amplio rango de concentraciones (incluso menor al 1% y mayor del 20%). Generalmente la concentración del polímero necesaria es inversamente proporcional al tamaño del analito.

Dada la baja viscosidad de las soluciones del polímero la presión puede ser utilizada para la inyección de la muestra y llenar repetidamente el capilar (dependiendo de la concentración y la viscosidad) ya que son menos susceptibles a la formación de burbujas y otras fallas.

TABLA 6. POLÍMEROS MÁS USADOS Y SU APLICACIÓN

POLÍMERO	CONCENTRACIÓN	APLICACIÓN
<b>POLÍMEROS EN REDES</b> poliacrilamida/bisacrilamida	2-6% T, 3-6% C	✓ Oligonucleótidos, secuencia de ADN. ✓ Proteínas.
<b>POLÍMEROS LINEALES</b> Poliacrilamida, hidroxialquil celulosa, polivinil alcohol, dextrán.	<0.1-6% 6-15%	✓ Fragmentos. ✓ Oligonucleótidos, secuencia de ADN, proteínas.
<b>AGAROSA</b>	0.05-1.2%	✓ Fragmentos. ✓ Proteínas.

El tamaño del poro está determinado por la concentración total del gel, %T como se presenta en la ecuación (25):

$$T = \frac{[bis + acrilamida]}{V} \tag{25}$$

Donde *bis*, *acrilamida* ; son el peso de la bisacrilamida, y de la acrilamida; y *V* es el total de volumen.

La concentración del agente reticulante, ecuación (26) en porcentaje, %C es igual a:

$$C = \frac{[bis + acrilamida]}{acrilamida} \tag{26}$$

Puesto que las proteínas forman complejos con el DSS (Dodecil Sulfato de Sodio) los cuales están cargados negativamente, la inyección y detección se realizan en el extremo catódico y anódico, respectivamente.

La separación con este tipo de capilares tiene varias ventajas sobre la electroforesis convencional plana en gel, pues se requieren pequeños volúmenes de muestra, la automatización es posible, y posee alta sensibilidad. Explotando el alto rendimiento de procesamiento y las separaciones eficientes y rápidas, además de la posibilidad de determinar la masa molecular y la cuantificación, rápidos avances han sido realizados en la separación y el análisis de una amplia variedad de grandes biomoléculas. (Sam.F. y Li, 1998, Pp. 12-17)

La resolución y la eficiencia en Electroforesis Capilar en Gel es idéntica a la Electroforesis Capilar de Zona ya que ambas son técnicas electroforéticas zonales. Sin embargo, una notable diferencia es la alta eficiencia alcanzada para las separaciones de ADN; así como en Electroforesis Capilar de Zona, la selectividad en Electroforesis Capilar en Gel puede ser alterada por la adición de selectores quirales, agentes complejantes etc. Estas especies pueden estar enlazadas covalentemente al gel o simplemente ser adicionadas al búfer.

### Ventajas

- Tiene alta eficiencia en la separación, en un rango de 10-20 millones de platos teóricos, puede realizarse rutinariamente en una columna llena con una longitud menor a 1m.
- La muestra puede detectarse en nanogramos (depende del detector usado).
- Fácil automatización.
- Cuantificaciones precisas.
- Alta sensibilidad, especialmente cuando más sensitivos son los detectores empleados por ejemplo con el uso del detector de láser de fluorescencia inducida (sólo si es factible).



Los capilares llenados con gel proporcionan gran capacidad de resolución en la separación basada en las diferencias en el tamaño; por ejemplo, al usar un gel con un cierto tamaño de poro pueden separarse especies cargadas con diferentes tamaños dentro del rango de la matriz de gel. Puesto que la eficiencia de la separación es inversamente proporcional al coeficiente de difusión en el gel y por tanto es potencialmente una separación con alta eficiencia.

La Electroforesis Capilar en Gel ha sido empleada en biología molecular y química de proteínas, también se realiza la colección de fracciones para la purificación de macromoléculas. (Heiger, 1997, Pp. 42-75) Se usa principalmente en el análisis de oligonucleótidos y polinucleótidos, así como péptidos y proteínas, por lo que la mayoría de éstas separaciones se basan en el tamaño o masa molecular, un ejemplo de éstas aplicaciones es la determinación de masas moleculares de péptidos y proteínas con DSS (Dodecil Sulfato de Sodio) y poli(acrilamida en EG (en inglés *SDS-PAGE*).

Otro ejemplo es el de Cohen Y Colaboradores, que separaron la hormona humana de crecimiento (en inglés *hGH*) por Electroforesis Capilar en Gel. (Sam.F. y Li, 1998, Pp. 12-17)

#### 4.7 ELECTROCROMATOGRAFÍA CAPILAR.

La Electro cromatografía Capilar (ECC), combina los beneficios de la Cromatografía de Líquidos (CL) y de la Electroforesis Capilar (EC). La posibilidad de usar flujo electroosmótico como transporte del solvente en la columna de cromatografía líquida fue señalada por *Jorgensen y Luckas*, y después demostraron que en ECC era factible usar tubos capilares de 170  $\mu\text{m}$  y llenarlos con partículas de 10  $\mu\text{m}$  de Partisil ODS. 2 años después, *Stevens y Cortés* publicaron resultados desalentadores sobre mediciones del FEO en capilares empacados con partículas de 10, 50 y 100  $\mu\text{m}$ , sus mediciones los guiaron a pensar que en tubos capilares empacados con partículas menores a 50  $\mu\text{m}$ , la velocidad del flujo electroosmótico era demasiado baja para realizar una cromatografía eficiente. Concluyeron que los empaques hacían que el FEO

disminuyera debido al solapamiento de dobles capas. Sin embargo, *Knox y Grant*, demostraron teórica y prácticamente que ningún traslape de doble capa ocurre con las partículas por debajo de  $1.5 \mu\text{m}$  en presencia de un electrolito de concentración  $0.01 \text{ M}$ . Además, mostraron separaciones de una mezcla de hidrocarburos aromáticos en tubos capilares empacados con materiales de empaque con tamaño de partícula de  $1.5$ ,  $3$  y  $5 \mu\text{m}$ .

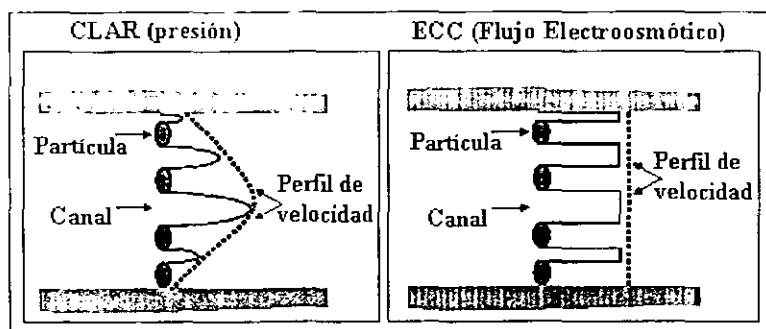
Al mismo tiempo, *Tsuda* había investigado los aspectos fundamentales de la Electro cromatografía Capilar, haciendo estudios sobre la influencia de las características de los solventes en la retención y el flujo electroosmótico en la Electro cromatografía Capilar. Se han publicado trabajos experimentales en la ECC, en tubos empacados con partículas de  $50 \mu\text{m}$ , y  $3 \mu\text{m}$  de *ODS-Hypersil*, donde *Erni* podía demostrar la eficiencia de la columna de  $150,000$  a  $200,000$  platos /metro. Este grupo acentuó la necesidad de presurizar los frascos del búfer con el gas inerte a  $500 \text{ psi}$ , para suprimir la formación de las burbujas del gas en la fase móvil en las altas corrientes (obtenidas con concentraciones de búfer  $> 10 \text{ mM}$ ). La necesidad para presurizar los frascos capilares enteros del sistema y del búfer de la columna había sido ya predicha por *Knox y Grant* en 1991. *Boughtflower y Underwood*.

A lo largo de la misma línea de trabajo obtuvieron eficiencias comparables de la columna como *Smith*. Estos autores también acentuaron la importancia para presurizar los frascos del búfer en la cara de la entrada y salida para evitar gasear afuera y la formación de la burbuja. Además el uso de soluciones búfer de baja conductividad como Tris (trihidroximetil-aminometano) y MES (ácido 4-morfolino-etil-sulfónico) fue recomendado para reducir la corriente en el tubo capilar.

Se ha demostrado que con la ayuda de la presión en la entrada y salida del solvente usando una bomba de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, se logra la supresión de la formación de la burbujas en el tubo capilar en la Electro cromatografía Capilar y al mismo tiempo se alcanza una mayor selectividad. *Unger* y colaboradores

explotaron la interacción del flujo electroosmótico y del flujo hidráulico para realzar la separación de los analitos que co-eluyeron. Behnke y Bayer utilizaron en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución un sistema de bombeo para asistir y realzar la separación en la Electrochromatografía Capilar modificando la composición del solvente como un gradiente de elución. Zare y los compañeros de trabajo publicaron sus resultados iniciales que demostraban la capacidad de la Electrochromatografía Capilar de separar sustancias aromáticas poli nucleares con alta eficiencia en un tiempo corto. (Som.F. y Li, 1998, Pp. 232-236)

La Electrochromatografía Capilar, es considerada un método híbrido de separación que junta la alta eficacia de la separación de la Electroforesis Capilar con algunas características de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, en la que el tubo capilar es una pila de discos con una fase estacionaria similar a las usadas en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, pero se utiliza un campo eléctrico para mover la fase móvil en lugar de presión hidráulica. Puesto que no hay una alta presión aplicada, es posible utilizar empaques de diámetro pequeño y alcanzar altas eficiencias. Por lo anterior una ventaja adicional de Electrochromatografía Capilar es el perfil de flujo en un sistema bajo presión es parabólico, mientras que en un sistema conducido eléctricamente el flujo es plano y por lo tanto mucho más eficiente y con análisis muy cortos. (Smith Norman, 1999, Pp. 35-38, 64-65)

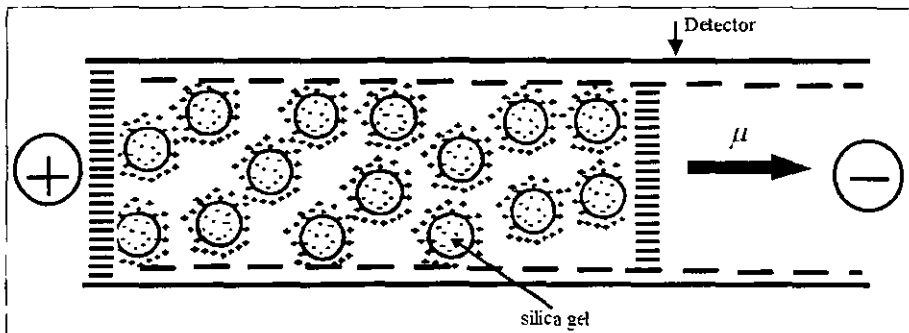


ESQUEMA 18. COMPARACIÓN DE PERFILES DE FLUJO.

La Electro cromatografía Capilar es capaz de generar hasta 500.000 platos/metro, muchos más que la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución convencional. Sin embargo, la Electro cromatografía Capilar tiene actualmente algunas limitaciones, por ejemplo no puede separar analitos con movilidades electroforéticas muy similares. Aunque la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución predice un aumento en la eficiencia con la disminución del tamaño de partícula, las exigencias en el sistema de bombeo limitan el uso de partículas muy pequeñas. (Smith Norman, 1999, Pp. 35-38, 64-65) Por todo lo anterior podemos decir que la Electro cromatografía Capilar y la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución son técnicas que se complementan.

En el proceso de Electro cromatografía Capilar:

- En la porción cromatográfica: existe la interacción del analito con la fase estacionaria
- En la porción electroforética: la migración de los analitos cargados en un campo eléctrico, es provocada por el flujo electroosmótico.



ESQUEMA 19. ELECTRO cromatografía EN CAPILARES EMPACADOS CON PARTÍCULAS DE SÍLICA GEL.

La Electro cromatografía puede combinar los mecanismos de dos o más métodos de separación completamente diferentes. (Sánchez, 2001, Pp. 34, Smith N., 1999, Pp. 35-38, 64-65)

Los mecanismos de separación están dados por:

- a) **Interacciones hidrofóbicas:** la diferencias en la hidrofobicidad entre la fase móvil y el analito.
- b) **Intercambio iónico:** las diferencias en las interacciones electrostáticas entre la fase estacionaria y el analito.
- c) **Migración Electroforética:** Determinada por el radio iónico y la proporción de la carga del analito.

En el empaçado de las columnas, el diámetro de partícula tiene un efecto sobre el perfil de flujo, así como la composición de la fase móvil influye sobre la electroósmosis. Para poder realizar la separación de analitos que tienen una movilidad electroforética muy similar, se ha logrado adicionando un ion polímero (con carga opuesta al analito) como modificador en la separación de la solución. Esta técnica es llamada de intercambio iónico de polímeros, la selectividad es incrementada con la formación de reacciones de un complejo de par iónico. (Marina, 1994, Pp. 1411-1433)

#### Tipos de rellenos usados en Electro cromatografía Capilar.

- Empacadas.
- Columnas monolíticas.
- Columnas tubulares abiertas.
- Fases Pseudoestacionarias. (Paul R. Haddad, 1999, Pp. 40-55)

#### Ventajas:

- Selectiva.
- Disminuye el tamaño de partícula: el flujo electroosmótico generado no es significativo como la presión, la cuál permite usar partículas de  $3\mu\text{m}$  o menos, generando alta eficiencia en las separaciones, mejorando el pico significativamente.

- Instrumento a usar: La Electro cromatografía Capilar, Electroforesis Capilar y la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución pueden realizarse en un solo instrumento, reduciendo los costos.
- Disminución en el gasto de solventes.
- Analitos insolubles en agua: este tipo de separaciones son largas y difíciles en Electroforesis Capilar, sin embargo el uso de solventes orgánicos en Electro cromatografía Capilar permite alta eficiencia en las separaciones de especies insolubles en agua como los esteroides.
- Detección a bajas longitudes de onda: la trayectoria de detección es corta en Electro cromatografía Capilar, permitiendo detectar a bajas longitudes de onda así como de 200 nm donde muchos analitos tienen actividad ultravioleta.
- Compatible a Espectroscopia de Masas (EM): La separación de especies neutrales en Electroforesis Capilar generalmente se realiza por Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar (CCEM) usando micelas iónicas así como Dodecil Sulfato de Sodio. los analitos neutrales pueden detectarse directamente usando Electro cromatografía Capilar compatible con EM.
- Rápida Separación: La producción de gran cantidad de platos teóricos permite la reducción del tiempo de análisis. Se pueden aplicar altos voltajes en pequeños capilares empacados, produciendo separaciones muy rápidas.

#### Desventajas:

- Repetibilidad de columna a columna.
- Disponibilidad comercial de los capilares: son caros y escasos.
- Electro cromatografía Capilar Preparativa: La habilidad micro-preparativa, es similar a la Electroforesis Capilar y sólo representa una pequeña fracción de la gran cantidad que pueden ser colectadas en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. (Altrio, 1998, Pp. 206-211; Paul R. Haddad, 1999, Pp. 40-55)

ALGUNOS EJEMPLOS DE SEPARACIONES REALIZADAS CON ESTA MODALIDAD SON:

*Eurby* y Colaboradores separaron dos diasterómeros en 10 minutos, sería imposible realizarla por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución usando fases estacionarias similares, se realizó con 180,000 platos /m en la columna de Electro cromatografía Capilar.

*Smith y Evan* realizaron separaciones eficientes de soluciones que contienen esteroides, prostaglandinas, intermediarios sintéticos de compuestos poliaromáticos, y la resolución simultánea de diastereoisómeros del antibiótico cefuroxime axetil.

*Mayer y Shuring* hicieron separaciones quirales, de enantiómeros de Ibuprofeno, flurbiprofeno, cicloprofeno, etodolac, 1-pheniletanol y 1,1'-binaftil-2,2'-dihidrogenofosfato; usando  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrinas. (Altria, 1998, Pp 206-211)

# CAPÍTULO 5

# INSTRUMENTACIÓN



## 5. INSTRUMENTACIÓN.

La automatización de la electroforesis en tubos capilares alcanzada en los últimos años ha aumentado el interés en esta técnica analítica. Ahora se pueden encontrar diferentes modelos de los equipos de electroforesis capilar, de acuerdo a las necesidades de los usuarios. La aplicabilidad práctica de cualquier método analítico vive y muere con el acceso adecuado a su instrumentación. (Fanali S., 1990, Pp. 693-702; Skoog, 2001, capítulo 30)

Todos los modos electroforéticos se pueden realizar, en principio, usando el mismo equipo. El equipo consiste básicamente de las siguientes partes: depósitos para el electrolito soporte, el capilar, un par de electrodos (situados junto a los extremos del capilar, en los depósitos), el sistema de enfriamiento (normalmente se utiliza un ventilador o bien un sistema de refrigeración líquido), una fuente de poder, un detector (que es el que recibe la señal del analito) y un sistema de adquisición de datos.

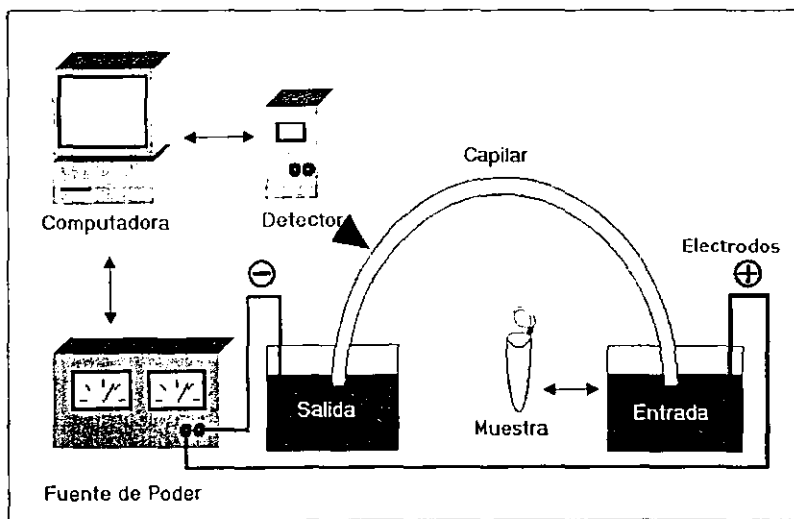


FIGURA 19. SISTEMA ELECTROFRÉTICO GENERAL.

### Pasos a seguir en una Separación Electroforética:

1. El capilar se lava con una solución de hidróxido de sodio 0.1 - 1M para retirar las posibles impurezas y activar los grupos silanol de la sílice fundida, de la que está constituido el capilar. Los lavados se llevan a cabo aplicando presión o vacío.
2. Se enjuaga el capilar con agua para retirar el exceso de hidróxido de sodio.
3. Se enjuaga el capilar con el electrolito soporte a utilizar, (dependiendo la muestra a analizar) quedando éste con electrolito soporte en su interior.

Los electrodos de platino están conectados a la fuente de poder y sumergidos en los depósitos que contienen electrolito soporte limpio, junto con los extremos del capilar.

4. La introducción de la muestra en el capilar se puede realizar ya sea hidrodinámica o electrocinéticamente (ver el siguiente apartado).
5. Una vez que la muestra se encuentra dentro del capilar, entonces se aplica una diferencia de voltaje (o de corriente) que puede ser hasta de  $\pm 30\text{kV}$  (200mA).

Entonces las especies iónicas comienzan a migrar con la dirección y velocidad determinadas por su carga y masa. Las especies iónicas, pasan por el detector que puede estar situado en el extremo del tubo capilar opuesto al sitio de inyección de la muestra (detector Ultravioleta-Visible), o bien en cualquier parte del tubo capilar (detectores electroquímicos).

6. La señal analítica obtenida del detector (cualquiera que éste sea), es adquirida y evaluada por computadora.

## 5.1 INTRODUCCIÓN DE LA MUESTRA O TÉCNICAS DE INYECCIÓN.

Los objetivos de la introducción de la muestra es que ésta entre al capilar de una manera adecuada y reproducible. Es un paso importante puesto que en EC los capilares tienen un diámetro interno pequeño (entre 25 y 200  $\mu\text{m}$ ), por lo que el volumen de muestra se limita a sólo algunos nanolitros<sup>53</sup> (nL); grandes volúmenes provocan ensanchamiento de picos y pueden afectar la separación.

La magnitud de la inyección se vuelve un parámetro más crítico cuando se quiere hacer una preconcentración. En general, la cantidad de muestra debe ser menor del 1-2% del total de la longitud del capilar. Esto corresponde a una longitud de inyección de pocos milímetros (correspondientes a 1 - 50nL) dependiendo de la longitud y del diámetro interno del capilar. Esto es una ventaja cuando el volumen de la muestra es pequeño (e.g. 5 microlitros) pues se pueden realizar numerosas inyecciones con una sola muestra, por otro lado, volúmenes pequeños aumentan las dificultades de sensibilidad para muestras diluidas.

La sobrecarga de muestra puede tener dos efectos significativos, y los dos perjudican la resolución:

- 1) Si la magnitud de la inyección es más grande que el ensanchamiento de pico, entonces este será proporcional al ancho del pico.
- 2) Esto puede alterar la homogeneidad del campo y distorsionar la forma del pico provocada por la mala conductividad entre el electrolito soporte y la de la muestra.

Ahora bien la inyección cuantitativa de la muestra se puede lograrse por diversos métodos; los dos más usados son el hidrodinámico y el electrocinético. Algunas veces el volumen de la muestra no es cuantitativo aunque puede calcularse. (Heiger, 1997, Pp. 77-108)

---

<sup>53</sup> Nanolitros unidades de volumen del orden de  $1\text{E}-9$  Litros.

### 5.1.1 INYECCIÓN HIDRODINÁMICA.

La inyección hidrodinámica también llamada inyección neumática, se realiza mediante diferencia de presión, por bombeo o bien por vacío, es decir, forzando la introducción de la muestra al capilar. Este es un sistema confiable y no selectivo. Con un control preciso de la presión y el tiempo de inyección se pueden obtener inyecciones altamente reproducibles. (Rivero V., 1996, Pp. 12-13)

#### Modalidades de la Inyección Hidrodinámica.

- ✓ Se puede usar la *presión de un gas* para forzar que la solución de la muestra entre en el capilar.
- ✓ La *inyección por vacío* se realiza, como su nombre lo indica, provocando vacío que arrastra la solución de la muestra dentro del capilar. Con el control preciso del vacío (presión) entre 25 y 100mbar y del tiempo, comúnmente de 0.5 a 5 s respectivamente, se obtienen inyecciones altamente reproducibles.
- ✓ Una inyección *típica por sifón* se obtiene levantando el depósito de la muestra de 5 a 10 cm relativo a la salida del reservorio de 10 a 30 segundos. Es importante que la duración de la inyección sea corta (1 - 5 s), y los niveles líquidos de los reservorios de electrolito soporte y de muestra deben ser iguales. La inyección por sifoneo puede provocar una reproducibilidad pobre del área de pico. (Rivero V., 1996, Pp. 12-13)

Con la inyección hidrodinámica, la cantidad de muestra inyectada es independiente a la matriz de la muestra. El volumen de la muestra introducida estará en función de las dimensiones de los capilares, la viscosidad del electrolito soporte en el capilar, la presión aplicada y el tiempo.

Este volumen puede ser calculado usando la ecuación Hagen-Poiseville:

$$\boxed{Volumen = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L}} \quad (27)$$

donde :  $\Delta P$  = diferencia de la presión a través del capilar.

$d$  = diámetro interno del capilar.

$t$  = tiempo

$\eta$  = viscosidad del electrolito soporte

$L$  = longitud total del capilar.

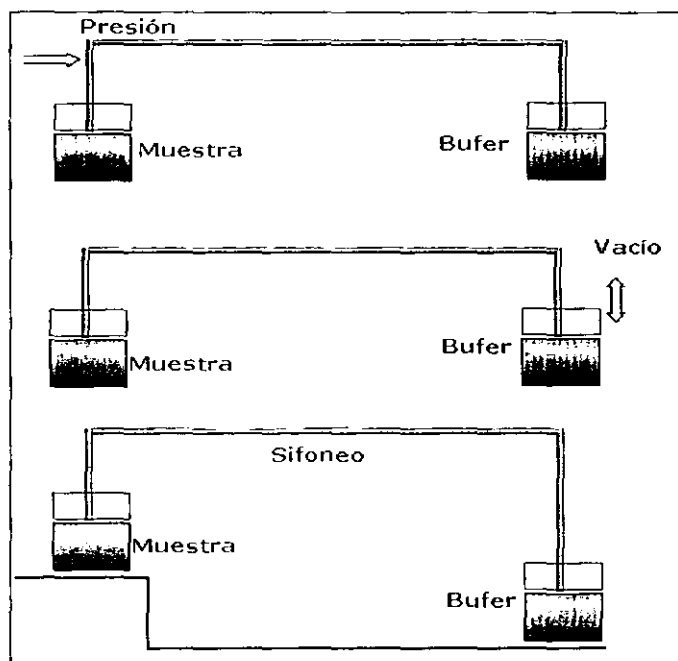


FIGURA 20. TIPOS DE INYECCIÓN HIDRODINÁMICA.

Para la *inyección por sifón* la presión diferencial está dada por:

$$\boxed{\Delta P = \rho g \Delta h} \quad (28)$$

donde:  $\rho$  = densidad del búfer

$g$  = constante gravitacional

$\Delta h$  = diferencia de altura de los reservorios.

Usualmente la reproducibilidad de la inyección disminuye con tiempos cortos de inyección debido a las limitaciones instrumentales, esto es particularmente cierto cuando se emplea un capilar corto y/o ancho, o cuando son usadas muestras muy concentradas. Es necesario además tener un control preciso de la temperatura del capilar para mantener constante el volumen de inyección. La cantidad de muestra inyectada varía entre un 2 y 3% por cada °C de diferencia en el capilar por los cambios en viscosidad del buffer en el capilar. La viscosidad de la muestra no afecta significativamente al electrolito soporte pues la cantidad de muestra generalmente es sólo un volumen muy pequeño relativo al total del líquido en el capilar. (Rivera V., 1996, Pp. 12-13; Heiger, 1997, Pp. 77-108)

### 5.1.2 INYECCIÓN ELECTROKINÉTICA

La inyección electrokinética se realiza mediante la electromigración de los iones presentes en la muestra al aplicarse un campo eléctrico, por lo que el Flujo Electroosmótico es un factor que afecta esta modalidad de inyección. (Rivera V., 1996, Pp. 12-13; <http://www.ntri.tamuk.edu/ce/laser-induced.html>, Mayo 16, 2001)

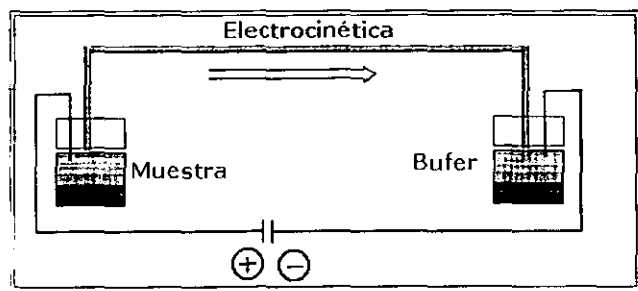


FIGURA 21. INYECCIÓN ELECTROKINÉTICA.

La muestra es introducida aplicando un pequeño voltaje, normalmente de 5kV (positivo o negativo), por un tiempo determinado (normalmente 5 - 15 segundos). El voltaje provoca que los iones de la muestra (cationes o aniones, dependiendo del signo del voltaje aplicado) migren selectivamente al interior del capilar. Siendo que los distintos componentes de la muestra migran en distintas proporciones, la cantidad de cada

componente que entra al capilar es distinta a la presente en la muestra. Con esta modalidad de inyección, por un lado se tiene la ventaja que es una inyección selectiva, solo un tipo de iones entra al capilar y los componentes neutros no se introducen, sin embargo, por otro lado al realizarse la inyección ésta modifica la composición de la muestra y, por lo tanto, ésta no puede volver a ser utilizada para fines de cuantificación. Un hecho importante es que la inyección electrocinética es la única que puede utilizarse con capilares llenos de gel. (Heiger, 1997, Pp. 77-108)

La única propiedad de la inyección electrocinética es que la cantidad cargada depende de la movilidad electroforética del analito. La discriminación para las especies iónicas ocurre desde que los iones más móviles tienen más carga que los iones menos móviles.

La cantidad inyectada,  $Q$  (gramos o moles), puede ser calculada por la ecuación (29):

$$Q = \frac{(\mu_e \mu_{FEO})}{L} V \pi r^2 C t \quad (29)$$

Donde:  $\mu_e$  = movilidad electroforética del analito

$\mu_{FEO}$  = movilidad del FEO

$V$  = Voltaje

$R$  = radio del capilar

$C$  = concentración del analito

$t$  = tiempo

$L$  = longitud total del capilar.

Como se describe en la ecuación (29), la introducción de la muestra cargada es dependiente del FEO, la concentración de la muestra y la movilidad de la muestra. Las variaciones de conductividad en las muestras, pueden deberse a la gran cantidad de iones no detectados como el sodio o cloro, provocando diferencias en el voltaje y por lo tanto diferencias en la cantidad de muestra inyectada. Debido a éste fenómeno la inyección electrocinética generalmente no es tan reproducible como lo es la inyección hidrodinámica. A pesar de las limitaciones cuantitativas de la inyección

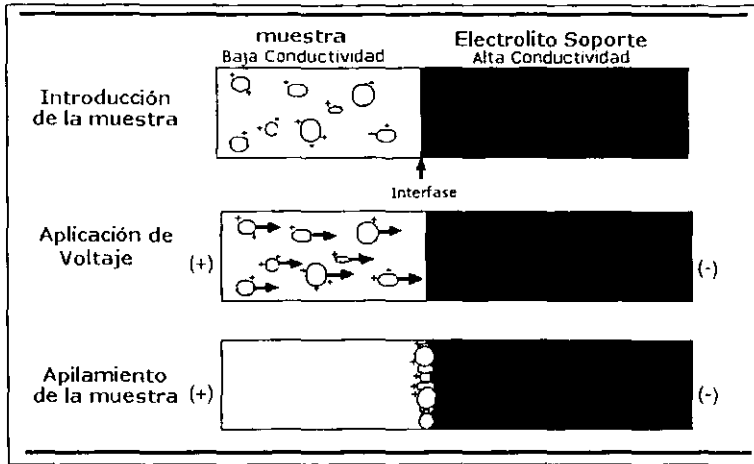
electrocinética, es un proceso muy simple, no requiere de instrumentación adicional, y es una ventaja cuando se emplean medios viscosos o geles en el capilar pues la inyección hidrodinámica en esos casos es ineficiente. (Heiger, 1997, Pp 77-108; Paul H., 2000. Pp. 1-23)

### 5.1.3 APILAMIENTO O PRECONCENTRACIÓN

Distintas técnicas han sido utilizadas para mejorar la sensibilidad del capilar por medio de la concentración de la muestra antes o durante la inyección. El apilamiento es un fenómeno que se puede dar al introducir la muestra, que concentra y afina la zona de la muestra; para ello la muestra debe ser disuelta en un electrolito soporte con menor conductividad que el electrolito soporte a utilizar para la separación, generalmente se usa agua desionizada o una dilución del electrolito soporte utilizado. Después, se debe inyectar un volumen relativamente grande de la muestra usando un método hidrodinámico o hidrostático (Landers J., 1993, Pp.26-28, 64-66). Esta técnica es más conocida como **preconcentración**.

El apilamiento se basa en las diferentes fuerzas del campo eléctrico entre la zona de la muestra y la del electrolito soporte con base a las diferentes conductividades existentes entre la muestra y el electrolito soporte. Aplicando un cierto voltaje, el campo eléctrico provocará que los iones de la muestra migren más rápido hacia el electrolito soporte pero una vez que los iones alcanzan al electrolito soporte, el campo eléctrico es allí menor y entonces migran más lentamente, esto continua hasta que los iones en la zona de muestra se concentran en una zona pequeña; como se muestra en la figura siguiente. (Heiger, 1997, Pp. 77-108)





ESQUEMA 20. MECANISMO DE APILAMIENTO DE LA MUESTRA.

Los iones de la muestra aumentan su movilidad electroforética en un medio con baja conductividad. Así que cuando se aplica el voltaje, los iones de la muestra se aceleran instantáneamente hacia la zona de separación adyacente donde se encuentra un medio con mayor conductividad, provocando una disminución en la movilidad electroforética y el apilamiento de los iones de la muestra en ésta zona.

La razón de que la migración de analitos sea más rápida en un electrolito soporte diluido se encuentra en la Ley de Ohm ( $I = E / R$ ), que establece que "la corriente que circula en el capilar es directamente proporcional a la diferencia de potencial aplicada en los electrodos e inversamente proporcional a la resistencia eléctrica del circuito". Si la resistencia y la fuerza del campo eléctrico en la zona del electrolito soporte diluido es más grande que en la zona del electrolito soporte, entonces, la velocidad del ion es mayor en dicha zona, así, los iones de la muestra se desacelerarán al llegar a la zona de electrolito soporte (de mayor conductividad), formando una región con alta concentración de muestra. (Altria K., 1996, Pp. 13-23; Heiger, 1997, Pp. 77-108; Laver H., 1991, Pp. 45-60; <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/cromal/html>, Marzo 22, 2001)

TABLA 7. FACTORES QUE AFECTAN LA PRECISIÓN DE LA INYECCIÓN.

CONSIDERACIONES MAYORES	COMENTARIOS
Estándar interno	Se usa cada vez que sea posible, mejora la precisión
Temperatura constante	Siempre se usa
Alta concentración de la muestra	Considera la solubilidad de los analitos
Tiempo de inyección	Evitar tiempos menores a 1-2 segundos
Inyecciones Pre-acondicionamiento	Realizar 2 inyecciones en blanco
Viscosidad de la muestra	Igualar los estándares con las muestras
Composición del electrolito	Reducir los efectos del agotamiento
CONSIDERACIONES MENORES	COMENTARIOS
Nivel de búfer	Controlar visualmente
Nivel de muestra	Controlar visualmente
Inyección del electrolito	Asignar un vial para lavado y otro para la separación
Corriente constante	Asignar experimentalmente

(Altria K., 1993, Pp. 245-257; Altria K., 1998, Pp. 1-6)

## 5.2 EL CAPILAR.

Puede ser de distinta naturaleza: vidrio, sílice fundida o teflón. Recientemente también otros materiales tales como polipropileno y nylon pueden ser utilizados. Comúnmente se utilizan aquellos hechos de sílice fundida porque ésta posee una excelente transparencia a la radiación ultravioleta (UV) y visible (VIS). Los capilares de sílice fundida son química y eléctricamente inertes, y baratos. Los tubos capilares utilizados miden de 50 a 100 cm de largo, usualmente con un diámetro interno entre 10 y 200  $\mu\text{m}$  y un diámetro externo entre 200 y 500  $\mu\text{m}$ . Los capilares de sílice fundida están normalmente recubiertos por un polímero, generalmente poliamida, la cuál facilita su manipulación dándoles flexibilidad. Recientemente los capilares rectangulares para ECZ se han descrito en orden para mejorar la eficiencia de la separación y realizar separaciones bidimensionales pero son muy poco utilizados. (Foret, 1998, Pp.135-186)

Los tubos capilares de sílice fundida recubiertos con una capa de poliimida son usados principalmente por su:

- ✓ Flexibilidad
- ✓ Alta conductividad (grupos silanol)
- ✓ Transparencia UV-VIS
- ✓ Posibilidad de modificación de la superficie interna

Otro material que se puede usar es el teflón, pero tiene algunas limitaciones:

- ❖ Pobre conductividad térmica
- ❖ Diámetro interno relativamente grande  $> 100 \mu\text{m}$

La longitud total de los capilares comúnmente utilizada en la actualidad es de 20-70cm, con un diámetro interno de 50 ó 75  $\mu\text{m}$ . La miniaturización de los capilares en EC aumenta la proporción superficie - volumen, al mismo tiempo que aumenta la influencia de las propiedades físicas y químicas de la superficie del capilar sobre el proceso de separación. Esta proporción puede influenciar, ya sea en el FEO o en las interacciones pared-analito, y ésta a su vez depende de las propiedades fisicoquímicas de la pared del capilar, la naturaleza del analito y las propiedades del búfer empleado. (Heiger, 1997, Pp. 77-108; Marina, 1994, Pp 1411-1433).

Las modificaciones al capilar se realizan para:

- ✓ Controlar el FEO
- ✓ Mejorar la reproducibilidad del FEO
- ✓ Prevenir las interacciones pared-analito:

Por otra parte, la selección del tubo capilar se realiza principalmente con base en la naturaleza de los analitos y el sistema de detección utilizado. Un problema que se ha observado cuando se trabaja con ECZ es que algunas sustancias son adsorbidas en las paredes del capilar de sílice fundida, provocando un ensanchamiento significativo de picos y disminuyendo la eficiencia. Este inconveniente se ha reportado principalmente

cuando se trabaja con proteínas. Para evitar la adsorción se han tomado distintas medidas:

1. Adición de agentes químicos como modificadores orgánicos, iones metálicos, surfactantes, etc., pero que pueden modificar la separación de los analitos
2. Manipulación de la carga eléctrica de las proteínas y de los grupos silanol de la pared del capilar, para prevenir la adsorción.
3. Operar a bajos pH's para eliminar las cargas en la superficie de la sílice.
4. Controlando la temperatura del capilar (usualmente éste efecto es de menor importancia)
5. Recubrir la pared del capilar con algún compuesto (poliimida por ejemplo).

Existen básicamente dos formas de modificar la pared del capilar:

1. Recubrimiento estático del capilar: incluye la modificación química de la superficie interna del capilar y es un proceso permanente.
2. Recubrimiento dinámico del capilar: se realiza colocando algún aditivo (por ejemplo: tensoactivos iónicos o cationes metálicos) al electrolito soporte y es un proceso reversible en la mayoría de los casos. (Marina, 1994, Pp.1411-1433)

### 5.2.1 ACONDICIONAMIENTO.

Uno de los factores que generalmente presenta los mayores problemas en electroforesis capilar, es la reproducibilidad en los tiempos de migración. El factor más importante a controlar para tener buena reproducibilidad es el acondicionamiento (lavado) del capilar. Cuando se tiene un capilar nuevo, primero se necesita remover algún compuesto adsorbido en la pared del capilar y restaurar la superficie del capilar (por desprotonación de los grupos silanol) utilizando hidróxido de sodio (NaOH) de concentración 0.1 - 1M. Después, se lava el capilar con agua desionizada para eliminar el hidróxido de sodio y por último, se introduce el electrolito soporte en el capilar. El acondicionamiento comúnmente se realiza introduciendo al capilar la(s) solución(es) deseada por medio de presión.

Como paso previo a cualquier análisis generalmente se realiza un procedimiento de lavado el cual debe de ser optimizado con base al tipo de muestra y analitos de interés.

Puesto que un mismo capilar puede ser utilizado para diferentes separaciones, un lavado en el cual se emplean algunas veces, solventes orgánicos como metanol o dimetilsulfóxido, para asegurar la eliminación de ciertos componentes en el capilar puede ser necesario y altamente recomendable.

### 5.3 SISTEMA DE ENFRIAMIENTO.

El sistema de enfriamiento debe aislar al capilar de los cambios ambientales y disipar el calor generado durante la separación. Controlar la temperatura del capilar es muy importante para que la operación sea reproducible, al igual que los datos adquiridos. La regulación de la temperatura en  $\pm 0.1^\circ C$  es considerada adecuada, debido a que la viscosidad del electrolito soporte depende de este factor, y esto a su vez, afecta la reproducibilidad de la inyección de la muestra y el tiempo de migración. Existen dos modos de enfriamiento:

- 1) Utilizando aire, por medio de un ventilador o
- 2) Empleando un líquido. El sistema de enfriamiento líquido es teóricamente más eficiente, que la fuerza del aire que corre a una velocidad de  $\approx 10$  m/s, pero el enfriamiento con aire es usualmente es suficiente para la cantidad de calor generado en EC.

La ventaja de los sistemas de enfriamiento de aire es que su instrumentación es simple y fácil de usar (Heiger, 1997, Pp. 77-108)

#### 5.4 FUENTE DE PODER O VOLTAJE.

En EC la fuente de poder es usada para aplicar hasta 30 kV y niveles de corriente de 100 a 300mA. La regulación del voltaje ( $\pm 0.1\%$ ) es requerida para mantener la alta reproducibilidad en el tiempo de migración. La fuente de poder debe tener la capacidad de cambiar la polaridad, es decir, que el ánodo sea ahora el electrodo a la salida del capilar, lo cual por supuesto afectará la dirección del FEO. Los primeros equipos de EC incluían el cambio de polaridad manual y directamente en el equipo, pero en los nuevos, la polaridad es controlada con el *software*, lo cual es un beneficio, especialmente si el cambio se desea durante el análisis.

Aunque los análisis a voltaje constante son los más comunes, a menudo es beneficioso utilizar tanto el modo de corriente o poder constante. El método de corriente o poder constante es particularmente útil en isotacoforesis o bien, cuando los cambios de temperatura de los capilares alteran la viscosidad del búfer y el tiempo de migración, al emplearse un modo de voltaje constante. Utilizando el modo de corriente constante, los cambios de viscosidad son compensados por cambios proporcionales en el voltaje aplicado, manteniendo constante el tiempo de migración.

Otra característica de la fuente de poder es la habilidad de realizar gradientes de voltaje, corriente o de potencia durante un análisis. En esta programación se puede utilizar primero en un análisis una rampa de voltaje para evitar calentamiento rápido, expansión térmica del búfer, expulsión de la muestra del capilar. Además, este tipo de programación es particularmente utilizada para disminuir los tiempos de análisis de las muestras complejas y es necesaria para realizar la colección de fracciones. (Foret, 1998, Pp.135-186; Heiger, 1997, Pp 77-108)

#### 5.5 SISTEMAS DE DETECCIÓN.

Uno de los aspectos más desarrollados por la EC es el área de los sistemas de detección. Existen numerosos métodos que han sido usados en EC, de los cuáles muchos son similares a los empleados en Cromatografía de Líquidos. La detección en

EC es un reto, ya que las dimensiones del capilar son muy pequeñas, además de que se requieren volúmenes de muestra en el orden de nanolitros.

- i.) La concentración de la muestra debe de ser más pequeña que la concentración del búfer, a fin de evitar que se produzcan cambios en el gradiente de potencial. Éste factor produce migraciones irregulares y una zona asimétrica, por lo que se recomienda retener la concentración del analito a niveles bajos.
- ii.) El uso de capilares requiere pequeños volúmenes de muestra para eliminar la posibilidad de sobrecarga.

Es precisamente en los sistemas de detección, donde existe una gran limitante en Electroforesis Capilar dado el volumen de muestra empleado, desgraciadamente, la mayoría de detectores sensibles disponibles son también los más selectivos. Parte de la investigación en EC está orientada para diseñar detectores más sensibles y al mismo tiempo de detección universal.

Los detectores que se pueden utilizar en EC son:

- Espectrofotométricos: UV/Vis (arreglo de diodos), Fluorescencia.
- Electroquímicos:
  - Conductimétricos (conductividad).
  - Amperométricos (corriente).
  - Potenciométricos (potencial).
- Espectrométricos: Espectrómetro de Masas (EM)
- Sistemas Acoplados:
  - Plasma Acoplado Inductivamente (ICP) - Espectrómetro de Masas
  - Electro-aspersión - Espectrofotometría de Absorción Atómica

**Un detector Ideal;** es aquel que es sensible a bajas concentraciones de cualquier analito, da una respuesta lineal (señal proporcional a la concentración de analito) en un amplio intervalo de concentraciones, y genera un ensanchamiento nulo de los picos de elución. Asimismo debe ser insensible a los cambios de temperatura y de composición del electrolito soporte. (Skoog, 2001, capítulo 30)

### 5.5.1 DETECCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

La absorción Ultravioleta-Visible (UV/VIS) es la más ampliamente usada como método de detección en EC primeramente debido a su naturaleza *casi universal* en la detección, y a que los capilares de sílice fundida permiten la detección por debajo de 200nm (hasta 180nm en el mejor de los casos) o por arriba, cubriendo el espectro visible (325 - 800nm). La alta eficiencia en EC es debida en parte a la detección "en línea", pues la ventana óptica es directamente una parte del capilar, evitándose una zona de ensanchamiento como resultado del volumen muerto o de los componentes de la mezcla; la separación está ocurriendo aún mientras se detecta en la ventana. (Heiger, 1997, Pp. 77-108; Marina, 1994, Pp.1411-1433)

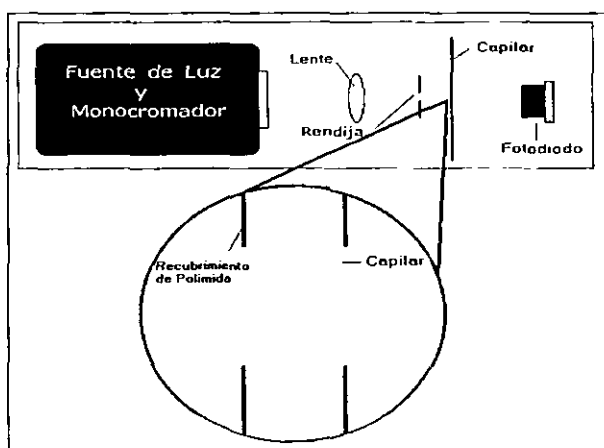


FIGURA 22. DETECTOR ULTRAVIOLETA/VISIBLE.

Para la detección espectrofotométrica se utiliza el capilar de sílice fundida después de remover el recubrimiento externo de poliimida a aproximadamente 1 cm del capilar y, colocando éste entre la salida del monocromador y el detector óptico fotomúltiple (ultravioleta-visible o fluorimétrico).

Utilizando un detector óptico, el ancho en la región de detección debe ser relativamente pequeño en relación a la zona más ancha del analito para mantener la



alta resolución. Los picos en EC son típicamente de 2 a 5 mm de ancho, por lo que la longitud de la abertura debe ser máximo un tercio de esta cantidad. (Altria K., 1993, Pp. 245-257; Marina, 1994, Pp.1411-1433)

El diseño del detector es crítico debido a la pequeña longitud del paso óptico. El rayo de luz óptico debe ser enfocado y ajustado directamente en el capilar para obtener el máximo rendimiento del proceso en la abertura y minimizar la luz externa que alcanza el detector. Estos aspectos son importantes tanto para la sensibilidad como para el rango de detección lineal. Para los detectores la absorbancia de un analito es dependiente de la longitud de la trayectoria,  $b$ , concentración  $C$ , y la absorptividad molar  $\epsilon$ , como se define en la ley de Beer ecuación (30).

$$A = bC\epsilon \quad (30)$$

Una mayor pendiente, indica una mayor sensibilidad de detección.

La longitud del paso óptico puede ser determinado llenando el capilar con una solución de un analito de concentración y el coeficiente de absorptividad molar conocidos. Mayores sensibilidades se obtienen generalmente usando longitudes de onda del bajo UV, por ejemplo, los péptidos y carbohidratos, no son fuertes cromóforos pero pueden ser detectados adecuadamente a 200nm o por debajo. La detección en esas bajas longitudes de onda necesita el uso de un búfer con baja absorbancia de fondo a fin de que no incremente la línea base y no disminuya la señal del analito. Los búfer de fosfatos y boratos son los más apropiados en este aspecto, muchos sistemas amortiguadores llamados "biológicos" como HEPES, CAPS, y TRIS son inapropiados para usarse por debajo de 215nm. (Altria K., 1993, Pp. 245-257; Heiger, 1997, Pp. 77-108)

Siendo el detector ultravioleta-visible (UV/VIS) el de uso más común, se ha buscado el mejorar la sensibilidad de éste tipo de detección utilizando algunos capilares con

ciertas modificaciones (ver figura siguiente), a fin de (A) aumentar la longitud de paso óptico:

1. Aumentando el diámetro del capilar.
2. Utilizando de capilares rectangulares.
3. Celdas en forma de Z.
4. Celda en forma de burbuja.

O bien (B) amplificar la respuesta del detector:

5. Celdas con reflexión múltiple.

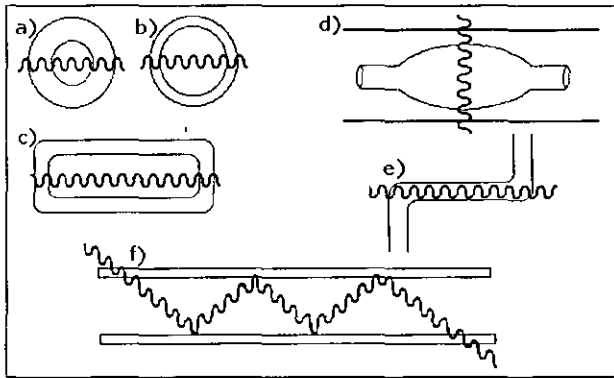


FIGURA 23. MODALIDADES DE CAPILARES PARA AUMENTAR LA SENSIBILIDAD DE LA DETECCIÓN UV/VIS

a) es un capilar normal, b) es un capilar con mayor diámetro, c) es un capilar rectangular, d) es una celda en forma de burbuja, e) celda en forma de "z", f) celda con reflexión múltiple

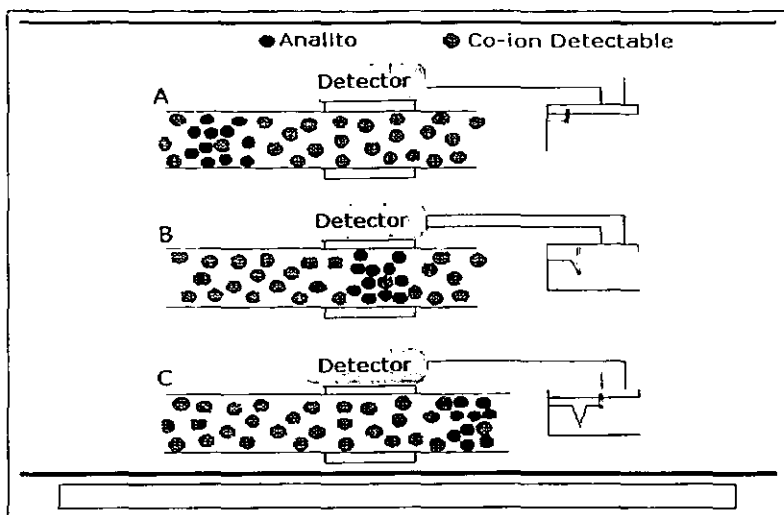
Las celdas tipo burbuja mejoran la sensibilidad incrementando ésta de 2-6 veces; y las celdas en forma de Z la pueden incrementar hasta 30 veces; la sensibilidad y la detección lineal pueden ser mejorados por el incremento del diámetro interno del capilar, pero ocasionan el subsecuente incremento en la corriente y el calentamiento dentro del capilar. Por ejemplo, el aumento de dos dobles en diámetro rendirá un aumento de dos dobles en absorbancia pero un aumento de cuatro dobles aumenta la corriente. (Claessens H., 1995, Pp. 113-140); Heiger, 1997, Pp. 77-108; Paul H., 2000, Pp. 1-23)

### 5.5.1.1 DETECCIÓN INDIRECTA.

Este tipo de detección es usada para los componentes de la muestra que tienen poca o no tienen absorbancia en la región UV-Visible. Para esta técnica, se adiciona al electrolito soporte un compuesto que absorbe en UV y/o Visible, como dicromato, naftaleno o salicilato. Esto proporciona al electrolito soporte la absorbancia "positiva", y los componentes de la muestra son detectados como picos negativos provocados por desplazamiento de las especies que absorben dentro de la zona de la muestra. La dirección de los picos puede ser invertida manipulando el eje de las absorbancias mediante el programa del equipo. La detección indirecta también puede realizarse empleando el mismo principio para detectores de fluorescencia.

Los esquemas de detección indirecta son universales y pueden ser usados empleando compuestos que poseen las propiedades físicas necesarias de la detección directa, por ejemplo: cromóforos o fluoróforos. La detección indirecta elimina la necesidad de columnas de derivatización para convertir el analito de interés en una especie con propiedades espectrofotométricas.

Como se muestra en el esquema 21, en la sección A, el co-ion detectable (dicromato, naftaleno o salicilato), proporciona al electrolito soporte y a la zona del analito (deficiente en la absorbancia del co-ion) la señal; en la sección B el paso de la zona del analito por el detector decrece la señal del electrolito soporte. Cuando el analito ha pasado completamente el punto de detección, el detector regresa la respuesta de la línea base original (sección C). Así el pico del analito es resultado del co-ion en el electrolito soporte detectado antes y después que el analito. (<http://www.waters-website/Applications/cia/cia-ovr3.htm> detección-UV, Mayo 17, 2001)



ESQUEMA 21. MECANISMO DE DESPLAZAMIENTO PARA LA DETECCIÓN INDIRECTA.

Generalmente la altura del pico no es usada para el análisis cuantitativo, la que se ocupa es el área del pico. El mayor problema con la altura del pico es su dependencia con los procesos que ocurren durante la inyección, por ejemplo, se puede producir un fenómeno de "concentración de la muestra" resultado de las diferencias entre la conductividad y concentración iónica de la muestra y el búfer (por efectos de la matriz), las diferencias entre el analito y la conductividad del búfer pueden provocar distorsiones en la extensión del pico que afectan su altura, pero no su área. Además, la altura del pico debe ser solamente usada cuantitativamente si la zona del analito es menor al 5% de la extensión del pico del detector. La altura del pico puede ser usada cuando la señal y la interferencia son bajas también por la integración precisa del área del pico. (Heiger, 1997, P: 77-108)

### 5.5.2 DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA.

La detección por fluorescencia es muy interesante por su alta sensibilidad, los detectores convencionales de fluorescencia trabajan con distintas lámparas de deuterio, mercurio, tungsteno, o xenón. Se usa una reja del monocromador para la

selección de la longitud de onda de excitación y longitud de onda de emisión de fluorescencia, empleándose un tubo fotomúltiple. Se puede usar como alternativa la selección de la longitud de onda en un filtro interferométrico. Los límites de detección en fluorescencia usualmente son en el rango de femtomoles ( $1E-18$ ). Los analitos de las muestras interactúan con el fluoróforo desplazándolo o formando un par iónico generando así una señal independiente de las propiedades del espectro dadas por el analito provocando una disminución en la señal del fondo de fluorescencia. Para mejorar los límites de detección se han utilizado detectores de fluorescencia para minimizar las contribuciones del fondo espectral causada por la sílice fundida del capilar.

Como no todos los compuestos poseen altas propiedades de fluorescencia, la detección de compuestos fluorescentes usualmente es complicada; etiquetan generalmente los analitos con un marcador fluorescente (Sulfato de quinina, fluoroescamina, cloruro de dansilo, orto-ftaldialdehído (OPA), isocianato de fluoresceína (FITC), etc. Los detectores de fluorescencia representan otra clase de detectores que son ampliamente usados en EC. (Heiger, 1997, Pp. 77-108; Marina, 1994, Pp.1411-1433)

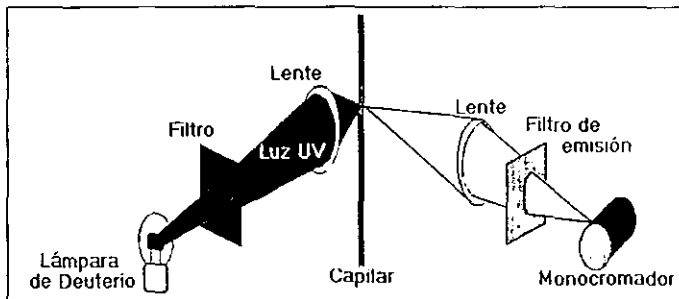


FIGURA 24. DETECTOR DE FLUORESCENCIA.

Los detectores espectrofluorimétricos comercialmente disponibles diseñados para Cromatografía de Líquidos pueden ser modificados para usarse en Electroforesis Capilar. La sensibilidad alcanzada con un buen detector espectrofluorimétrico

modificado, está en el rango de  $10^{-8}$ -  $10^{-9}$  mol/L<sup>54</sup> para una sustancia que fluoresce fuertemente (e.g. Sulfato de quinina) en un capilar de 75  $\mu$ m de diámetro interno. (Foret, 1998, Pp.--. Heiger, 1997, Pp. 77-108)

$$F = I_0 \phi (1 - 10^{-\epsilon cd}) \quad (31)$$

Y para muestras diluidas que absorben débilmente:

$$F = I_0 \phi (2.3025 \epsilon cd) \quad (32)$$

Donde: F = Fluorescencia

I = Intensidad de luz

$\phi$  = Rendimiento de la fluorescencia tiene valores entre 0 y 1.

La intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la intensidad de excitación y radiación. La ventaja de usar un láser como fuente de excitación es que ellos proveen alta intensidad de luz monocromática la cuál puede ser fácilmente enfocada dentro de la celda de detección del capilar.

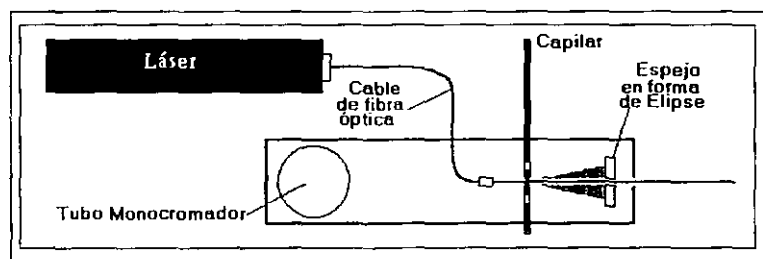
El esquema simplificado de fluorescencia inducida, detector para EC, se utilizan láseres UV con longitudes de onda que emiten 325-442 nm<sup>55</sup> o láseres de iones de argón con alta densidad de poder de luz emitida la cuál excede otras fuentes por ordenes de magnitud. Sin embargo la estabilidad de la radiación de láser es mayor del 0.1% en un modo ligero controlado el cuál armoniza o frecuentemente excede la estabilidad de otras fuentes de alta intensidad de luz. En la práctica los rayos pueden ser fácilmente enfocados también ajustando para evitar la posible saturación de estados excitados o la fotodegradación de sustancias fluorescentes, por ésta razón el límite superior de la irradiación láser debe ser un valor menor de  $10^5$  Wcm<sup>-2</sup>. Varios productores ofrecen láser para propósitos de detección en ECZ con cierto rango de miliwatts a 10Watts. (Foret, 1998, Pp.135-186)

<sup>54</sup> Mol/Litro, unidades de concentración molar de una solución, también puede expresarse por milimol/mililitro.

### 5.5.2.1 DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER

En el detector por Fluorescencia Inducida por Láser (FIL), la luz en forma de láser es dirigida al capilar por el cable de fibra óptica. El paso de luz está dirigido hacia el capilar y la salida hacia la abertura a través de un espejo elipsoidal. La abertura guarda el rayo láser para reflejarlo hacia el foto multiplicador. Cuando los componentes de la muestra entran al área iluminada, la luz fluorescente es emitida y reflejada al fotomultiplicador por el espejo elipsoidal.

Los detectores de Fluorescencia Inducida por Láser (FIL) son muy sensibles, pero muy caros; pueden detectar moléculas tan pequeñas y miles de ellas, un inconveniente en los detectores de FIL es que el número de longitudes de onda es limitado, usualmente la muestra debe ser derivada para producir fluorescencia a cierta longitud de onda.



ESQUEMA 22. DETECTOR POR FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LÁSER.

### 5.5.2.2 DERIVACIÓN

Los detectores de fluorescencia son especialmente sensibles, pero responden sólo a una muy limitada gama de analitos que fluorescen. Para incrementar la aplicabilidad de los detectores de fluorescencia y electroquímicos, es posible unir a los analitos deseados grupos químicos que sean fluorescentes o electro activos. (Skoog, 2001, capítulo 30) Esta *derivación* es comúnmente usada en la espectrofotometría de Fluorescencia,

<sup>55</sup> Nanómetros, unidades de longitud, del orden de  $10^{-9}$  metros.

para los componentes de la muestra que tienen poca o no tienen absorbancia en absoluto pero que pueden ser detectados convirtiéndolos a derivados con propiedades espectrofotométricas, por ejemplo:

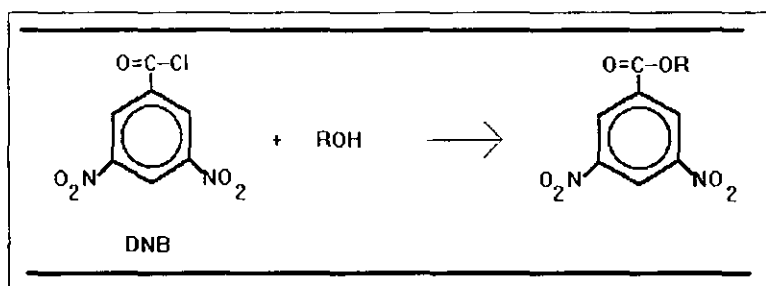


FIGURA 25. DERIVACIÓN DEL CLORURO DE DINITROBENZOILO (DNB).

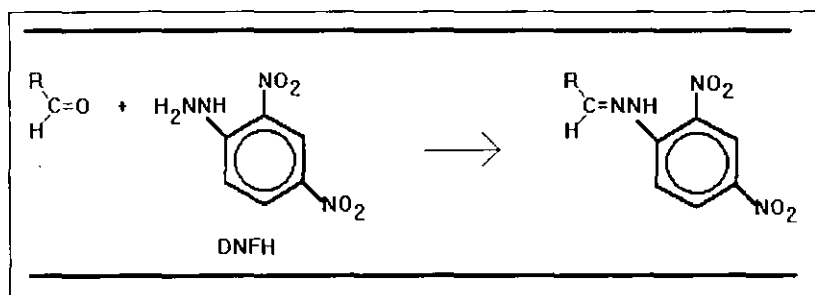


FIGURA 26. DERIVACIÓN DE LA 2,4-DINITROFENILHIDRAZINA (DNFH).

Las figuras 25 y 26 ilustran la derivación del cloruro de dinitrobenzoilo (DNB), reacciona con alcoholes, fenoles y aminas para formar dinitrofenilésteres y amidas altamente absorbentes a la luz ultravioleta; y de la 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNFH) al reaccionar con aldehídos y cetonas para formar Dinitrofenilhidrazona que absorbe la luz ultravioleta fuertemente.

La misma derivación química usada en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución puede usarse en Electroforesis Capilar, también puede realizarse la derivación para aplicar espectrofotometría de Ultravioleta-Visible, aunque esto es raro, normalmente



es más útil en la detección por fluorescencia ya que no todos los compuestos tienen propiedades de fluorescencia.

### 5.5.3 DETECCIÓN POR ARREGLO DE DIODOS

La detección por arreglo de diodos (en inglés Diode Array Detection DAD) es una alternativa a la detección individual o múltiple; consiste en un sistema con un lente acromático, un foco de luz en el capilar, donde el rayo de luz es dispersado por una rejilla de difracción; un DAD tiene numerosos diodos (211, por ejemplo) cada uno dedicado a medir los picos estrechos del espectro. El número de caídas de la longitud de onda en un fotodiodo es llamado *la anchura del pico*. La detección por DAD puede producir límites de detección, sensibilidad y un rango de detección lineal igual o mayor a los detectores individuales o múltiples. Con respecto al análisis espectral, el DAD también tiene ventajas significativas sobre los detectores de exploración rápida, ya que la proporción de ruido en la señal espectral es independiente al número de longitudes de onda adquiridas, la anchura del pico individual no está predeterminada y la línea base del espectro está disponible a todos los tiempos.

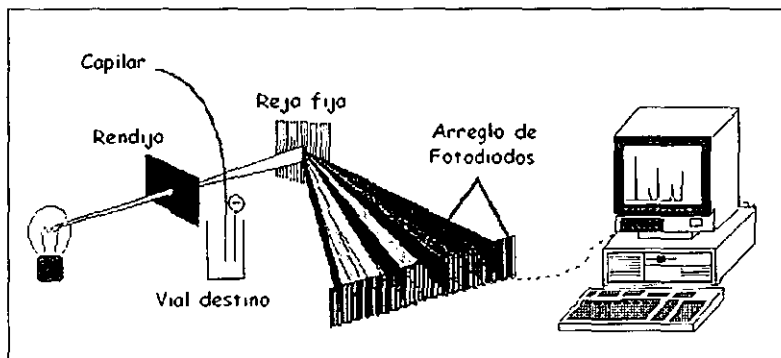


FIGURA 27. DETECTOR POR ARREGLO DE DIODOS.

El arreglo de diodos puede monitorear una muestra a más de una longitud de onda. Es de gran utilidad cuando la longitud de onda máxima de los analitos es diferente, permitiendo que la absorción de picos no relevantes puede minimizarse. La

cuantificación de los datos colectados puede reducirse a pocas longitudes de onda. (Claessens H., 1995, Pp. 113-140; Heiger, 1997, Pp. 77-108)

Es importante determinar que los picos electroforéticos sean puros o si se trata más de un analito. Con el detector de arreglo de diodos se puede examinar la pureza del pico si el espectro del analito y la impureza es diferente. El método más común involucra espectros que adquieren varios espectros durante la elución de los picos. Por la normalización y cruzamiento de espectros, pueden compararse los gráficos. Cuando la pareja de espectros es comparada sobre todas las longitudes de onda, el pico puede considerarse puro. Otro método de validación incluye examinar la proporción de absorbancia a dos longitudes de onda, con los datos sobre los gráficos en función del tiempo, supresión espectral, gráficos tridimensionales de los datos, y el componente principal del análisis.

#### *Ventajas:*

- ✓ El DAD produce espectros que ayudan a identificar picos
- ✓ Un DAD permite determinar también la pureza del pico
- ✓ La razón de absorbancia o espectro toma diferentes puntos a través del pico y descubre componentes ocultos.

#### *Desventajas:*

- ✓ Son más caros que el detector UV-Vis clásico.

### 5.5.4 DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA

El detector electroquímico es bastante selectivo, porque sólo ciertos analitos se oxidan o se reducen con facilidad. Por ejemplo, fenoles, aminas, aromáticas, peróxidos y mercaptanos pueden alterarse por oxidación, mientras que por reducción es posible detectar cetonas, aldehídos, nitrilos conjugados, compuestos halogenados aromáticos y compuestos nitro aromáticos. Los detectores electroquímicos son simples, y

extremadamente sensibles a aquellos analitos que pueden detectar. Es fácil medir corrientes del orden de los nanoamperes, que corresponden a límites de detección del orden de picogramos por mililitro. (Skoog, 2001, capítulo 30)

#### 5.5.4.1 DETECCIÓN CONDUCTIMÉTRICA.

La conductividad de un electrolito  $\kappa$  está dada por la concentración  $C_i$ , carga  $Z_i$  y la movilidad  $\mu_i$  de los compuestos iónicos disueltos:

$$\kappa = F \sum_i C_i Z_i \mu_i \quad (33)$$

donde  $F$  = Constante de Faraday<sup>56</sup>

Durante la separación electroforética la sustitución de algún ion del búfer por algún componente de la muestra con diferente movilidad origina un cambio de conductividad, el cuál es usado para la detección. La conductividad y el gradiente de potencial del detector son propiedades universales no selectivas. Se puede detectar la zona de alguna sustancia con la movilidad efectiva. La conductividad local incide en las distintas zonas de migración del búfer y ésta diferencia puede ser medida por un conductómetro.

La celda de detección de conductividad consiste en dos microelectrodos usualmente de platino proyectando hacia la pared del capilar, a la vez que están en contacto directo con la solución del electrolito. La resistencia de la solución entre éstos microelectrodos es monitoreada por un conductómetro usando la corriente y, la señal del detector es procesada por un sistema de adquisición e datos. La señal útil al detector durante la zona de migración hacia la celda de detección es proporcional a la diferencia en resistencias específicas de la zona pura del búfer. (Claessens H., 1995, Pp. 113-140; Foret, 1998, Pp.135-186)

<sup>56</sup> La constante de Faraday equivale a 96 487 Coulombs/ mol de carga.

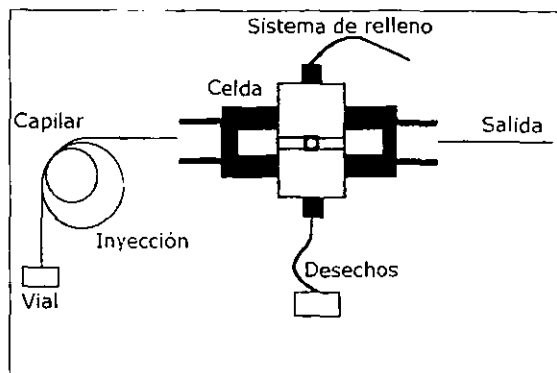


FIGURA 28. DETECTOR CONDUCTIMÉTRICO.

En el detector de conductividad (DC), la superficie metálica de los electrodos está en contacto directo con el búfer y debe ser tan pequeña como sea posible para minimizar el efecto de las reacciones del electrodo y así evitar la formación de burbujas durante el análisis. Normalmente se usan alambres delgados de menos de 0.05mm de diámetro de platino o es usada como electrodo una aleación de platino-iridio. La construcción de celdas del detector es análoga al uso de capilares en Isotacoforesis<sup>57</sup> sin embargo algunas de las nuevas celdas de detección han sido desarrolladas para EC también. La tecnología moldea, emplea y crea celdas de detección en bloques de resina de poliéster o la técnica de perforación por láser que fue usada para producir una celda de detección sobre columnas directamente en capilares de sílice. (Foret, 1998, Pp.135-186)

#### 5.5.4.2 DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA.

La detección amperométrica es una técnica, en donde las reacciones red-ox<sup>58</sup> de un analito al electrodo de detección produce una señal de detección. Obviamente ésta es una técnica activa donde se detectan iones que pueden ser oxidados o reducidos fácilmente durante su paso en la celda de detección. La amperometría es una técnica de detección de rutina en CLAR, y surge de los métodos voltamétricos desarrollados

<sup>57</sup> Modo electroforético de separación, que se basa en la velocidad de los analitos, usando un electrolito líder que tiene una mayor velocidad, que el electrolito terminal.

desde 1920. Desde un punto de vista práctico es importante conocer el rango de potencial de trabajo determinando el tipo de sustancias que pueden ser electroquímicamente detectadas.

#### 5.5.4.3 DETECCIÓN POTENCIOMÉTRICA

Los detectores potenciométricos están basados en la selectividad de los microelectrodos y en la habilidad de detectar cantidades extremadamente pequeñas de iones orgánicos e inorgánicos en pequeños volúmenes de muestra. La señal producida cuando el ion de interés es transferido por la corriente y pasa a través de la membrana del detector. La presencia del analito genera un cambio de potencial, diferencia dada entre la solución dentro del sensor y la muestra. Esta diferencia de potencial es medida por la actividad de los iones dada por la ecuación de Nerst y es directamente proporcional a la concentración del ion. La respuesta potenciométrica generalmente es rápida, evita y previene la distorsión del pico y puede calcularse la concentración del analito. (Skoog, 2001, Capítulo 30)

#### 5.5.5 DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas (MS del inglés Mass Spectrometry) representa a una técnica analítica rica para la determinación de masas y estructura de moléculas y fragmentos. La unión de la espectrometría de masas (EM en español) con el analizador de EC debe ser considerado como un tipo de técnica más que un simple método de detección, en efecto representa una nueva dimensión de la separación. La combinación de espectrometría de masas con cromatografía de gases ha llegado a ser una herramienta analítica de rutina para determinar mezclas complejas.

La intensa búsqueda de la unión de la EM con la Electroforesis Capilar, ha llevado a realizar varios diseños de equipos y aplicaciones. La primera combinación de EC-EM usaba una interfase de ionización por electrospray. Al final del capilar se inserta el electrospray con una aguja de acero inoxidable limpia. Los iones producidos durante la

---

<sup>58</sup> Reacción química que implica la transferencia de electrones de un elemento a otro.

evaporación del electrospray en una solución del electrolito soporte son dirigidos a la radiofrecuencia, el sector de espectrometría de masas se encuentra equipado con un detector de electrones múltiples.

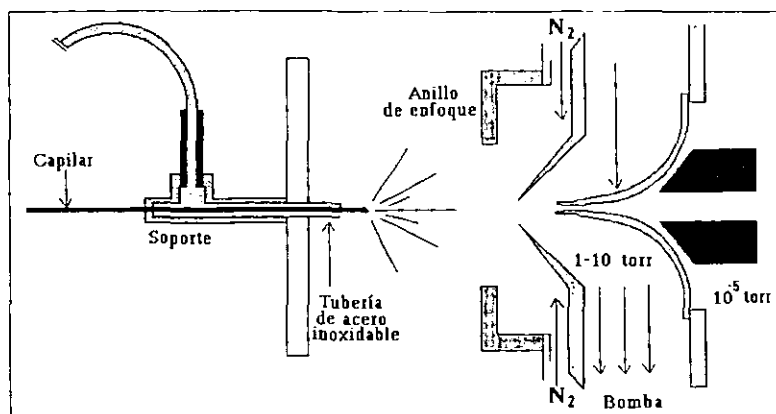


FIGURA 29. DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

La fuerza del FEO generada , en una separación capilar es suficiente para asegurar el contacto eléctrico con la aguja de electrospray o alternativamente con el extremo metalizado del tubo capilar de la separación. La ionización del electrospray se realizó a presión atmosférica predisponiendo el anillo que se enfoca con respecto al enchufe de la columna.

Se ha usado  $N_2$  a  $70^\circ C$  quitar el exceso de solvente, antes que los iones del electrospray se dirijan al analizador de masas. La combinación de EC-EM puede proporcionar otros datos de las sustancias o la corriente total de los iones sirviendo como un tipo de detección universal cercana. (Claessens H., 1995, Pp. 113-140)

### 5.5.6 SISTEMAS ACOPLADOS

Los sistemas acoplados permiten realizar análisis semicuantitativos mediante la determinación de los factores de respuesta de los distintos elementos en determinadas condiciones de trabajo, y su posterior relación con las señales analíticas

obtenidas, de tal modo que es posible obtener resultados en tiempos de análisis muy cortos. (Skoog, 2001, capítulo 30)

### 5.5.6.1 ESPECTROMETRÍA DE PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE-ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

La espectrofotometría de Plasma Acoplado Inductivamente junto a la Espectrometría de Masas (PAI-EM), (por sus siglas en inglés *ICP-MS*) se sabe que tiene una capacidad de detección superior, además de que es selectiva y multielemental<sup>59</sup>, dando por resultado información elemental e isotópica. El potencial de la separación por Electroforesis Capilar, y la capacidad superior de detección en PAI-EM, conllevan a una gran diversidad de aplicaciones potenciales que trae el acoplamiento EC-PAI-EM considerando principalmente los estudios de especiación de elementos, donde la separación de la especie es seguida típicamente por la detección selectiva del elemento. La clave al acoplamiento es la interfase Electroforesis Capilar a PAI-EM; para interconectar ambos instrumentos se necesita que el circuito eléctrico esté cerrado, la nebulización sea óptima al igual que el transporte total en PAI-EM; y (conjuntamente con las dimensiones capilares) la reducción de la succión del tubo capilar.

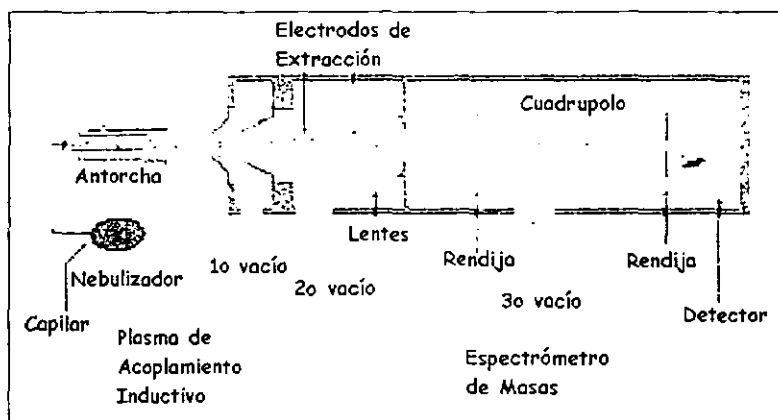


FIGURA 30. DETECTOR DE PAI-EM-EC.

Primero en el espectrofotómetro los iones se extraen del plasma por medio de un sistema de extracción por bombeo. Hay diversos tipos de analizadores totales que se pueden emplear para separar los isótopos basados en su relación masa carga. Los analizadores cuadrupolo son compactos y fáciles de utilizar pero ofrecen una resolución más baja al tratar iones de la misma relación masa/carga ( $m/z$ ).

Una de las grandes ventajas de la detección por PAI-EM son los límites de detección extremadamente bajos para una gran variedad de elementos. Algunos elementos pueden medirse bajo el rango de partes por cuatrillón mientras la mayoría pueden ser detectados en el orden de una parte por trillón. La tabla abajo muestra los límites de detección por elemento:

ELEMENTO	LIMITE DE DETECCIÓN (PPT <sup>60</sup> )
U, Cs, Bi	Menor que 10
Ag, Be, Cd, Rb, Sn, Sb, Au	10-50
Ba, Pb, Se, Sr, Co, W, Mo, Mg	50-100
Cr, Cu, Mn	100-200
Zn, As, Ti	400-500
Li, P	1-3 ppb
Ca	Menor que 20 ppb

TABLA 8. LÍMITES DE DETECCIÓN POR ELEMENTO USANDO PAI/EM.

([http://www.cevt.edu/program\\_areas/environmental/teach/smprimer/acpms/icpms.html](http://www.cevt.edu/program_areas/environmental/teach/smprimer/acpms/icpms.html)). Junio : 2001)

#### 5.5.6.2 ELECTRO-ASPERSIÓN-ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

En la espectrometría atómica se mide la absorción, la emisión o la fluorescencia de átomos gaseosos. Las muestras líquidas se atomizan mediante una flama, un horno o un plasma, con una temperatura de 2300 a 3400° K.

De entre todos los procedimientos de atomización es éste, por el momento, el que produce de modo más controlable y fiable gotas de tamaño monodisperso y alta carga

<sup>59</sup> Tiene la capacidad de detectar varios elementos a la vez

<sup>60</sup> Expresa la concentración en partes por trillón (ppt), es decir picogramos / Kg, o picolitros / Litro.



específica. No es menor la ventaja de ser el que da lugar a tamaños de gotas menores como se observa en la figura 31 (hasta el orden de unos pocos nanómetros).



FIGURA 31. ELECTROASPERSIÓN NUBE ELECTROSTÁTICA CARGADA.

Para que la emisión de líquido se produzca en forma de una nube monodispersa, éste debe ser eyectado en forma de un microchorro capilar desde el vértice de un menisco electrificado que adopta una forma de punta casi cónica cuando se le aplica un potencial de unos pocos kilovoltios. Este chorro capilar, muy delgado y extraordinariamente estable, emerge, entonces, del vértice del cono para romper finalmente en una nube de gotas denominada electro-aspersión. Esta clase de atomización ha despertado un inusitado interés en la comunidad científica y tecnológica por sus potenciales aplicaciones: combustión, humidificadores, inhalación terapéutica de medicamentos, dispersión de pesticidas y fertilizantes, producción de polvos sintetizables en tecnología de materiales, etc. El proceso de emisión involucra diferentes fenómenos electro-hidrodinámicos muy complejos, que deben ser analizados si se desea predecir las características (tamaño de gotas, carga de gotas, etc) del spray resultante. Modelos teóricos para diferentes regímenes han sido desarrollados por este grupo y sus resultados comparados con experimentos realizados. (<http://eurus2.us.es/invest/atomelect.html>, Junio 1, 2001)

### 5.5.7 OTROS DETECTORES USADOS EN EC.

En el estado de desarrollo de la EC también se ha utilizado el índice de refracción para la detección. En el diseño original de *Jorgenson y Lukacs* la deflexión del rayo

láser de Helio-Neón debido a los cambios en el índice de refracción dentro de la zona de migración es monitoreada por un fotodiodo. Sin embargo la complejidad de la señal y el ruido debido a las fluctuaciones de la intensidad del láser, las vibraciones del capilar y los efectos del calor de Joule durante la corrida pueden disminuir el uso práctico de éste detector. En la Tabla 8 se muestran los límites de detección, las ventajas y desventajas de los métodos de detección más usados en Electroforesis Capilar

TABLA 9. RESUMEN DE LOS TIPOS DE DETECTORES Y SUS LÍMITES DE DETECCIÓN.

MÉTODO	LÍMITE DE DETECCIÓN (MOLES)	LÍMITE DE DETECCIÓN (MOLAR)*	VENTAJAS Y DESVENTAJAS
Absorción UV-Vis	$10^{-13}$ a $1^{-15}$	$1^{-5}$ a $1^{-8}$	<input type="checkbox"/> Universal <input type="checkbox"/> El arreglo de diodos ofrece información espectral
Fluorescencia	$1^{-15}$ a $1^{-17}$	$1^{-7}$ a $1^{-9}$	<input type="checkbox"/> Usualmente requiere derivación de las muestras
Fluorescencia inducida por láser	$1^{-18}$ a $1^{-21}$	$1^{-14}$ a $1^{-16}$	<input type="checkbox"/> Extremadamente sensible <input type="checkbox"/> Usualmente requiere muestras de derivación <input type="checkbox"/> Costoso <input type="checkbox"/> Fácil de operar
Amperometría	$1^{-18}$ a $1^{-17}$	$1^{-10}$ a $1^{-11}$	<input type="checkbox"/> Sensible <input type="checkbox"/> Selectivo pero se usa solamente para analitos electroactivos <input type="checkbox"/> Requiere modificaciones especiales de capilares y electrónica
Conductividad	$1^{-15}$ a $1^{-17}$	$1^{-7}$ a $1^{-8}$	<input type="checkbox"/> Universal <input type="checkbox"/> Requiere modificaciones especiales de capilares y electrónica
Espectroscopia de masas	$1^{-16}$ a $1^{-17}$	$1^{-8}$ a $1^{-9}$	<input type="checkbox"/> Sensible y ofrece información estructural <input type="checkbox"/> La interfase es complicada
Amperometría, fluorescencia UV Indirecta	10-100 veces menos que el método directo		<input type="checkbox"/> Universal <input type="checkbox"/> Más baja sensibilidad que los métodos directos
Arreglo de Diodos (realiza la identificación de compuestos por comparación espectral!)			
Otros: Radioactividad, lente térmico, índice de refracción, dicroísmo circular.			
*Asume volúmenes de inyección de 10 nanolitros.			

## 5.6 AUTOMATIZACIÓN.

Otro aspecto que también es importante es el manejo de líquidos, para el buen desempeño y realización de la separación por EC, siendo importantes tanto en la eficiencia como para mantener la automatización y flexibilidad experimental total. El sistema electroforético puede incluir el búfer para llenar el capilar, un automuestreador, un colector de fracciones, y otro vial con el mismo búfer para nivelar el sistema.

**Automuestreador:** es el que transporta los viales, que contienen muestras, el electrolito soporte, a una determinada posición elegida. Durante el desarrollo de métodos automatizados, se utiliza generalmente una muestra individual y numerosos viales de búfer. Sin embargo, para análisis de rutina, se utilizan numerosas muestras y un mismo búfer, por lo que es importante tener alta capacidad de acceso aleatorio a los viales. Es necesario evitar diferencias en el contenido de los depósitos de búfer pues esto puede dar como resultado fluctuaciones de absorbancia, cambios en la corriente y variaciones en el flujo electroosmótico. Por ello, es importante que los depósitos en los cuales se sumergen el par de electrodos y las puntas del capilar contengan la misma composición y nivel del búfer.

Para muestras termolábiles se requiere contar con un automuestreador a temperatura controlada. El enfriamiento ayuda a reducir la evaporación de la muestra, evitando que la concentración de la muestra aumente y con ello se afecten los límites de análisis cuantitativo. Aunque se puede disminuir la evaporación de la muestra tapando los viales herméticamente, cabe señalar que las tapas de los viales del sistema de EC no son herméticos pues el capilar debe de introducirse al vial junto con un electrodo.

Algunos equipos cuentan con un sistema que permite lavar y llenar un reservorio especial (generalmente un vial) con electrolito soporte y después rellenar con búfer fresco al capilar empleando un reservorio que contiene de 100 - 500 ml de búfer. Este

sistema tiene la ventaja de realizar análisis automatizados por un periodo largo de tiempo.

Sin embargo, los equipos más modernos emplean sólo viales con búfer tanto para lavar el capilar como para realizar el análisis por lo que el consumo de electrolito soporte es menor, pero es necesario colocar una mayor cantidad de viales con éste para realizar una serie de análisis automáticamente.

Por otro lado, cuando se utilizan dos viales para realizar el análisis, es importante mantener iguales los niveles de búfer en los viales a fin de tener una mejor reproducibilidad del tiempo de migración. El sifoneo de uno de los depósitos al otro causaría flujo laminar al sistema. Esto no solamente es perjudicial para la reproducibilidad sino también para la eficiencia de la separación. La influencia de depósitos no nivelados depende del diámetro, longitud del capilar y de la viscosidad del búfer empleado. Se ha demostrado que una diferencia en la altura de 2mm, usando un tubo capilar de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno puede cambiar el tiempo de migración en un 2 al 3%. Este incremento se incrementa cerca del 10% en un capilar del 100  $\mu\text{m}$ . Un sistema de nivelación automatizado debe liberar exactamente el líquido a un nivel específico cuando vuelve a llenar el vial. (Heiger, 1997, Pp. 77-108; Marina, 1994, Pp.1411-1433)

# CAPÍTULO 6

# APLICACIONES

## 6 APLICACIONES.

El incremento necesario de técnicas analíticas poderosas y la disponibilidad comercial de los instrumentos de EC recientemente ha ofrecido estímulos para mejorar técnicas y explorar nuevas áreas de aplicaciones prácticas. Las aplicaciones han sido agrupadas en categorías para ilustrar las metodologías y aprobar el desarrollo basado en éste rápido crecimiento analítico de la técnica. El principal propósito es suministrar información de aplicabilidad práctica de la EC para obtener un rico compendio de aplicaciones específicas con referencias adecuadas para proveer comprensión en diferentes áreas, que clasificaremos de la siguiente manera: (<http://www.lumex.ru/gnas/ce/capel.html>, Mayo 12, 2001)

TABLA 10. APLICACIONES EN DIVERSAS ÁREAS.

AREAS	APLICACIONES
6 INDUSTRIA FARMACÉUTICA	Control de la pureza de materias primas y medicamentos. Pruebas de disolución. Estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia.
3.5.1.1 MEDICINA	Determinación de principios activos (medicamentos) y sus metabolitos en fluidos biológicos.
CRIMINALÍSTICA	Análisis de explosivos, drogas y sus metabolitos, metales pesados, etc., en muestras diversas
INDUSTRIA ALIMENTICIA	Análisis de colorantes alimenticios, vitaminas, identificación y cuantificación de iones metálicos, control de calidad de los productos alimenticios.
INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS:	Análisis de proteínas biológicamente activas, péptidos, aminoácidos y sus derivados

### 6.1 INDUSTRIA FARMACÉUTICA

El área farmacéutica es uno de los campos de acción donde la electroforesis es muy empleada. Esta técnica se puede utilizar en cada uno de los pasos de producción de los medicamentos: en la caracterización y control de las materias primas cuantificación de el(los) principio(s) activo(s) a lo largo de todo el proceso de producción (e.g. prueba de disolución) y en el producto final. Además, durante el desarrollo y prueba de

nuevos medicamentos y en estudios farmacocinéticos en el monitoreo terapéutico de los principios activos y sus metabolitos), y hasta en química forense. (Vargas M., 2001, en prensa; Revilla V., 2001, en prensa)

### 6.1.1 CONTROL Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS

Durante la síntesis o preparación de un compuesto, es inevitable la formación de ciertos subproductos y /o derivados. A fin de evitar la posible presencia de algunos derivados indeseables del principio activo o de la sustancia requerida, es necesario realizar de manera regular o al azar el control de las materias primas que se emplean en la producción de medicamentos. Este control se puede hacer de distintas formas empleando diversas técnicas electroforéticas. La identificación de enantiómeros y otros compuestos quirales ha tomado gran importancia en los últimos años y varios métodos electroforéticos han sido desarrollados para este fin. La identificación y separación de compuestos quirales debe realizarse en las materias primas y en los productos terminados a fin de evitar la presencia indeseable de alguno de los enantiómeros.

### 6.1.2 DETERMINACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

La cantidad de medicamentos que son analizados en sus diferentes formulaciones farmacéuticas utilizando alguna de las modalidades de electroforesis capilar es casi interminable. Las aplicaciones reportadas se pueden dividir dentro de dos grandes categorías: medicamentos solubles en agua, o medicamentos insolubles en agua. Los compuestos con características básicas, se pueden analizar por electroforesis capilar de zona (ECZ) en medio ácido (pH 2 - 4) mientras que los compuestos ácidos se analizan entre un pH 6 -10. Cuando estos compuestos no se separan bajo condiciones simples de ECZ, el uso de tensoactivos puede ayudar a su separación. (Brunner, 1994, Pp.581-593)

Para el análisis de medicamentos insolubles en agua, el método más empleado es la que algunas veces incluye una pequeña proporción de solventes tales como dimetilsulfóxido, acetona, propanol, puros o en mezcla.

### 6.1.3 MONITOREO EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

El conocer los niveles de medicamento en fluidos biológicos como saliva, sangre, suero y orina, permite la optimización de la fármaco-terapia y provee las bases para los estudios de biodisponibilidad, farmacocinéticos y genéticos, y establecer la función e influencia de la co-medicación (Vargas, 1998, Pp.271-285). Además, el monitoreo y confirmación de la cantidad de medicamento en los fluidos biológicos es importante para la investigación de intoxicaciones, la detección de usuarios potenciales de drogas y el control de los adictos en tratamiento. Un pre-requisito para el monitoreo de un medicamento es el desarrollo y validación de un método analítico que permita la determinación exacta de las concentraciones del principio activo y sus posibles metabolitos en varios fluidos biológicos (suero, orina, bilis, extractos de tejidos, líquido cefaloraquídeo) (Dabas, 1997, Pp.253-262; Kunkel, 1997, Pp. 1882-1891; Sadeghpour, 1997, Pp. 1-8; Vargas, 1998, Pp.2926-2934). La electroforesis capilar presenta numerosas ventajas para su aplicación en este campo: rapidez, inyección de pequeños volúmenes de muestra, gran eficiencia de separación, bajas expensas de consumo, separación y cuantificación automatizada. Además, el uso de detergentes en el electrolito soporte permite la inyección directa de muestras de suero y la detección "en línea" permite el análisis de compuestos en longitudes de onda tales como 190 - 200 nm o usar detección indirecta. Una desventaja de la EC es la baja sensibilidad obtenida para algunos compuestos por la presencia de otros compuestos como proteínas<sup>62</sup>, altas concentraciones de sales, etc., pero aplicando algún pre-tratamiento simple de la

<sup>62</sup> Molécula compuesta por una (proteína monomérica) ó más cadenas polipeptídicas (proteína multimérica). Los aminoácidos dentro de la cadena polipeptídica están unidos por enlaces covalentes denominados enlaces peptídicos. Diferentes cadenas polipeptídicas están unidas principalmente por enlaces no covalentes. (<http://ejb.ucv.cl/gmunoz/genweb/genetica/frame/textos/anexos/glosario.html>)



muestra (extracción en fase sólida, preconcentración, ultrafiltración, etc.) generalmente se aumenta la sensibilidad hasta los niveles requeridos. (Vargas M., 2001, en prensa; Revilla V., 2001, en prensa)

#### 6.1.3.1 FÁRMACOS CON CARACTERÍSTICAS BÁSICAS, SOLUBLES EN AGUA.

Un estándar típico utilizando para separaciones a bajo pH es el  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , ajustando el pH a 2.5 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Un estándar interno, como imidazol o ácido benzoico, es generalmente empleado para obtener una mayor precisión en los resultados. Un método que emplea un simple bufer de fosfatos 25mM, pH de 2.5, para ensayos con un amplio rango de fármacos con propiedades básicas (e.g. aquellos que contienen grupos amino) ha sido validado. Dicho método ha mostrado tener buena sensibilidad, linealidad (correlaciones de 0.999) y baja desviación estándar relativa (0.3-2 %) para área de pico. La robustez y las desviaciones del método ha sido satisfactoriamente asignada usando un diseño experimental. El análisis es repetido en diferentes días, por diferentes analistas usando diferente equipo diferentes reactivos y muestras. Éste método es rutinariamente usado para el análisis cuantitativo de fármacos básicos o formulaciones farmacéuticas. (Altria, 1998, Pp. 21-30)

#### 6.1.3.2 FÁRMACOS CON CARACTERÍSTICAS BÁSICAS INSOLUBLES EN AGUA.

Los fármacos con características básicas insolubles en agua después de ser analizados disolviendo la muestra en uno u otro solvente orgánico o mezcla con agua o en una solución de ácido diluido. Por ejemplo niveles de agua en un compuesto insoluble minoxidil determinado a pH de 3 usando un bufer de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  de 100mM. Un estándar interno (isoxsuprine) empleado para mejorar la precisión de 0.8%. Empleando un capilar corto de 14cm para obtener un tiempo de análisis menor a 2 minutos.

### 6.1.3.3 FÁRMACOS CON CARACTERÍSTICAS ÁCIDAS SOLUBLES EN AGUA.

Disoluciones simples de fosfatos, boratos o mezclas de fosfato-borato, con o sin ajuste de pH se emplean en un rango de pH de 6-10. El electrolito comúnmente utilizado para separar fármacos ácidos es borato 10mM el cuál tiene un pH natural de 9.5. estos electrolitos proporcionan un FEO estable, permite rápidas y eficientes separaciones de compuestos ácidos solubles en agua. El uso de un simple buffer de boratos con pH 9.5 se ha validado como un método general para el análisis de fármacos ácidos, que operan con éste buffer que da buena precisión del área de pico (rutinariamente menor al 1%) y el FEO es muy estable (desviación estándar para el tiempo de migración relativo de 0.1%). Validación muestra un linealidad aceptable, estabilidad de los reactivos (3meses). (Altria, 1998, Pp. 21-30)

### 6.1.3.4 FÁRMACOS CON CARACTERÍSTICAS ÁCIDAS INSOLUBLES EN AGUA.

Compuestos ácidos insolubles en agua pueden ser preparados en solventes orgánicos o en soluciones de pH. Niveles de fármacos ácidos utilizan como electrolito Tris<sup>63</sup> a pH de 6. Las muestras son preparadas en una mezcla agua acetonitrilo 60:40. Un estándar interno usado para dar mejor precisión en la inyección y buena linealidad<sup>64</sup> >0.999. (Altria K., 1998, Pp.21-30)

En la tabla 10 se presentan algunos ejemplos en los distintos modos de Electroforesis Capilar que se han aplicado para el análisis farmacéutico e impurezas de fármacos (Altria, 1993, Pp. 245-257; Fanali, 1990, Pp. 593-702;Piera E., 1997, Pp. 275-280;Schmutz, 1994, Pp. 1295-1303)

<sup>63</sup> (hidroximetil) amino-metano, mejor conocido como Tris.

<sup>64</sup> La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuáles se pueden obtener directamente o mediante la transformación matemática, son directamente proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. Es decir se mide el grado en que la respuesta del método se aproxima a una función lineal del tipo  $y = m \times x + b$  al trabajar con diferentes concentraciones.

TABLA 11. EJEMPLOS DE ALGUNAS FORMULACIONES FARMACÉUTICAS.

CLASE	MODALIDAD	COMPOSICIÓN DE LA MUESTRA
<b>ANTIBIÓTICOS</b>		
Penicilinas	CCEM / DSS <sup>65</sup>	Mezcla de prueba
Sulfonamidas	ECZ / CD <sup>66</sup>	Mezcla de prueba
Cefalosporinas	CCEM / DSS + <sup>-</sup> AA <sup>67</sup>	Mezcla de prueba
Neomicina	ECZ / varios	Gotas óticas
Quinolona e impurezas	ECZ pH 2	Materia Prima
Cefixime (metabolitos)	ECZ pH 7 / metanol	Mezcla de prueba
<b>ANTIDEPRESIVOS</b>		
Benzodiazepinas	CCEM	Orina
Fluparoxano	CCEM	Materia prima
Dilitiazem e impurezas	CCEM / DCS <sup>68</sup>	Tabletas
<b>ANTIULCEROSOS</b>		
Ranitidina e impurezas	ECZ pH ácido	Jarabe
Cimetidina	ECZ pH 7	Formulaciones
<b>BRONCODILATADORES</b>		
Inolina	ECZ pH ácido	Solución prueba
Salbutamol	ECZ pH 5	Formulaciones
<b>ESTEROIDES</b>		
Corticosteroides	CCEM / DSS	Mezcla de prueba
Esteres de testosterona	CCEM / DSS	Mezcla de prueba
<b>ANTIISTAMINAS</b>		
Varios	CCEM / DSS	Formulaciones
<b>ANALGÉSICOS</b>		
Varios	ECZ, CCEM / DSS	Formulaciones

## 6.2 MEDICINA.

El análisis de niveles de fármacos en fluidos biológicos (bilis, extractos de tejidos, líquido encéfalo raquídeo, orina, plasma, se va, sangre, suero, etc) provee las bases para realizar los estudios de biodisponibilidad, farmacocinética y farmacodinamia así como optimizar la farmacoterapia, para el control de adictos en tratamiento, investigación de intoxicaciones. Para poder monitorear un medicamento en fluidos

<sup>65</sup> Dodecil Sulfato de Sodio

<sup>66</sup> Término usado para denominar a las ciclodextrinas

<sup>67</sup> Sales de Tetraalquilamonio

<sup>68</sup> Deoxicolato de Sodio

biológicos (ver Tabla 12), se necesita primero tener un método analítico validado, que permita la determinación exacta de las concentraciones de fármaco en el fluido biológico a analizar. En cromatografía de líquidos o de capa fina, y espectrometría todos éstos métodos presentan grandes desventajas; por ejemplo son desarrollos muy costosos y tediosos, los anticuerpos<sup>69</sup> sufren de reacciones cruzadas con contaminantes y metabolitos de fármacos, los procedimientos requieren de una labor intensiva, largos tiempos de preparación de la muestra y tiempos de análisis. Esto puede mejorar usando EC, es rápida, tratamiento previo de muestras es en línea (si es necesario) y la separación y cuantificación es automática. (Soini, 1991, Pp.547-556; Klein, 1994, Pp.419-457; Lehman, 1997, Pp. 3-35; Zhang, 1994, Pp 208-218)

TABLA 12. DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS  
USANDO DETECCIÓN POR UV-Vis Y LIF.

FÁRMACO/METABOLITO	FLUÍDO
Cefpiramida	Plasma
Aspoxilina	Plasma
Cicletanina (Enantiómeros)	Plasma
Antiepilépticos	Plasma
Barbituratos	Suero/Orina
Tiopental	Suero
THC <sup>70</sup>	Orina
Cimetidina	Suero
AFMU <sup>71</sup> , AAMU <sup>72</sup> , IX <sup>73</sup> , IU <sup>74</sup>	Orina

### 6.3 CRIMINALÍSTICA, MEDICINA LEGAL.

En ésta área, el análisis de explosivos, drogas y sus metabolitos es de mucha utilidad, los "investigadores forenses" usan el análisis de los residuos de los explosivos para identificar materiales involucrados en un crimen; varios métodos se han utilizado para

<sup>69</sup> Molécula de proteína (inmunoglobulina) producida por linfocitos T que reconoce un antígeno específico y desencadena la respuesta inmune. (<http://ejb.ucv.cl/gmunoz/genweb/genetica/frame/textos/anexos/glosario.html>)

<sup>70</sup> THC, sigla que significa 11-nor-tetrahidrocannabinol-9-carboxiácido

<sup>71</sup> AFMU, sigla que significa 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracilo

<sup>72</sup> AAMU, sigla que significa 5-acetilamino-6-amino-3-metiluracil

<sup>73</sup> IX, sigla que significa 1-metilxantina

<sup>74</sup> IU, sigla que significa ácido 1-metilurico

analizar los constituyentes inorgánicos de los residuos. Sin embargo cada vez más compuestos orgánicos se encuentran en los explosivos y juegos pirotécnicos. El método utilizado para analizar los compuestos orgánicos en explosivos es CCEM. Northrop y colaboradores separaron más de 20 constituyentes, generalmente es aplicada en un rango de 7 y 10 de pH, aunque también es posible a bajos pH's. con la disminución de FEO disminuye la velocidad electroforética de las micelas de DSS, entonces alrededor de pH 5 las micelas migran en la dirección opuesta al FEO. Ahora bien los compuestos con alta afinidad micelar migran más rápido en el capilar. (Pokorna, 1999, Pp.1993-2010;Prince Technologies, 2001)

En forma general, el objetivo es mostrar en qué puede ser utilizada la Electroforesis Capilar, como solución a necesidades analíticas. Específicamente, en productos que requieren de estudios de identidad, cantidad, pureza, heterogeneidad, estabilidad y procesos químicos.

#### 6.4 INDUSTRIA ALIMENTARIA.

Los productos alimenticios están compuestos de una gran variedad de moléculas con distintas propiedades químicas, la Electroforesis Capilar ofrece flexibilidad y versatilidad para realizar el análisis en alimentos, así como análisis de colorantes alimenticios, vitaminas, carbohidratos, identificación de iones metálicos y orgánicos, para realizar el control de calidad en productos alimenticios. Para lo que es importante determinar:

##### 6.4.1 CARBOHIDRATOS.

Son clasificados en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos de acuerdo al número de sacáridos que tenga, tienen un papel importante a nivel fisiológico, para determinarlos se ha usado Electroforesis Capilar de Zona y CCEM. Qi y Zhu separaron 5 azúcares por Electroforesis Capilar de Zona, siguiendo la derivatización de la 1-naftilamina. Lee y Lin investigaron la determinación de glucosa, fructosa, ramnosa,

ribosa, maltosa, lactosa, sucrosa y ácido glucónico por EC por detección indirecta de absorbancia. Lu y Westerlund desarrollaron un método rápido y sensible para el análisis de azúcares por ECZ con detección indirecta ultravioleta usando dietilamina y borato como aditivos en el electrolito soporte. Zhong analizó pectinas por EC. (Monning A., 1991, Pp. 280-314)

Análisis de proteínas y aminoácidos<sup>75</sup>: se encuentran en una gran variedad de alimentos que contienen nutrientes importantes para el organismo, ya que son indispensables para el metabolismo fisiológico. Además las proteínas y aminoácidos se utilizan frecuentemente para determinar la calidad de los alimentos, así que su caracterización y cuantificación es muy importante. De Jong y colaboradores Estudiaron las proteínas de la leche y McCulloch las del huevo, Chen caracterizó las proteínas de los alimentos por EC y Le Blanc realizó Electroforesis Capilar de Zona con proteínas del sarcoplasma en músculo de pescado. Lu y colaboradores, reportó 4 aminoácidos: triptófano, histidina, fenilalanina y ácido aspártico por EC-EM. (Smith N., 199, Pp. 74-82)

#### 6.4.2 VITAMINAS.

Se realiza especialmente para las vitaminas solubles en agua (tiamina, nicotinamida, riboflavina, piridoxina, ácido ascórbico y ácido pantoténico) por ECZ, se ha determinado ácido ascórbico en vegetales y tejido de plantas por ECZ, en frutas, cerveza, vino y bebidas de frutales por CCEM, en general se han determinado las 14 vitaminas solubles en agua por Extracción de fluidos supercríticos y por CCEM. La vitamina A y sus derivados son determinados por CCEM, Electroforesis Capilar no acuosa, otro método para el análisis de vitaminas grasas.

---

<sup>75</sup> Monómero que al unirse covalentemente mediante el enlace peptídico forma cadenas polipeptídicas. La secuencia de los aminoácidos en las cadenas polipeptídicas está determinado por el código genético (el que no codifica para la síntesis de aminoácidos). (<http://ejb.ucv.cl/gmunoz/genweb/genetica/frame/textos/anexos/glosario.html>)

### 6.4.3 CATIONES INORGÁNICOS.

Particularmente metales alcalinos y alcalinotérreos, necesitan ser monitoreados ya que son de gran importancia para muchas industrias. Los cationes pueden ser importantes para catalizar o inhibir funciones en algún proceso químico, normalmente se determinan para saber la calidad del agua usada en la fabricación de bebidas. Normalmente se utilizan técnicas espectroscópicas así como absorción atómica o acoplada a emisión atómica de plasma.

La Electroforesis Capilar ha demostrado ser muy precisa y confiable en los resultados para el análisis de iones metálicos. La ventaja sobre la absorción atómica es que los metales alcalino y alcalinotérreos pueden ser analizados en la misma corrida; el análisis completo de la muestra incluye a los metales de interés. El análisis de cationes se ha hecho por Electroforesis Capilar a bajo pH mediante detección indirecta UV (Monning A., 1991, Pp. 280-314; Prince Technologies, 2001)

La Electroforesis Capilar de Iones es una técnica de separación para el análisis de iones orgánicos e inorgánicos en soluciones acuosas, también conocido como Análisis Capilar de Iones, aunque la técnica utilizada es la Electroforesis Capilar de Zona, especialmente diseñada para el análisis de moléculas con bajo peso molecular como iones inorgánicos, ácidos orgánicos, metales alcalino y alcalinotérreos y aminas.

David Hage, y colaboradores, realizaron la determinación de nitratos y nitritos en agua por EC. La combinación de métodos analíticos para éstos iones en el monitoreo, purificación y mejoramiento de agua, tiende a minimizar el número de casos de envenenamiento por nitritos, en regiones industriales. (David H., 1998, Pp. 1588-1590)

### 6.4.4 COLORANTES Y PIGMENTOS.

Su determinación es importante ya que son utilizados en la industria cosmética, farmacéutica, alimentaria y textil, por ejemplo; Borrós y colaboradores, separaron y detectaron aminas aromáticas e impurezas en la síntesis de colorantes. La

Electroforesis Capilar de Zona es de utilidad para el monitoreo en la síntesis de colorantes, además el análisis de aminas por ésta técnica puede detectar otras impurezas presentes en la materia prima de la síntesis de colorantes. La influencia de las condiciones afecta la cantidad de aminas carcinogénicas liberadas por lo colorantes azo que se trataron con ditionito de sodio. (Bjersdottir I., 1998, Pp. 2179-2186; Borrós S., 1999, Pp. 189-196; Calavska J. 1993, Pp. 335-342)

TABLA 13. COLORANTES AZO DETERMINADOS POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA.

ANALÍTICAMENTE	ESTRUCTURA QUÍMICA
Solubles en Agua * Aniónicos * Catiónicos	Azo-compuestos, Difenil-metilcolorantes, Nitrocolorantes,
Insolubles en Agua	Antraquinonas, Complejos metálicos (Cromo, Cobalto), etc.

## 6.5 INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS.

Se refiere más que nada a la determinación de algún metabolito, análisis de proteínas biológicamente activas, péptidos, aminoácidos y sus derivados, bases nitrogenadas, oligonucleótidos<sup>76</sup>, carbohidratos, fragmentos de ADN, etc. A continuación se describirá a grandes rasgos ejemplos de éstas aplicaciones.

La Electroforesis Capilar se considera una técnica micropreparativa porque implica separaciones en tubos capilares con pequeño diámetro interno, y se ve limitada en comparación con la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución respecto a la carga máxima de muestra (es decir, la cantidad de muestra que se puede inyectar en el capilar sin causar ensanchamiento de zona excesivo). Por tanto, la cantidad de material colectado en el capilar es relativamente pequeña, lo cuál ayuda a realizar análisis adicionales. Sin embargo, publicaciones recientes indican que bajo condiciones apropiadas, la Electroforesis Capilar puede ser una herramienta útil para los químicos que estudian proteínas. En 1988, Cohen y colaboradores, mostraron la utilidad de la

<sup>76</sup> Secuencia lineal de nucleótidos (hasta 20).



Electroforesis Capilar micropreparativa, para la purificación de péptidos y oligonucleótidos (fueron recogidos 800 ng<sup>77</sup> se utilizaron posteriormente en una prueba), en este trabajo se utilizaron capilares llenados con gel, aunque puede ser usada la Electroforesis Capilar de Zona.

#### APLICACIONES MICROPREPARATIVAS DE LA EC

- ⊙ Purificación de péptidos con previa digestión para la micro secuenciación
- ⊙ Análisis de la composición de aminoácidos después de una hidrólisis
- ⊙ Electroforesis en un bloque de gel (marcadores radiactivos)
- ⊙ Identificación de fracciones por espectrometría de masas
- ⊙ Análisis de la actividad enzimática de las fracciones colectadas por CLAR o ECZ

La colección de la fracción en Electroforesis Capilar es diferente en relación a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, ya que el capilar debe permanecer en contacto con una solución que contiene agua o electrolito soporte y el electrodo (es decir, debe mantenerse en el campo eléctrico, que conduce la separación). Ésta es probablemente la manera más comúnmente usada de recoger fracciones en EC. Alternativamente, la fracción que se recogerá puede ser movilizada utilizando baja presión (0.5psi<sup>78</sup>) dependiendo de la capacidad del sistema de EC. Otra posibilidad es conectar el capilar a una bomba para hacer una elusión "dinámica", después de que cambie el campo (como fue hecho por Camilleri y colaboradores, en 1991). Una aplicación realizada con éxito para el estudio de la secuenciación de péptidos con niveles bajos en el orden de picomoles<sup>79</sup>.

<sup>77</sup> Unidades de masa, nanogramos, del orden de 1E-9 Kg.

<sup>78</sup> Unidad de presión, es decir peso fuerza sobre pulgada al cuadrado [lbf/in<sup>2</sup>] (en inglés pound-force per square inch (psi)).

<sup>79</sup> Prefijo utilizado para denominar órdenes muy pequeños de 1E-12 moles.

Básicamente, tres estrategias son posibles para la EC micropreparativa:

- ✓ la colección de una corrida con capilares estándares,
- ✓ la colección realizando múltiples corridas,
- ✓ la colección con capilares de gran diámetro.

Posteriormente Kenny y colaboradores, en 1993 usaron capilares con 150  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, para la colección de fracciones, los resultados indican que de 50 picomoles de péptidos que son recuperados por EC se recupera el 60-70% porcentaje superior al manejado por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (menor al 10%).

### 6.5.1 ELECTROFORESIS CAPILAR DE AFINIDAD (ECA).

La afinidad de la electroforesis se ha utilizado para la caracterización de biomoléculas y para el análisis de interacciones específicas con las biomoléculas, y la afinidad con los ligandos, incluyendo interacciones anticuerpo-antígeno<sup>80</sup>. Cuando la EC se utiliza para estudiar interacciones del receptor ligando, la técnica se refiere como *Electroforesis Capilar de Afinidad (ECA)*. Ésta técnica, se está convirtiendo rápidamente una herramienta importante para el investigador bioanalítico / clínico.

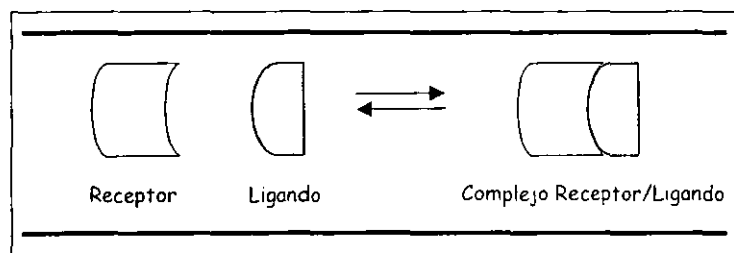


FIGURA 32. REPRESENTACIÓN DE LA UNIÓN COMPLEJO-LIGANDO.

La unión del ligando (proteína, péptido, pequeñas moléculas) a un receptor (típicamente una proteína o un péptido) como se muestra en la figura 32, el complejo proteína-

<sup>80</sup> Molécula que desencadena la formación de anticuerpos. (<http://ejb.ucv.cl/gmunoz/genweb/genetica/frame/:textos/anexos/glosario.html>)

ligando tiene diferentes características carga-masa a la proteína libre que permite su separación en EC. Midiendo el tiempo de migración en función de la concentración del ligando presente en el electrolito soporte, la constante de equilibrio  $K_b$  puede ser medida (Chu y colaboradores, 1992). Tradicionalmente, las medidas de la afinidad se han realizado con técnicas como diálisis o espectroscopia. Sin embargo, estos métodos requieren el etiquetado o dependen de reactivos secundarios para su cuantificación.

- La ECA tiene varias ventajas potenciales:
- Solamente una pequeña cantidad de material es requerido
- El receptor no necesita tener alta pureza y ni conocer su concentración.
- La ECA permite, la determinación simultánea de varios ligandos.
- Tiene tiempos cortos de análisis, es exacto y cuantitativo.

Las interacciones entre los receptores y los ligandos ya se han estudiado y se han ideado los varios esquemas de reacción. por ejemplo, Kajiwara en 1991 utilizó el ECA para el análisis de la conformación y de la interacción de proteínas enlazadas a metales, tales como calmodulina y parvalbumina (enlaces de calcio-calcio) y anhidrasa carbónica (enlaces de el zinc-zinc). de esquelético.

En otras aplicaciones recientes, Honda y colaboradores en 1992 determinaron la constante monovalente de la interacción proteína-azúcar. Heegaard y Robey en 1992 a sí como Biehler y Jacobs en 1993 aplicaron ECA al estudio de reconocimiento molecular, con receptores de bajo peso molecular. Kraak y colaboradores en 1992 probaron tres distintos esquemas de reacción para la determinación de constantes de enlace proteína-fármaco. El análisis dio buenos resultados en el estudio de interacciones de albúmina-warfarina en suero de bovinos, con un modelo sistemático. Finalmente Kuhn y colaboradores, en 1994 usó ECA para la determinación de interacciones lecitina-azúcar. (Herb S., 1999, Pp. 73-95)

### 6.5.2 ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS.

Jorgenson y Lukacs demostraron alta resolución de derivados fluorescentes de los aminoácidos. Desde entonces el análisis de aminoácidos por EC ha sido ampliamente estudiado. Estos estudios incluyen la separación de:

- ⇒ Derivados dansilatados (DNS),
- ⇒ Derivados de feniltiohidantoína (PTH),
- ⇒ Derivados de naftaleno dicarboxaldehído (NDA),
- ⇒ Derivados de cloruro de 4,4-dimetilamino azobenzeno-4'-sulfonilo (DABSYL),
- ⇒ Derivados de isotiocianato de fluoresceína (ITCF),
- ⇒ Derivados de orto-ftaldialdehído (OFA),
- ⇒ Derivados de fluorescamina y 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC).

Las figuras siguientes muestran algunos ejemplos de la derivación de aminoácidos para poder ser detectados por Fluorescencia.

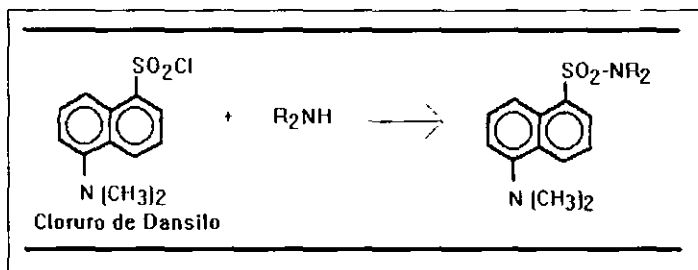


FIGURA 33. REACCIÓN DEL 5-N, N-DIMETILAMINO-NAFTALENO-1-.

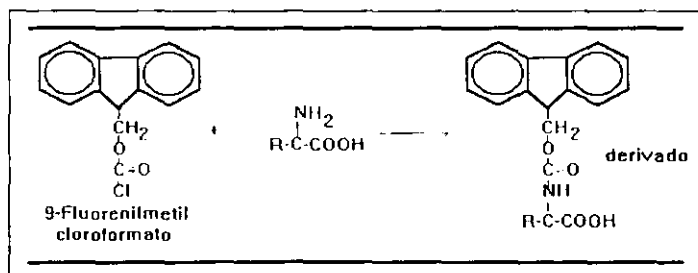


FIGURA 34. REACCIÓN DEL 9-FLUORENILMETIL CLOROFORMATO.

En la figura 33, se observa una reacción de derivación para poder detectar al 5-n,n-dimetilamino-naftaleno-1- cloruro de sulfonilo, reacciona con aminas y aminoácidos para formar derivados fluorescentes. En la figura 34, el 9-fluorenilmetil cloroformato, reacciona con aminoácidos y aminas para formar derivados fluorescentes. También se ha realizado la detección sin derivatización, empleando estrategias como la detección de gradientes de concentración, detección de fluorescencia indirecta y detección por amperometría indirecta.

### 6.5.3 ANÁLISIS DE PÉPTIDOS

El análisis de péptidos por EC es de gran interés, varias revistas de gran reconocimiento discuten las aplicaciones en la separación de péptidos y proteínas, mostrando avances recientes en el uso de la EC-Espectrometría de Masas para el análisis de péptidos. Jorgenson y Lukacs demostraron en un trabajo por ECZ la alta eficiencia y capacidad de ésta técnica, con la separación de derivados de fluorescamina de dipéptidos y péptidos de ovalbúmina. (Herb S., 1999, Pp. 73-95)

TABLA 14. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE UN PÉPTIDO LACTOGLOBULINA.

NO. FRACCIÓN	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	CONCENTRACIÓN (PICOMOL)	% RECUPERADO	% PUREZA
8	TK	70	70	>90
11	ALK	35	35	50
	TMK	35	35	50
13	LQK	50	50	80
15	FPK	40	40	>90
18	VYEELKPTPEGDDLEILLQK	25	25	>90
21	TPEVDDALEK	40	40	75
28	SLAMAASDISLLD (AQSAPLR) VAGT(W)Y	35	35	65

#### 6.5.4 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

En general las proteínas y péptidos se han determinado en diversos estudios, en la tabla 15 se muestran algunos ejemplos de proteínas determinadas por EC, aunque también se realizan estudios de:

##### Pureza y Ensayos:

- ✓ Cuantificación de contaminantes y excipientes
- ✓ Investigación de muestras antes de la secuenciación de proteínas

##### Estudios Estructurales:

- ✓ Métodos en dos dimensiones, es decir, EC-CLAR.
- ✓ Microheterogeneidad de las proteínas complejas: por ejemplo: anticuerpos monoclonales, glicoproteínas, histonas, transferinas
- ✓ Oligomerización

##### Estudio de Complejos:

- ✓ Calcio, y zinc-proteína.
- ✓ Inmunocomplejos antígeno-anticuerpo.
- ✓ Complejos Fármaco-proteína.
- ✓ Complejos ADN-proteína.

##### Análisis de procesos:

- ✓ Cuantificación del producto final.
- ✓ Monitoreo de la digestión enzimática.
- ✓ Monitoreo derivatización en el etiquetado.
- ✓ Deamidación de la reducción del puente disulfuro.
- ✓ Cambios conformacionales

##### Estudios de estabilidad:

- ✓ Medio ambiente, pH, efectos de la temperatura.

##### Mediciones en la movilidad:

- ✓ Predicción de la separación en modelos semi-empíricos.

**Diagnóstico Clínico:**

- ✓ Ensayos en suero y proteínas
- ✓ Variaciones en la hemoglobina
- ✓ Isolación de neuropéptidos del tejido cerebral.
- ✓ Citocinas, transferinas, metalotioninas.
- ✓ Isoenzimas. (Gerald L., 1995, Pp. 69-73; Lèveque, 1997, Pp.67-75)

TABLA 15. EJEMPLOS DE PROTEÍNAS DETERMINADAS POR ELECTROFORESIS CAPILAR.

ALGUNAS PROTEÍNAS EN PLASMA HUMANO	MOVILIDAD (mm/s/kV)
Prealbúmina	0.188
Albúmina	0.160
$\alpha_1$ -Ácido glicoproteínico	0.149
$\alpha_1$ -Antitripsina	0.143
Haptoglobulina	0.131
$\alpha_2$ -Macroglobulina	0.109
Transferrina	0.105
$\beta$ -Lipoproteína	0.112
Inmunoglobulina A	0.090-0.100

La FDA de Norteamérica recomienda las buenas prácticas de manufactura en la fabricación de medicamentos, indica que todos los productos farmacéuticos deben ser analizados para: "identidad, potencia, calidad, y pureza". Aunque muchos científicos analíticos del área de desarrollo en biotecnología consideran estos preceptos demasiado vagos, servir como guías de consulta eficaces para el análisis biofarmacéutico. Cuando uno de los autores trabajaba en la industria biofarmacéutica, se desarrollan "ocho puntos", modelo para dirigir el desarrollo analítico de cualquier *macromolécula nueva*.

Según el modelo, los análisis se deben desarrollar y validar para tratar cada uno de los siguientes puntos:

- |                   |                             |
|-------------------|-----------------------------|
| 1) Identidad      | 5) Pureza                   |
| 2) Heterogeneidad | 6) Consistencia del proceso |
| 3) Cantidad       | 7) Estabilidad              |
| 4) Actividad      | 8) Seguridad                |

La ECA se puede utilizar directamente para todos los puntos excepto, quizás, para los puntos 4 y 8, que generalmente se trata de un análisis biológico y microbiológico. Los ocho puntos que recomienda la FDA, se realiza para el control de productos tanto farmacéuticos, como del área clínica que incluyen proteínas, vitaminas, péptidos, aminoácidos, carbohidratos, entre otros. (Roos G., 1997, Pp. 275-284)

### 6.5.5 ANÁLISIS GENÉTICO.

Desde la primera publicación de la estructura helicoidal doble del ADN por Watson y Crick en 1953, la electroforesis ha sido un estándar entre las herramientas analíticas usadas en bioquímica moderna, y sigue siendo la opción para el análisis de ácidos nucleicos. Las capacidades de la automatización y de la cuantificación hacen sustituir el formato del gel clásico usado para el análisis genético. Introduciendo un polímero en un tubo capilar, entonces se puede crear un tamiz molecular. Este matiz de introducir un gel físico en el tubo capilar para permitir separaciones por tamaño se llama el electroforesis capilar del gel (ECG), utilizándose en:

- ⊗ Control de calidad de oligonucleótidos,
- ⊗ Expresión de genes
- ⊗ Determinación viral cuantitativa,
- ⊗ Estudios de la expresión de genes<sup>81</sup>,
- ⊗ Análisis de las interacciones ADN-proteína,
- ⊗ Genotipificación<sup>82</sup>
- ⊗ Secuenciación<sup>83</sup> de ADN (automatizada). (Jeff C., 1999, Pp 86-99)

---

<sup>81</sup> *Gen* - La unidad hereditaria básica, definida inicialmente por el fenotipo (Expresión observable del genotipo, como rasgo morfológico, bioquímico o molecular).

<sup>82</sup> Técnica mediante la cuál se realiza la caracterización, separación o aislamiento de genotipos (contienen información genética de un individuo)

<sup>83</sup> . Por definición molecular, una secuencia de ADN necesaria para la producción de un producto funcional, normalmente una proteína pero en ocasiones ARN (Ácido Ribonucleico).



## COMENTARIOS DE LA PARTE I

En los capítulos anteriores, se ha dado un panorama de los aspectos fundamentales sobre la Electroforesis Capilar, que abarca una breve historia de la evolución de la Electroforesis Capilar, el fundamento de la técnica de separación, así como los principios teóricos, las distintas modalidades como se presenta la Electroforesis Capilar (todas bajo un mismo fundamento), las partes de un instrumento para realizar Electroforesis Capilar, y por último las diversas áreas de aplicación y algunos ejemplos.

Todos éstos capítulos que a su vez forman parte de la primera sección **ASPECTOS ELECTROFORÉTICOS**, son de gran utilidad para la realización del trabajo final, que es el diseño y desarrollo de un Sistema Multimedia sobre los Fundamentos de la Electroforesis Capilar, que ha sido denominado **FEC**.

El propósito de **FEC** fue abarcar los aspectos más importantes de la Electroforesis Capilar como técnica analítica de separación, así como sus aplicaciones en el área de las ciencias químico-biológicas.

En la siguiente sección, **ASPECTOS COMPUTACIONALES** se describe el uso de la computadora en la educación, los sistemas multimedia, cómo desarrollar un sistema multimedia, requerimientos del hardware y software para desarrollar **FEC**.

PARTE II

ASPECTOS

COMPUTACIONALES

# CAPÍTULO 7

MARCO

TEÓRICO

COMPUTACIONAL

## 7. ASPECTOS COMPUTACIONALES

### 7.1 LAS COMPUTADORAS EN LA EDUCACIÓN.

Actualmente, la cantidad de información que se genera, hace necesario que se busque la forma de transmitirla, por lo que los profesores se han apoyado en instrumentos y materiales didácticos como, diapositivas, vídeos, transparencias, etcétera. Sin embargo esta evolución no ha sido suficiente, debido a la gran cantidad de información y principalmente a la velocidad con la que estos se generan, por lo que es necesario diseñar un nuevo esquema de enseñanza y aprendizaje, en el cuál los profesores no sean la fuente principal de transmisión del conocimiento y se enfoquen en la motivación y el aprendizaje de los alumnos.

Las computadoras realizan diferentes actividades tales como el cálculo de datos, almacenamiento de archivos, procesamiento de información así como la generación de gráficos; haciendo que el usuario tenga mayor tiempo para pensar, comprender los problemas y dedicar más tiempo al descubrimiento y la creatividad. Por tal motivo las computadoras son recomendadas porque:

- ☐ Favorecen el trabajo grupal y el intercambio de ideas y experiencias. La riqueza se encuentra en el intercambio de información de ideas entre el usuario ante cuestiones y problemas que plantean los distintos *Software*.
- ☐ Amplían la atención activa del profesor. Como el profesor es el guía del proceso de enseñanza-aprendizaje, entonces los alumnos deben tener la posibilidad de consultar la información cuando la necesitan, realizando preguntas adecuadas para enriquecer y ampliar el proceso de aprendizaje.
- ☐ Proponen un trabajo interactivo. La naturaleza de las computadoras es dar resultados inmediatos, efectuar acciones instantáneas, las que hacen posible que el usuario obtenga respuestas inmediatas, y que pueda, a su vez realizar actividades con la computadora que lo convierte en partícipe de la acción.

- ❑ Son fuente de motivación. Además del "status tecnológico" que han cobrado las computadoras, su atractivo está en las posibilidades que ofrecen para emprender diversas tareas y funciones, así como su poder gráfico y sonoro, elementos atractivos para los usuarios.
- ❑ Aumenta el grado y tiempo de atención. Siempre y cuando las estrategias y los materiales con que se usen resulten significativas. Aunque indudablemente el trabajar con las computadoras requiere un grado mínimo de atención.
- ❑ Ahorran tiempo de trabajo. Por lo que dejan más espacio para la creatividad y para reflexionar.

## 7.2 SISTEMAS MULTIMEDIA

La multimedia surgió a finales de los 80's, según Tay Vaughan, estimula los ojos, oídos, yemas de los dedos y lo mas importante, la cabeza, mejorando también la interface tradicional basada solo en texto, proporcionando beneficios importantes que atraen y mantienen la atención y el interés, mejorando la retención de la información presentada, y cuando esta bien diseñada puede ser muy divertida. (Jiménez D., 1998, Pp. 87-88)

La capacidad de los sistemas multimedia y el aumento de recursos, permite explorar nuevas estrategias de enseñanza, produciendo sistemas instructivos innovadores que ofrecen a los usuarios más opciones para su formación. La incorporación de vídeo, gráficos, texto, sonido y animación en un sistema puede ser de gran ayuda para el usuario para recibir, procesar y actuar sobre la gran cantidad de información presentada.

Uno de los vocablos con más definiciones asignadas de los últimos años es la palabra multimedia, por lo que es difícil definir en pocas palabras éste término.

Entre las definiciones más amplias de multimedia, se pueden destacar las siguientes:

- Técnica de unir e integrar en un sólo sistema de información los múltiples medios que utiliza el mundo actual para la comunicación, como pueden ser textos, datos, gráficos, imágenes fijas, animación, vídeo, audio y efectos especiales; todo ello enmarcado en la informática y las telecomunicaciones.
- Conjunto de elementos físicos y lógicos que soporta una plataforma o entorno de información multisensorial e interactivo.
- Conjunto de técnicas que permite unir las distintas tecnologías de diferentes plataformas, tanto de soporte físico como lógico, en una sola, para dar, como resultado final, un sistema único e integrado con una aplicación común.

En el presente trabajo se definirá multimedia como técnica de integrar múltiples medios a través de una computadora, incorporando: texto, objetos gráficos, sonidos, animaciones y vídeos, para dar como resultado final un sistema integrado con una aplicación común sobre un tema específico.

Para realizar un sistema multimedia, se requiere de gran capacidad de almacenamiento, alta velocidad de procesamiento y de mucha memoria RAM y ROM.

❖ Según el mercado al que se orienta un sistema Multimedia puede ser:

- Educativa: integración de textos, sonidos, imágenes fotográficas y vídeo aprovechando la capacidad de almacenamiento óptico. Se orienta a Turismo, Enseñanza de idiomas, lingüística, incluso puede utilizarse para la enseñanza de la química, física, etc, o cualquier otra área que se desee.
- Profesional: soluciones de autor que integran texto, imagen, vídeo y sonido. Es decir se plantean incluso problemáticas experimentales por ejemplo: la ruta para identificar dos sustancias que tienen propiedades similares, por determinado método (Cromatografía de líquidos, Electroforesis Capilar, etcétera)
- Doméstica: bibliotecas electrónicas, vídeos, telecompra, acceso remoto, etcétera.

❖ Según la tecnología empleada:

- Orientada a Audio: producción y edición de música instrumental y sonido en general. Facilitan la grabación, mezcla, reproducción y manipulación de sonidos en diferentes formatos.
- Orientada a Imágenes: tratamiento y manipulación de imágenes, gráficos; normalmente se usa para presentaciones.
- Orientada a Vídeo y Animación: captura y proceso de imágenes dinámicas.
- Orientada a Almacenamiento: digitalización, indización y almacenamiento de documentos. Se orienta a Gestión Documental. No confundir el término indización<sup>84</sup>, con el término indexación<sup>85</sup>. (<http://map.es/csi/silice/Mul2.html>, Mayo 18, 2001)

### 7.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS SISTEMAS MULTIMEDIA

Se pueden analizar cuatro características fundamentales en los programas Multimedia: (<http://www.utp.ac.pa/seccion/topicos/multimedia/antecedentes.html>, Junio 2001)

#### 7.3.1 INTERACTIVIDAD

Denominamos interacción a la comunicación recíproca, a la acción y reacción. Una máquina que permite al usuario hacerle una pregunta o pedir un servicio es una "máquina interactiva"<sup>86</sup>. La interacción como acceso a control de la información está muy potenciada con los sistemas Multimedia. Dependerá del contexto de utilización de los recursos multimedios, y en qué medida potencien también la interacción comunicativa.

---

<sup>84</sup> Asignación de términos a un documento con el objetivo de representarlo temáticamente. Forma parte del conjunto de elementos de la Descripción Documental.

<sup>85</sup> Proceso automático de generación de índices.

<sup>86</sup> Por ejemplo; un cajero automático es una típica máquina interactiva, responde a las preguntas, facilita datos o dinero, según la intención del cliente.

### 7.3.2 RAMIFICACIÓN

Es la capacidad del sistema para responder a las preguntas del usuario encontrando los datos precisos entre una multiplicidad de datos disponibles. Gracias a la ramificación<sup>87</sup>, cada alumno puede acceder a lo que le interesa, prescindiendo del resto de los datos que contenga el sistema, favoreciendo la personalización.

### 7.3.3 TRANSPARENCIA

Es recomendable que el usuario, llegue al mensaje sin estar obstaculizado por la complejidad de la máquina. La tecnología debe ser tan transparente como sea posible, tiene que permitir la utilización de los sistemas de manera sencilla y rápida.<sup>88</sup>

### 7.3.4 NAVEGACIÓN

En los sistemas multimedia se llama navegación a los mecanismos previstos por el sistema para acceder a la información contenida realizando diversos itinerarios a partir de múltiples puntos de acceso, y que dependen de la organización lógica del material elaborado en el diseño (secuencial, en red, en árbol de decisiones, etc), las conexiones previstas entre los nodos y la interfase diseñada para ser utilizada por el usuario. Los sistemas Multimedia nos permiten "navegar" sin extraviarnos por la inmensidad del océano de la información contemporánea, haciendo que la "travesía" sea grata y eficaz al mismo tiempo.

## 7.4 VENTAJAS DE MULTIMEDIA.

- Posibilidad de controlar la cantidad de información. El autor puede seleccionar la cantidad y el tipo de información que introducirá y el usuario elige la información que desea recibir y en qué momento desea recibirla.

---

<sup>87</sup> Es una metáfora, utilizada hace tiempo por la enseñanza programada, inspirada en la forma en que crecen los árboles, con un tronco central del que nacen distintas ramas, que se van haciendo cada vez más estrechas a medida que se alejan del tronco.

<sup>88</sup> sin que haga falta conocer cómo funciona el sistema.



- ✧ Flexibilidad. El material digital puede ser fácil y rápidamente actualizado y presentado a través de innumerables medios.
- ✧ Rapidez de acceso y durabilidad, esto se logra con la enorme cantidad de información que se puede almacenar actualmente y a su confiabilidad.
- ✧ Disponibilidad de la información en el momento necesario.
- ✧ Información atractiva y fácil de asimilar.
- ✧ Ambiente sin riesgos (usando simuladores)
- ✧ Costo-beneficio, se aprovechan todos los materiales existentes en el sistema multimedia, ahorrando recursos en materiales impresos difíciles de actualizar y usando en innumerables ocasiones sin restricción alguna.
- ✧ En el ámbito educativo, puede aumentar la motivación y el gusto por aprender y puede, eventualmente reducir el tiempo de aprendizaje.

## 7.5 DESVENTAJAS DE MULTIMEDIA

- ✧ Alto costo del material de los equipos y de la producción del material.
- ✧ Falta de estandarización<sup>89</sup>.
- ✧ El desarrollar un programa multimedia requiere mas habilidades creativas y tecnología refinada, por lo que su desarrollo no es sencillo y a la vez es laborioso.
- ✧ Requiere de muchos recursos y tiempo para su elaboración.
- ✧ Falta de programas en cantidad y calidad en lengua castellana.  
([http://www.ciberaula.es/quoerns/html/sistema\\_multimedia.htm](http://www.ciberaula.es/quoerns/html/sistema_multimedia.htm), Mayo, 2001)

Las categorías identificadas para la aplicación de soluciones multimedia son:

- Educación Elemental y Secundaria.
- Educación para Adultos.
- Autoformación (enciclopedias multimedia).
- Realización de Presentaciones Comerciales y Técnicas.

---

<sup>89</sup> Se refiere a que existen una gran cantidad de marcas y estándares que se reduce a: Multimedia PC para compatibles y por otro lado, *Macintosh de Apple*.

En general las aplicaciones más comunes que incluyen tecnología multimedia son:

- Técnicas Documentales;
- Puntos de Información;
- Puntos de Venta;
- Formación, Aprendizaje, Presentaciones;
- Síntesis de Voz;
- Realidad Virtual, Telepresencia, Simulaciones;
- Vídeo Conferencia;
- Internet (<http://www.utp.ac.pa/seccion/topicos/multimedia/antecedentes.html>, Junio 2001;  
<http://map.es/csi/silice/Mul2.html>, Mayo 18, 2001)

## 7.6 MULTIMEDIA Y EDUCACIÓN

La utilización de los sistemas multimedia en la educación responde a una nueva concepción de la enseñanza como un proceso no lineal, y a la integración de texto, imágenes y sonido, habitualmente bajo el control de una computadora. Desde un punto de vista educativo, lo fundamental de multimedia es que ofrece una red de conocimiento interconectado que permite al estudiante moverse por rutas o itinerarios no secuenciales y, de este modo suscitar un aprendizaje "incidental". En oposición al aprendizaje dirigido por una serie de órdenes sobre tareas a realizar, se propone aprender por descubrimiento personal basado en la experiencia de explorar "navegar" a través del programa. Esta diferencia es la que marca el potencial, y el peligro, de la utilización de estos medios para la formación.

El sistema multimedia aumenta la motivación por la enseñanza al presentar estímulos que facilitan la autoactividad del alumno, la seguridad en el proceso de aprendizaje y el cambio de actividad.

El sistema multimedia viene a agrupar, integrar medios, e manera que tanto estudiantes como profesores se puedan adentrar en el texto escrito y reforzar la

idea con una imagen de lo que leen, con un vídeo o una animación del fenómeno que estudian. (<http://www.unp.edu.pe/ingindustrial/dainfo/sis982/TOOLBOOK.html#MULTIM>, Mayo, 2001; <http://www.ucm.es/info/multido/multidoc/revista/num8/1segura.htm>, Mayo, 2001)

## 7.7 SISTEMAS DE DESARROLLO MULTIMEDIA

Un Sistema de Desarrollo Multimedia, es un programa que utiliza un paradigma o metáfora computarizada de un libro y tiene preprogramado elementos para el desarrollo de *software* multimedia interactivo. Son la forma más rápida de realizar una aplicación multimedia, ya que no es necesario conocer en detalle el lenguaje de programación.

Los Sistemas de Desarrollo Multimedia típicos incluyen herramientas para hipertexto<sup>90</sup>, imágenes, animaciones, videos, sonidos, conectividad a bases de datos, y comunicación entre procesos. Adicionalmente, cada vez más sistemas de esta clase proveen lenguajes de programación propios para poder desarrollar aplicaciones más avanzadas.

La gran ventaja de utilizar un Sistema de Desarrollo Multimedia, es el fácil uso que se provee a los no-programadores, ya que con solo tener conocimientos básicos en algoritmos, este debe ser capaz de realizar aplicaciones multimedia con un nivel de complejidad bajo.

Estos sistemas también llamados *authoring*, incluyen elementos de programación orientada a objetos y manejo de pantallas o *frames* donde se pueden incorporar objetos como texto, gráficos, animación, audio, secuencias de video, de manera rápida y fácil<sup>91</sup>.

---

<sup>90</sup> Es una organización no lineal de acceso a la información textual; por ejemplo acceso a textos y diagramas estáticos, imágenes y tablas.

<sup>91</sup> Un *authoring* es una herramienta integradora de medios para desarrollar aplicaciones multimedia que brinda el marco esencial para organizar y editar los elementos multimedia (gráficos, textos, sonidos, animaciones y secuencias de video). Soporta muchos dispositivos de hardware y formatos de archivos. Además proporciona una estructura de navegación para estos elementos, usualmente en forma de una especie de sistema de hiperenlaces (Jiménez D., 1998. Pp.89)

En éstos sistemas los elementos se organizan como páginas de un libro o bien como una fila de tarjetas. Se puede disponer de miles de páginas o tarjetas de un libro, las cuáles están ligadas en secuencias organizadas, para poder desplazarse a cualquier página que desee dentro del libro o bien a otro libro. Además de que permiten reproducir elementos de sonido y vídeo; así como ejecutar animaciones. Los elementos multimedia de éstos sistemas, se organizan como objetos dentro del marco estructural o proceso.

Estas herramientas de desarrollo se dividen basándose en la secuencia y organización de los elementos y eventos:

- Herramientas basadas en tarjetas o páginas<sup>92</sup> (*Hipercard, Supercard, Asymetrix Multimedia ToolBook*).
- Herramientas basadas en iconos controlados por eventos<sup>93</sup> (*Autoware Profesional, Icon Author, HSC Interactive*).
- Herramientas basadas en tiempo de presentación<sup>94</sup> (*Action y Animation Works Interactive*).

Los paradigmas también son conocidos como la metáfora de "creación", es decir esta es la metodología por medio de la cual el Sistema de Desarrollo Multimedia cumple su tarea. Existen varios paradigmas, algunos de ellos son:

- ⇒ Lenguaje guiado (*Scripting Lenguaje*)
- ⇒ Icono/Control de Flujo (*Iconic/Flow Control*)
- ⇒ Enmarcado (*Frame*)

---

<sup>92</sup> En estos sistemas, los elementos se organiza como páginas de un libro o como una pila de tarjetas. Se puede disponer de miles de páginas o tarjetas en un libro, o pila, las cuáles están ligadas en secuencias organizadas, para así poder saltar (si lo ordena) a cualquier página que desee dentro de un patrón organizado estructurado. Estos sistemas permiten reproducir elementos de sonido, ejecutar animaciones y reproducir video digital.

<sup>93</sup> En estos sistemas, los elementos de multimedia y las señales de interacción (eventos) se organizan como objetos de un marco estructural, o proceso.

<sup>94</sup> En estos sistemas de desarrollo, los elementos y eventos se organizan a lo largo de una línea de tiempo con resoluciones tan altas como un treintavo de segundo.

- ⇒ Tarjeta/Guión (*Card/Scripting*)
- ⇒ Elenco/Registro/Guión (*Cast/Score/Scripting*)
- ⇒ Jerarquía de Objetos
- ⇒ Enlaces de Hipermedios (*Hypermedia Linkage*)
- ⇒ Etiquetando (*Tagging*)

A continuación, se darán brevemente las definiciones de cada uno de estos paradigmas: (<http://www.unp.edu.pe/ingindustrial/dainfo/sis982/TOOLBOOK.html#MULTIM>, Mayo, 2001; <http://ldc.usb.pe/~94-26663/contenido.htm>, Mayo, 2001)

1.- **Lenguaje guiado (*Scripting Lenguaje*):** Es un método de creación basado en la tradicional programación, lo cual tiende a tomar mucho tiempo para el desarrollo de la aplicación multimedia buscada, sin embargo se obtiene como ventaja gran "poder" para realizar la aplicación.

2.- **Íconos/Control de Flujo (*Iconic/Flow Control*):** Este paradigma tiende a ser el más rápido en cuanto tiempo de desarrollo, adicionalmente es el mejor para realizar de manera rápida prototipos y el desarrollo de aplicaciones en períodos de tiempo cortos. Esta basada en una paleta de iconos, la cual contiene las posibles funciones e interacciones del programa, y una línea de flujo, la cual muestra los enlaces actuales entre los iconos. La desventaja de los programas que utilizan este paradigma, es que la ejecución de los mismos es muy lenta, porque cada interacción implica un gran número de posibles permutaciones de eventos a realizar. Los programas más conocidos con este paradigma son *Authorware* e *Icon Author*.

3.- **Enmarcado (*Frame*):** Es similar al paradigma anterior, ya que incorpora la paleta de iconos, sin embargo los enlaces existentes entre los íconos, son conceptuales y no representan el flujo actual de la aplicación. Es un paradigma para realizar rápidos desarrollos, pero requiere muchas funciones de "*debugging*". Ejemplo de programas con este paradigma: *Quest* y *Apple Media*.

4.- **Tarjeta/Guión (Card/Scripting):** Provee gran "poder" gracias a la ayuda de la incorporación del "scripting", pero la estructura de tarjetas limita dicho poder. Es excelente para aplicaciones de Hipertexto y aplicaciones de navegación intensiva como lo sería el juego "MYST". Una aplicación con este paradigma es *HyperStudio* y *Toolbook*.

5.- **Elenco/Registro/Guión (Cast/Score/Scripting):** Este paradigma utiliza como metáfora, un registro o "score" de música. Los elementos sincronizados son mostrados en varias pistas o "tracks". El verdadero "poder" de esta metáfora se basa en la posibilidad de dirigir (*script*) el comportamiento de cada uno de estos elementos o miembros del elenco. Ejemplos típicos de aplicaciones con este paradigma son *Director* y *Flash*

6.- **Jerarquía de Objetos:** Utiliza una metáfora de Objetos el cual es visualmente representado por objetos incrustados e iconos de propiedades. El problema de este paradigma radica en que la curva de aprendizaje es no trivial, ya que la representación visual se puede complicar demasiado. El *software Factory* utiliza esta metáfora.

7.- **Enlaces de Hypermedios (Hypermedia Linkage):** Es muy similar al paradigma de *frames*, el cual muestra enlaces conceptuales entre los elementos, sin embargo este paradigma carece de una metáfora visual. El programa *Omnimedia* es uno de los *software's* más comercializado que utiliza este paradigma.

8.- **Entiquetando (Tagging):** Este paradigma utiliza etiquetas en archivos de texto (por ejemplo *Html* y *WinHelp*) para enlazar diversas páginas, provee interactividad y puede integrar elementos multimedia. Se usa normalmente para referencias en línea, como lo pueden ser diccionarios y manuales.

*Asymetrix's Multimedia Toolbook:* La metáfora computacional de éste *authoring* es crear la aplicación, hay que construir un libro, se crean páginas, colocando objetos en éstas y escribiendo guiones (*scripts*) en el lenguaje *Toolbook OpenScript*, para

ejecutar acciones; es una buena herramienta, para desarrollar aplicaciones Multimedia. (<http://www.unp.edu.pe/ingindustrial/dainfo/sis982/TOOLBOOK.html#MULTIM>, Mayo, 2001; <http://ldc.usb.vc/~94-26663/contenido.htm>, Mayo, 2001)

## 7.8 DESARROLLO DE SISTEMAS MULTIMEDIA EN FARMACIA INDUSTRIAL.

Atendiendo a la problemática existente en el área de Tecnología Farmacéutica de la FES Cuautitlán, referente a la existencia de una cantidad extensa de información así como el corto periodo de tiempo en que los profesores tienen que cubrir los cursos, a su vez lleva a que los alumnos no puedan profundizar en los temas de su interés, se planteó desarrollar una serie de sistemas multimedia que apoyen a los profesores en la enseñanza del Químico farmacéutico Biólogo (a partir del 7º y hasta el 9º semestres), específicamente en el área de farmacia.

Los sistemas que se han desarrollado hasta el momento son PROYECTO MEZCLADO (Mezclado de Polvos), BUPRAMA (Buenas Prácticas de Manufactura), FLUIDIZA (Fluidización), MACALI (Manual de Caliad), DISPOLTAB (Disolución de Polvos y Tabletas) y MACROMIL (Manual de Operación para el Manejo del Cromatógrafo WATERS y del *Software Millenium 2010*). Estos sistemas multimedia son el antecedente inmediato, por lo menos en México, del Sistema Multimedia para explicar los Fundamentos de la Electroforesis Capilar como técnica analítica.

Descripción breve de los sistemas multimedia Mencionados:

### 7.8.1 PROYECTO MEZCLADO

Este sistema está conformado por 98 páginas, 13 hotwords, 66 imágenes, 3 animaciones en tercera dimensión y 7 archivos de sonido.

Está dividido en 5 temas o módulos principales.

1. **Introducción.** Sección que hace una presentación del tema de mezclado de polvos farmacéuticos.

2. **Mecanismos.** Esta sección se ocupa de explicar cómo ocurre el mezclado y la segregación así como las causas y mecanismos de ambos procesos.
3. **Equipo.** Se muestran los equipos más representativos para ésta operación unitaria, una clasificación de éstos y algunos criterios empleados para su elección.
4. **Factores Farmacéuticos.** Sección que explica los factores que influyen sobre la operación unitaria y el modo en que lo hacen.
5. **Validación.** Se define a la validación y explica como realizar en la operación, el mezclado de polvos farmacéuticos.

"PROYECTO MEZCLADO" cuenta con la sección e Ayuda. (Rafael M.M., 1997)

### 7.8.2 BUPRAMA

Sistema computacional constituido por 200 pantallas, 142 imágenes, 600 hotwords, 14 objetos gráficos (diagramas de flujo y formatos de procedimientos) y 4 animaciones vinculadas a archivos de sonido.

En "BUPRAMA" se abarcan los siguientes capítulos:

1. **Introducción.** Se aborda que son, que función tienen,, la importancia y la relación de las Buenas Prácticas de Manufactura, el Control de Calidad y el Aseguramiento de Calidad; se da una breve historia de cómo surgieron las Buenas Prácticas de manufactura y se mencionan las características de forma general de la *Food and Drug Administration* (FDA), las normas ISO 9000 y las Normas Oficiales Mexicanas.
2. **Documentación Técnica.** Se escriben los documentos técnicos utilizados dentro de la industria farmacéutica, como son: Procedimientos estándar de Operación, procedimientos de fabricación, entre otros; y se indica la importancia de contar con un sistema de documentación apropiado.
3. **Instalaciones.** Se dan las características generales e individuales e las diferentes áreas que conforman un establecimiento farmacéutico como son: almacenes, producción, control de calidad y auxiliares.



4. **Personal.** Se mencionan los diferentes tipos y características del personal dentro de la industria farmacéutica, se describen los diferentes tipos de indumentaria y accesorios utilizados, entre otros.
5. **Equipo.** Se abordan los aspectos de construcción, diseño, limpieza, mantenimiento y operación del equipo, y se mencionan de manera general las características del equipo utilizado en la producción de sólidos.

"BUPRAMA" cuenta con una sección de ayuda. (Jiménez D., 1998)

### 7.8.3 FLUIDIZA

Está conformado por 178 páginas, 137 imágenes y 47 *hotwords*. "FLUIDIZA" abarca los siguientes temas:

1. **Introducción.** Se describe brevemente de dónde viene la teoría de la fluidización así como su importancia en la industria farmacéutica.
2. **Fundamentos.** Se explica el fenómeno de la fluidización, los regímenes de fluidización, la velocidad mínima de fluidización, características importantes de los lechos fluidos y las variantes de los lechos fluidos.
3. **Equipos.** Se describen las características de los equipos de lecho fluido así como en que casos se utiliza cada uno de ellos y las características de producto terminado que se obtienen.
4. **Procesos.** Se explican los cuatro procesos que se pueden realizar en un lecho fluido.
5. **Escalamiento.** Se explican las consideraciones que deben tomarse en cuenta para llevar a cabo el escalamiento en lecho fluido. Se divide escalamiento de proceso de granulación y escalamiento en el proceso de recubrimiento.

En éste caso la ayuda es una sección más de fluidiza, se divide en subtemas, que tienen un botón que identifica y permite acceder a la información deseada directamente.

Dichos subtemas son:

- ✓ Estructura del programa.
- ✓ Movimiento a través de páginas.
- ✓ Tipos de botones contenidos en imágenes.
- ✓ Tipos de botones usados para explicar las gráficas.
- ✓ Tipos de campos e texto.
- ✓ Palabras especiales. (Bahena T., 1999)

#### 7.8.4 MACALI

Éste sistema está formado por 120 pantallas, 45 imágenes, 37 hotwords o palabras clave, 12 archivos de sonido, 1 archivo de vídeo y 17 objetos gráficos (tablas y formatos).

Los temas que abarca MACALI son:

1. **Introducción.** Se describen el objetivo y el alcance el manual de calidad a sí como las responsabilidades sobre el mismo en cuanto a revisión.
2. **Responsabilidad administrativa o Gerencial.** Aquí se detallan la declaración política de calidad, responsabilidades y autoridad, autoridad y representante de la dirección, las responsabilidades del área de aseguramiento de la calidad, autoridad del subdirector de aseguramiento de la calidad y la revisión del sistema de calidad.
3. **Sistema de calidad.** Se explican el objetivo y el alcance del sistema de calidad y la matriz de funciones de aseguramiento de la calidad.
4. **Revisión de contrato.** Se da la definición y el objetivo de la revisión del contrato.
5. **Control e documentación.** Se detallan los documentos que se someten a control (manual de calidad, procedimientos generales y específicos, procedimientos normalizados de operación, documentación técnica y otros), el objetivo de un sistema de documentación y los procedimientos para realizar cada uno de dichos documentos.

6. **Aseguramiento de la calidad y de los suministros.** Se dan las generalidades del tema, se describe la planificación de las órdenes de compra y la evaluación y selección de proveedores.
7. **Identificación y rastreabilidad del producto.** Se explica todo lo referente a este rubro.
8. **Aseguramiento de la Calidad durante el proceso.** Se describe la documentación, el control de la producción, higiene de la producción, el control y mantenimiento de los equipos tecnológicos y la validación de los procesos de producción.
9. **Inspección y ensayo.** Se explica la inspección de recepción, inspección al proceso de producción, los ensayos de laboratorio, la inspección final y los registros de inspección.
10. **Aseguramiento metrológico.** Se da una breve introducción al tema, se describe el control y la verificación de los medios de medición y el control de las mediciones así como las acciones correctivas.
11. **Control de las no conformidades.** Se describen las quejas y/o reclamaciones, las devoluciones, el tratamiento de las conformidades y las acciones correctivas.
12. **Manipulación, envase, embalaje, almacenamiento y distribución del producto.** Aquí se describen cada una de estas etapas de manera breve.
13. **Estudios de estabilidad y vida de estante.** Se definen los estudios de estabilidad, los estudios de estante y las muestras de retención.
14. **Auditorias.** Se da una breve introducción al tema, las responsabilidades de la empresa para nombrar la comisión auditoria, la documentación necesaria para llevar a cabo la auditoria y las acciones correctivas oportunas para erradicar las deficiencias detectadas por los auditores.
15. **Capacitación del personal.** Aquí se dan las generalidades del tema: se describen las responsabilidades del Departamento de personal, los conocimientos requeridos para capacitar al personal, la identificación de las necesidades de aprendizaje, la evaluación del personal, la identificación de las necesidades de aprendizaje, la

evaluación del personal, la identificación de las necesidades de aprendizaje, la evaluación del personal y los registros de capacitación (expedientes de los trabajadores).

16. **Aplicaciones estadísticas.** Se explican la técnicas y métodos estadísticos que constituyen las herramientas básicas para el análisis y procesamiento de cualquier base de datos y tipo de información como son diagramas de Pareto, diagrama causa-efecto, inspección de muestreo estadístico y los gráficos de control.

En "MACALI" también se tiene un módulo de ayuda en el cual se describe el funcionamiento de los botones y las palabras clave. (Ferret S., 2000)

#### 7.8.5 DISPOLTAB

Este sistema está constituido por un total de 140 pantallas, 45 hotwords o palabras clave, 50 imágenes y 46 objetos gráficos (figuras y diagramas).

En "DISPOLTAB" se abordan los siguientes temas:

1. **Generalidades.** Da un panorama general de la disolución, definiciones importantes y explica para qué sirve realizar un ensayo en disolución *in-Vitro*.
2. **Reseña histórica.** Da una visión retrospectiva de la disolución para entender como ha ido evolucionando hasta nuestros días y como ha cobrado cada vez más importancia.
3. **Disolución de formas farmacéuticas sólidas.** Describe cómo se lleva a cabo el proceso de disolución de polvos y tabletas en términos reales, no sólo desde el punto de vista teórico y modelístico.
4. **Teorías y mecanismos de disolución.** Abarca las teorías y mecanismos ideales que explican un determinado comportamiento de cinética de disolución de un fármaco.
5. **Cinética de disolución.** Se dan los criterios generales para determinar el tipo de cinética que sigue la disolución de un fármaco así como el tratamiento e

interpretación de los datos obtenidos durante el estudio de perfiles de disolución.

6. **Metodología de estudios de disolución.** Se explica la metodología general a seguir durante un estudio de disolución in-Vitro, ya sea como control de calidad o con otro fin. Se describen los aparatos oficiales que se usan para hacer pruebas de disolución de polvos y tabletas, explicando también el procedimiento que debe seguirse. (Narvéez A., 2000)

### 7.8.6 MACROMIL

"MACROMIL" está conformado por 9 libros con un total de 507 pantallas, todas con el mismo fondo pero cada libro con un diferente color, los cuáles son:

1. **Bienvenida con acceso al menú principal.** Es el primer libro al que se tiene acceso y por medio de él se puede entrar a los demás libros. Al abrir el libro se ejecuta una animación y un vídeo de bienvenida, posteriormente pasa al menú principal.
2. **Introducción a la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).** Aborda temas relacionados con las bases cromatográficas, un poco de historia, términos, definiciones, parámetros cromatográficos y la clasificación de la cromatografía líquida.
3. **Características del instrumental CLAR Waters.** Se describen las características y especificaciones del equipo cromatográfico Waters, el cuál consta de un sistema conformado por un controlador 6005, Bomba 616, Detector de Arreglo de Fotodiodos (PDA) 996 y un Automuestreador 717 Plus.
4. **Procedimientos para el manejo del instrumental CLAR Waters.** Aquí se describe como encender y apagar el sistema cromatográfico, hasta como programar ciertas funciones, por ejemplo, programar tablas de gradiente desde el Controlador 6005 para el flujo de la bomba. Este libro presenta vídeos de cómo se maneja el controlador, la Bomba, el Detector y el

Automuestreador. Uno de los puntos importantes es la aplicación de simuladores con las cuáles el usuario podrá practicar el manejo del equipo sin necesidad de estar enfrente de él.

5. **Manejo del software Millenium 2010.** Se describen las características generales del software, se presentan los diferentes iconos, ventanas de acceso y el manejo general, desde como crear una carpeta de proyecto hasta la creación de todo un conjunto de métodos.
6. **Columnas y Solventes.** Se mencionan las diferentes columnas y solventes que pueden ser empleados en CLAR. Las características que presentan la selección de la columna, preparación de la fase móvil, etc.
7. **Preparación de muestras.** Se abordan los métodos de separación, el tratamiento previo que se les da a las muestras, la derivación y análisis cuantitativo.
8. **Problemas más comunes encontrados en CLAR.** Este libro abarca los problemas instrumentales y cromatográficos que se presentan con mayor frecuencia en la cromatografía líquida de alta resolución, con las posibles soluciones y las fuentes que los causan.
9. **Glosario de terminología,** aquí solo se hace referencia a las palabras poco comunes y a las de mayor interés en cromatografía.

"MACROMIL" también cuenta con una sección de ayuda a la cuál se tiene acceso desde cualquier parte del sistema. (Hernández S., 2001)

## REQUERIMIENTOS DEL HARDWARE Y SOFTWARE PARA DESARROLLAR SISTEMAS MULTIMEDIA.

### 7.9 REQUERIMIENTOS DEL HARDWARE.

La computadora adecuada para desarrollar aplicaciones multimedia debe tener:(Hernández, 2001, Pp. 221)

- Computadora personal con procesador Pentium con velocidad de 75 MHz o superior.
- Memoria RAM mayor a 8 MB.
- Almacenamiento en disco duro por encima de 200MB.
- CD-ROM u otro dispositivo de almacenamiento óptico.
- Tarjeta de sonido.
- Tarjeta aceleradora de gráficos.
- Tarjeta de vídeo (depende de las necesidades de desarrollo).
- Tarjeta digitalizadora de imágenes para conexión con el escáner.

### 7.10 REQUERIMIENTOS DEL SOFTWARE.

De acuerdo al rápido avance del *hardware* se tienen nuevas herramientas de *software* que facilitan la integración de tareas para desarrolladores de sistemas multimedia. Este software incluye técnicas de comprensión, lenguajes y ambientes de programación orientada a objetos (POO), bases de datos orientadas a objetos (BDOO) y sistemas integradores de medios (*Authoring*), que facilitan el desarrollo de sistemas multimedia, aún para quienes no poseen conocimientos de programación. (Jiménez. 1998, Pp. 88-89; Hernández, 2001, Pp. 221)

Para desarrollar el sistema multimedia sobre Fundamentos de Electroforesis Capilar FEC, se utilizó el *authoring Asymetrix Multimedia ToolBook*, ofrece una interface gráfica de *Windows* y un ambiente de programación orientado a objetos, a fin de presentar la información como dibujos, imágenes digitalizadas a color, texto, sonidos y animaciones.

### 7.11 ASYMETRIX MULTIMEDIA TOOLBOOK

*Asymetrix Multimedia ToolBook* permite crear y modificar tantos elementos como se desee en cualquier momento, realmente el único limite en este aspecto es el espacio físico de la pantalla y la memoria de la computadora. *Asymetrix Multimedia ToolBook* nos permite definir y situar cuadros con texto, imágenes, sonidos, iconos, animaciones, botones de comprobación y menús entre otros muchos elementos; tanto definidos por nosotros como extraídos de alguna de sus amplísimas librerías de imágenes, de iconos y de sonidos. Además incluye una gran cantidad de efectos especiales, de tal manera que es relativamente fácil hacer que las imágenes, se superpongan, hacer un fundido en negro, hacer que desaparezcan, que se muevan; tiene la ventaja de manejar uno o más archivos con que se construye la aplicación y sobre la cuál se adicionan y construye la aplicación, formada por dos capas:

- 1) El *Foreground* que corresponde a la última capa de la pantalla, y puede contener gráficos, textos, botones, imágenes y *hotwords*.
- 2) El *Background* que corresponde al fondo de la pantalla, y puede ser compartido por más de una página; conteniendo además los objetos del *Foreground*.

Todos los elementos que se deseen incluir tienen características visuales específicas que se pueden modificar de forma sencilla como: tamaño, color, aspecto externo, forma, si incluyen alguna imagen, su posición, etc. Además de estas características externas, cada uno de los objetos pueden llevar asociado un código, escrito en el lenguaje propio de *ToolBook*. El *OpenScript*, que es un lenguaje fácil de usar, por que



la sintaxis es muy sencilla (parecida al inglés), con un amplio rango de comandos y una naturaleza orientada a objetos.

Con la programación de *Open Script* se puede:

1. Definir la apariencia y comportamiento de los objetos.
2. Ejecutar las tareas interactivas y de programación.
3. Tener enlaces de tipo dinámico (DDLs<sup>95</sup>).
4. Tener acceso desde dentro del *Open Script* (con ayuda del Multimedia Resource Kit MMRK) al MCI de Windows para controlar dispositivos externos como CD-ROM, reproductores de disco láser, programas de animación, tarjetas de audio de forma onda, tarjetas de video superpuesto y secuenciadores MIDI (*Musical Instrument Digital Interface*).
5. Utilizar el teclado, ratón o pantallas de contacto (*Touch-Screen*) para interactuar con los diferentes medios y controlar el aspecto y secuencia del sistema.

Este tipo de orden controla lo que debe hacer un objeto cuando se produce algún suceso predeterminado. Por ejemplo se puede asociar a un objeto tipo botón un código que indique a *ToolBook* que hacer cuando se presiona con el ratón dicho botón (ir a otra página, hacer que aparezca un menú, importar un archivo de sonido).

De hecho los objetos de *ToolBook* son en cierta medida "orientados a sucesos", ya que los mecanismos de control que se disponen en el *Script* hacen referencia fundamentalmente a que debe hacer la aplicación cuando algún suceso ocurre, como en el ejemplo de la presión sobre un botón, o que debe hacer cuando se pasa una página, cuando se apunta con el ratón a algún lugar determinado, que debe hacer cuando el programa empieza o acaba, cuando pasa un tiempo específico, o incluso qué debe hacer cuando el usuario no hace absolutamente nada.

---

<sup>95</sup> Los DDL *Dinamic Link Library* (Bibliotecas de enlace Dinámico), son códigos de programación que se carga y descarga de memoria RAM de acuerdo a la aplicación que se esté utilizando.

*ToolBook* ofrece dos modos distintos en los que entrar en la aplicación: el modo autor y el modo lector. En uno se programa y en el otro se ejecuta la aplicación.

- El autor o *author* : este modo es el que aparece siempre que se entra en el programa *ToolBook*. Aquí es donde aparecen todos los menús de herramientas, se pueden modificar los elementos de cada pantalla y editar el código. En este modo la aplicación no se ejecuta, solo de una manera parcial en la ventana de comandos en la que se pueden obtener valores para variables globales, del sistema, o valores de variables locales (la página en la que estamos, el nombre asociado a algún objeto, etc.)
- El lector o *reader* : es tan sencillo como una pulsación del ratón sobre el icono correspondiente. En el modo lector la aplicación se presenta tal y como quedaría en su ejecución final. Desaparecen, pues la ventana principal y los menús de herramientas. No se puede modificar ningún elemento ni característica de la aplicación, ya que el código se está ejecutando. Como este modo es el que cualquier usuario ejecutaría la aplicación, el programa permite bloquear el acceso al modo autor mediante una contraseña, quedando así a salvo tanto el código como los diversos elementos de la aplicación generada de una posible intromisión.

Un objeto es cualquier elemento de *ToolBook*, desde el propio archivo global hasta las páginas y los elementos sencillos que en ella se encuentran. Cada objeto es diferente de los demás, no sólo por tener distinto color o distinto tamaño, sino porque cada uno de ellos tiene un código<sup>96</sup> asociado a él, así por ejemplo, a dos botones exactamente iguales podemos asociarles los códigos de avance y retroceso de página, respectivamente, lo que los convierte en un objeto con entidad propia, que no necesita de los demás para ejercer su misión. Así una línea en un menú ejecutaría un archivo de sonido (si es ese el código que le hemos asociado), independientemente del fondo o la

---

<sup>96</sup> Cada uno de estos elementos, aun perteneciendo a una clase determinada (página, menú, etc.), tiene unas características que le confieren identidad propia, es decir un número de id, que identifica a cada objeto de *ToolBook*.

pagina sobre los que se encuentre, e independientemente de los otros objetos junto a los que esté situado. Es esta orientación a objeto la que hace de *ToolBook* una herramienta especialmente potente para el desarrollo de aplicaciones multimedia.

La unidad fundamental es el libro (*Book*), que es cada uno de los programas generados y almacenados en un archivo de extensión "TBK", y su estructura es muy similar a la de un libro impreso, lo que facilita enormemente su comprensión. Al igual que un libro impreso tiene capítulo, un libro de *Toolbook* se compone de uno o varios fondos (*background*), como se observa en figura 35. Un fondo es un patrón (puede ser una imagen, dibujo, texto o cualquier otro elemento) que se repite secuencialmente en varias paginas sucesivas.

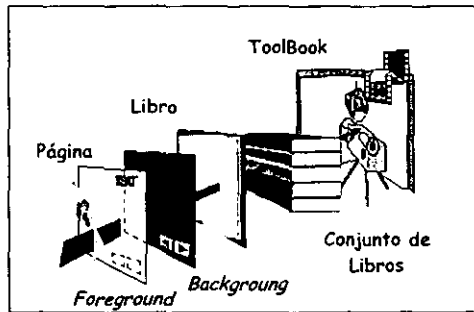


FIGURA 35. COMPOSICIÓN DE UN SISTEMA EN TOOLBOOK.

Por tanto, el siguiente objeto en el orden de precedencia es la pagina (*Page*), cada una de las pantallas que irán apareciendo sucesivamente en la aplicación o libro. En cada pagina pueden aparecer también una serie de objetos. Llamados grupos (*Group*), cada grupo es una combinación de objetos sencillos que son los elementos fundamentales que aparecen en cada pantalla de la aplicación: imágenes, cuadros de texto, botones, menús, animaciones y toda una amplia gama de los mas variados elementos necesarios para desarrollar una aplicación.

Un elemento adicional es la ventana (*Viewer*) desde de la que se presenta la aplicación. La ventana, que se comporta exactamente igual que cualquier ventana de Windows, es un objeto jerárquicamente inferior al libro. Una aplicación o libro de *Toolbook* permite

abrir y cerrar varias ventanas, pudiendo presentarse paginas diferentes, en las diferentes ventanas, pero todo ello formado parte de la misma aplicación. Cada ventana puede tener también una orden, y puede ser abierta o cerrada por el usuario o por la aplicación. Así, por ejemplo, en una pantalla general, al pulsar en un lugar determinado, puede abrirse una ventana en la que se ejecute una animación y luego se vuelva a cerrar. Al tener un código asociado a sus características físicas, cada uno de estos objetos deja de ser un simple elemento decorativo de la pantalla para convertirse en una potente herramienta de la que podremos obtener cualquier función deseada.

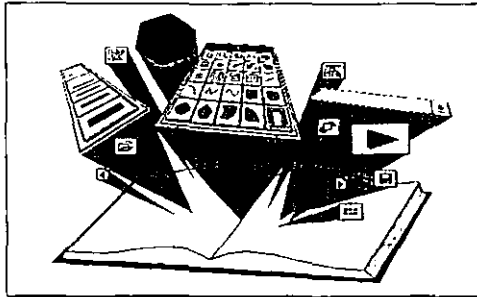


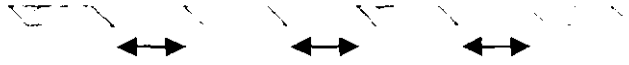
FIGURA 36. HERRAMIENTAS PARA DISEÑAR UN LIBRO EN TOOLBOOK.

Una vez que la aplicación está terminada, *ToolBook* permite almacenar el producto final como archivo *ToolBook* (extensión "TBK"), utilizando el programa *ToolBook*, o como ejecutable (extensión "EXE"), obteniéndose así un producto final de gran calidad y preparado para ser ejecutado en cualquier computadora con las características mínimas precisas. (<http://www.unp.edu.pe/ingindustrial/dainfo/sisi982/TOOLBOOK.html#MULTIM>, Mayo, 2001; <http://dc.usb.pe/~94-26663/contenido.htm>, Mayo, 2001)

Este tipo de herramienta permite tener aplicaciones con diferente tipo de navegación lo cuál da como resultado tener aplicaciones interactivas y pasivas.

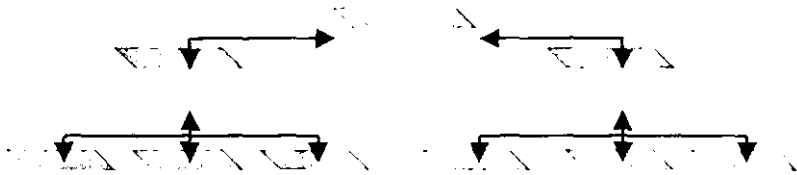
Las aplicaciones pasivas, están caracterizadas por un tipo de navegación lineal, en donde el usuario navega secuencialmente, de un cuadro o fragmento de información a otro. Como puede observarse, el usuario no tiene el control sobre la secuencia de la

presentación y por ende puede ser comparado con un video-grabación o un documental televisivo.

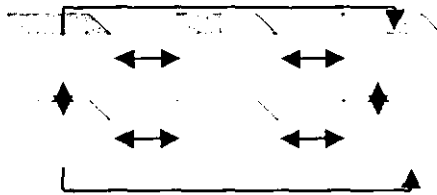


Las aplicaciones interactivas, en las cuáles el usuario, puede elegir la secuencia de la información dentro de un marco estructurado predefinido, el cuál pueden estar basados en los siguientes tipos de navegación:

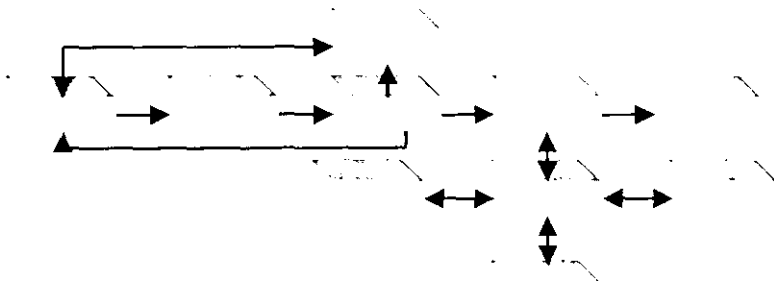
- a) **Jerárquica:** Navegación a través de ramas de la estructura de árbol que se forma dada la lógica natural del contenido.



- b) **No lineal:** Navegación a través del contenido sin limitarse a vías determinadas.



- c) **Compuesta:** Navegación en forma libre y en algunos casos limitada por una organización con más lógica.



El sistema multimedia FEC tiene un tipo de navegación compuesta, ya que el usuario elige cómo desea navegar, en forma lineal para llevar una secuencia lógica, o bien en forma aleatoria de acuerdo a sus preferencias o necesidades de conocimiento, en algunas ocasiones se ve limitada éste tipo de navegación, ya que en algunas páginas se debe regresar al tema para llevar un orden más lógico. (Jiménez. 1998, Pp. 87-91)

## MÉTODO DE DESARROLLO DEL SISTEMA MULTIMEDIA FEC

Para el desarrollo de FEC, se consideró la forma en que se desarrollaron los sistemas multimedia ya elaborados, entre ellos Proyecto de mezclado, FLUIDIZA, BUPRAMA, DISPOLTAB, MACALI y MACROMIL, mencionados anteriormente. Existen diversas etapas para la realización de un sistema multimedia, las cuáles varían de acuerdo a cada autor.

Para el desarrollo de FEC se tomaron en cuenta las siguientes etapas: Planeación, Concepción, Desarrollo, Depuración y Corrección, y empaquetamiento.

### ETAPAS:

#### 1. PLANEACIÓN.

En ésta parte se precisan las necesidades, el contenido, los objetivos, las características de la población definida; el cronograma y las previsiones presupuestarias para la realización del proyecto.

Por tanto, para realizar FEC primero que nada se analizó la importancia de elaborar un Sistema Multimedia sobre Electroforesis Capilar, y se establecieron los recursos tecnológicos necesarios como una Computadora personal con procesador Pentium III, con velocidad 550 MHz, memoria RAM de 128 MB, un CD-ROM, una tarjeta de sonido, tarjeta de video y una tarjeta digitalizadora de imágenes para conexión con el escáner, los cuáles se tienen en el Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos de la FES Cuautitlán campo 1.

Una vez establecidos los recursos tecnológicos disponibles, se delinearón los objetivos y el contenido de FEC. Posteriormente se realizó la búsqueda bibliográfica de los temas, se organizó y finalmente se depuró hasta obtener un escrito que abarcara todos los puntos a tratar, para que la información sirviera como base en la realización de FEC. Además se consideró que el sistema multimedia está dirigido a estudiantes de las carreras de las ciencias químico-biológicas para la enseñanza de la química analítica y las bases para el desarrollo de métodos analíticos en el área de la Electroforesis Capilar.

Con la ayuda del texto se realizó un diagrama de flujo de datos, en el cuál se determinó la relación entre los temas y subtemas sobre Electroforesis Capilar. Este diagrama fue de gran ayuda para el desarrollo de los enlaces entre las diferentes pantallas y libros de FEC. De ésta manera se estableció el tipo de navegación, el cuál era no lineal, ya que en el sistema multimedia se puede navegar de acuerdo a las necesidades o inquietudes del usuario, sin llevar una orden de navegación, aunque el usuario puede hacerlo. El sistema computacional cuenta en cada página con botones de navegación que permiten desplazarse en forma ordenada o bien aleatoria, pudiendo enlazarse a otros capítulos si así se deseara.

## 2. CONCEPCIÓN.

Es la etapa de la elaboración del diseño y organización pedagógica, que incluye la selección y articulación de los recursos y métodos, así como la puesta en escena de los diversos mensajes pedagógicos en función de las posibilidades que ofrece el medio tecnológico.

Para comenzar el desarrollo de FEC, era necesario contar con los conocimientos en el uso del sistema integrador de medios *ToolBook*, por lo que se tomó un curso-taller sobre la "Elaboración de Sistemas Multimedia", el cuál sirvió a grandes rasgos para saber el manejo del *ToolBook* como una herramienta de autoraje, así como la

digitalización de imágenes, de sonidos, video, animaciones, incluso un curso básico de *Corel Draw* para diseñar los dibujos y fondos utilizados en el sistema FEC.

En ésta etapa se realizó el diseño, para comenzar a darle forma a FEC, en la cuál se considera:

- Contar con un fondo, que no lastime la vista, y que permita jugar con los colores, y poder usarlo en todo el libro.
- Contar un una primera página del libro que muestre el nombre del programa, es decir una presentación.
- Una etiqueta que indique en capítulo está situado el usuario (en todas y cada una de las páginas).
- Un título (marquesina) que indica el tema de ésa página.
- Botones que enlacen a otras páginas en un mismo sitio, y otros que en una misma página muestren los subtemas que se están abordando en la página, la función de éstos últimos es mostrar u ocultar objetos o campos de texto.
- Todos los vínculos o enlaces cambian la forma del cursor para indicar que el usuario debe presionar.
- Etiquetas en los botones que indican la función que realiza éste al ser presionado.
- Todas las palabras clave cuenten con un mismo formato para que sean identificadas por el usuario.
- Con una página inicial que indica cómo se utiliza el programa.

Una vez considerado estos puntos, se junto toda la información obtenida en la fase anterior, se hizo uso de las imágenes, diagramas, videos y animaciones para así tener un texto final, que explicara los fundamentos de la Electroforesis Capilar.

Antes de darle forma a cada pantalla, se consideraban los espacios que siempre iban a estar ocupados, como la parte inferior derecha para los botones de navegación, y el



borde superior para indicar título y capítulo. Se llevó a cabo una selección del material de apoyo con el fin de obtener imágenes y animaciones que realmente explicaran la información escrita.

### 3. DESARROLLO.

Se refiere al desarrollo progresivo del sistema a partir del diseño elaborado. Dicha etapa está punteada con muchas evaluaciones formativas, según el desarrollo de las partes del diseño pedagógico.

El desarrollo de FEC se hizo de una manera directa ya que una vez teniendo el Diagrama de Flujo podía organizarse mejor la información en cada página, cuando la información era extensa se planeaba en más páginas para evitar sobresaturación de información, planeando una mayor cantidad de vínculos que permitieran más enlaces y con ello una mejor comprensión de la información.

Para la realización de FEC, ésta etapa se dividió en los siguientes pasos:

- Investigación y recopilación de información acerca de Electroforesis Capilar.
- Organización y sistematización de dicha información.
- Realización de un diagrama de Flujo de datos.
- Captura de la información que forma parte de FEC.
- Realización de los enlaces entre pantallas, textos, formatos y diagramas.
- Realización de palabras clave, en aquellos términos que requerían de una definición específica y concreta.
- Se combinó la pantalla solo con bordes, prefiriendo el fondo blanco ya que se pueden combinar mejor las imágenes, texto, videos, botones y sobre todo animaciones realizadas en *ToolBook II versión 5.01*.

- Se anexaron imágenes (fotografías), a las que se les enlazó a textos, palabras claves o botones.
- Se animaron algunos dibujos para explicar algunos fenómenos que ocurren en la Electroforesis Capilar.
- Se anexaron algunos archivos de sonido a las animaciones.

#### 4. DEPURACIÓN Y CORRECCIÓN.

Esta etapa conlleva al tratamiento y análisis de los resultados, se estipulan además correcciones y ajustes necesarios. La información plasmada en FEC, fue seleccionada con ayuda de expertos en el área de Electroforesis Capilar, y se consideran temas que no son de alto grado de complejidad para las personas a las que está destinado dicho sistema.

Por lo que se realizó una depuración de la información, así como de los posibles errores que tuviera el sistema FEC así que por un lado se hace una depuración analítica y una depuración computacional

- ☞ *Depuración Analítica.* Se hace la revisión y se detectan textos confusos, palabras clave no realizadas o falta de imágenes que apoyaran o complementarían la información.
- ☞ *Depuración Computacional.* Se refiere a que la navegación sea eficiente dentro de FEC, y del correcto enlace entre objetos. Con esto se comprobó, por una parte, que los botones de navegación se comportarán de acuerdo al mapa de navegación realizado; y por otra parte que todos los botones, *hotwords*, hipervínculos, imágenes, hicieran lo que tenían que hacer, además de que los videos y archivos de sonido corrieran adecuadamente.

En esta sección se realizaron los ajustes y correcciones identificadas.

## 5. EMPAQUETAMIENTO

El sistema FEC, es una herramienta de transmisión de información, por lo que es necesario darle un formato para que pueda ejecutarse en varias computadoras sin que éstas tengan que contar con el software empleado para desarrollarlo. El *authoring ToolBook*, utilizado, permite que las aplicaciones realizadas puedan ser guardadas como archivos ejecutables (.EXE). Sin embargo para que la aplicación pueda ejecutarse adecuadamente, requiere de archivos que la soporten, lo que se conoce como *Archivos de Runtime*, éstos archivos ocupan acerca de 1.6 *megabytes*, se instalan en el mismo directorio en el que se instale la aplicación permitiendo que se ejecute el sistema multimedia sin la necesidad de contar con todo el *authoring* empleado.

Por lo que todos los archivos de FEC serán guardados como (.EXE), de éste modo es posible ejecutarlos en computadoras que no cuenten con todo el *software* de *Asymetrix Multimedia ToolBook*. Además de que por ser ejecutable puede asignarse un icono en el administrador de programas de *Windows*.

Finalmente el sistema una vez empaquetado se entregará a las instancias correspondientes.

**RESULTADOS**

## 8. RESULTADOS

### 8.1 SISTEMA MULTIMEDIA FEC.

FEC, está formado por 5 libros, con un total de 100 pantallas, más de 200 imágenes, 30 animaciones, 8 videos, 11 archivos de sonido, 20 tablas y cerca de 30 gráficos, todas las pantallas usan el mismo fondo o *background*, pero cada libro se puede diferenciar por el color de los títulos, y por el color de los botones de acceso a la información.

El Sistema Multimedia FEC Está constituido por los siguientes capítulos:

#### Libro 1) Generalidades.

En éste primer libro se abordan temas desde, que es electroforesis y su contexto histórico hasta llegar a la electroforesis capilar y en qué consiste, fundamento de la separación electroforética, partes mínimas que componen un sistema de separación, los factores que afectan la velocidad de migración, así como las ventajas y desventajas de dicha técnica analítica.

#### Libro 2) Principios de la Separación Electroforética.

En éste libro se explica de la manera más sencilla, los términos más usados en la electroforesis capilar, así como: que es la movilidad electroforética, el flujo electroosmótico, el tiempo de migración, los factores que afectan la eficiencia (explicando lo que es el calor de joule y los gradientes de temperatura, las interacciones pared-analito), el control de la resolución y todos los fenómenos involucrados en el proceso de separación electroforética.

#### Libro 3) Modos de Electroforesis Capilar.

Se describen los distintos modos de electroforesis capilar que existen, es decir se explican las condiciones que en las que se trabaja para que la electroforesis capilar tenga distintas formas: Electroforesis Capilar de Zona, Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar, Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico, Isotacoforesis Capilar, Electroforesis Capilar en Geles y Electro cromatografía.

**Libro 4) Instrumentación.**

En éste libro se describen las partes que componen a un instrumento para realizar separaciones por Electroforesis Capilar, describiendo desde la introducción de la muestra (tipos de inyección), equipo básico que conforma un instrumento como: capilares, fuente de alto voltaje, sistema de enfriamiento, sistemas de detección (Absorbancia UV-Visible, Fluorescencia, Espectrometría de Masas, Amperometría y conductividad), entre otros.

**Libro 5) Campos de Aplicación.**

En éste último libro se describe la aplicabilidad de la Electroforesis Capilar en diversas áreas como son, la industria alimentaria, industria farmacéutica, medio ambiente (análisis de iones) e investigaciones en el área de bioquímica (genética, análisis de proteínas, otros), se muestra a grandes rasgos con ejemplos la utilización de la Electroforesis en las áreas mencionadas.

Los capítulos anteriores están básicamente enfocados al manejo del ratón, por lo que sólo hay que presionar para navegar y empezar a explorar la información. Donde cada página tiene un botón de ayuda que solucionará cualquier cuestión en el uso del sistema FEC.

**8.2 DESCRIPCIÓN DE FEC.**

El sistema multimedia FEC se encuentra distribuido de la siguiente forma:

TABLA 15. LIBROS QUE CONSTITUYEN AL SISTEMA FEC.

LIBRO	CAPÍTULO	NÚMERO DE PANTALLAS
1	Presentación	1
1	Bienvenida	1
1	Introducción	1
1	Generalidades	27
2	Principios	15
3	Modos de separación	20
4	Instrumentación	25
5	Aplicaciones	10

### 8.3 EN EL SISTEMA MULTIMEDIA FEC SE CUENTA CON:

#### a) Pantallas.

Que sirven como páginas de un libro con la diferencia que en éstas pueden aparecer textos, imágenes o diagramas que no estaban.

#### b) Textos.

Estos contienen información escrita, que tratan de ser en su mayoría muy compactos pero explícitos contando con palabras clave (hotwords) que van a servir para dar más claridad a la información o bien para ahondar más en el tema.

#### c) Imágenes.

Que sirven como complemento a la información escrita, normalmente se encuentran en las distintas pantallas explicando algún fenómeno, o bien son mostradas cuando se presiona un botón en forma de cámara fotográfica.

#### d) Palabras clave.

Definen términos usados en FEC, normalmente se encuentran subrayadas, son de color azul, y al entrar en ellas cambia el cursor a una manita indicando que se debe presionar para obtener mayor información.

#### e) Objetos gráficos.

Diagramas de flujo; se encuentran principalmente en el menú principal, ya que de ésta forma se observa el contenido de cada capítulo y se puede navegar directamente a partir del mismo.

#### f) Botones.

Tienen diversas funciones dependiendo del icono con que se presenten:



y



Permiten viajar de manera ordenada dentro del sistema, una vez que se ha explorado toda la información de un tema específico, atrás y avance respectivamente.



Proporciona ayuda al usuario sobre el manejo del sistema FEC.



Se encuentra en todas las páginas y muestra el menú principal para poder acceder a cualquier otro capítulo del sistema FEC.



Se encuentra en las páginas que explican algún subtema, y su función es regresar al tema de partida.



Muestra animaciones con mayor duración, que explican fenómenos importantes, dentro del sistema FEC.



Muestra animaciones pequeñas con bajo grado de complicación.



Se muestran principalmente en el primer capítulo donde se aborda el tema histórico de la electroforesis, el cuál muestra un archivo de voz que describe en forma de narración.



Al presionar en éste botón, muestran una imagen.



Muestra un video.



Muestra un acercamiento de una imagen.



Muestra gráficos.



Muestra pequeños textos.




Todos los botones del sistema FEC están vinculados a un icono y al presionar sobre ellos muestran mayor información, diagramas, dibujos, tablas, gráficos o bien dan inicio a una animación o un video.

g) Animaciones.

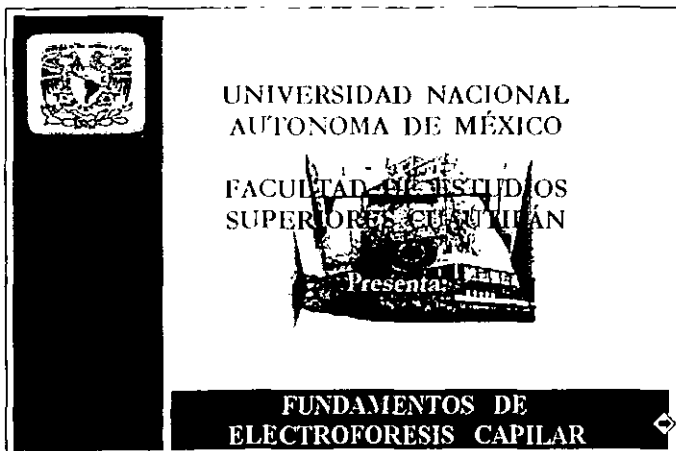
Sirven para explicar de una manera sencilla algún fenómeno que requiera de más detalles para su comprensión.

Todos los botones al entrar el cursor sobre ellos cambian el cursor a una manita.

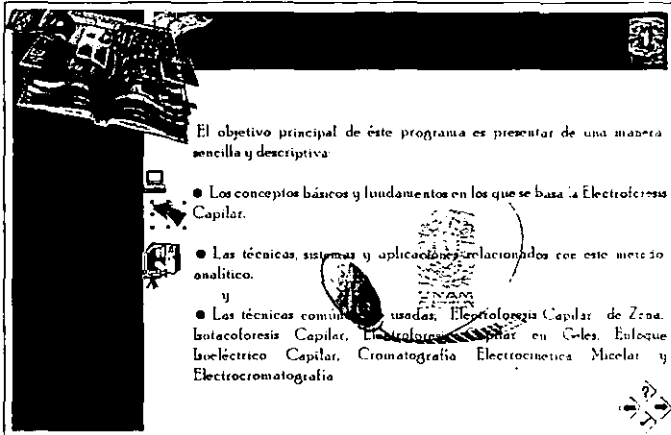
h) Archivos de sonido. El sistema cuenta con 15 archivos de sonido con extensión .wav asociados al icono  que indica que al presionar despliega un archivo de sonido que narra aspectos importantes en el tema.

#### 8.4 DESCRIPCIÓN DE LAS PANTALLAS QUE CONFORMAN A FEC

Al entrar al sistema FEC aparece una pantalla de presentación, en la cuál se muestra el escudo de la UNAM y el nombre de la institución en donde fue desarrollado (F.E.S. Cuautitlán), así como el nombre del sistema "FUNDAMENTOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR"



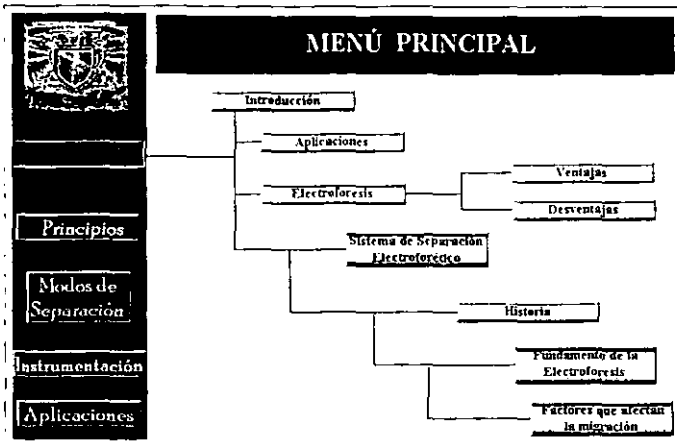
Además, parece una pantalla en donde se da la bienvenida al programa y se explica de forma general el contenido de éste.



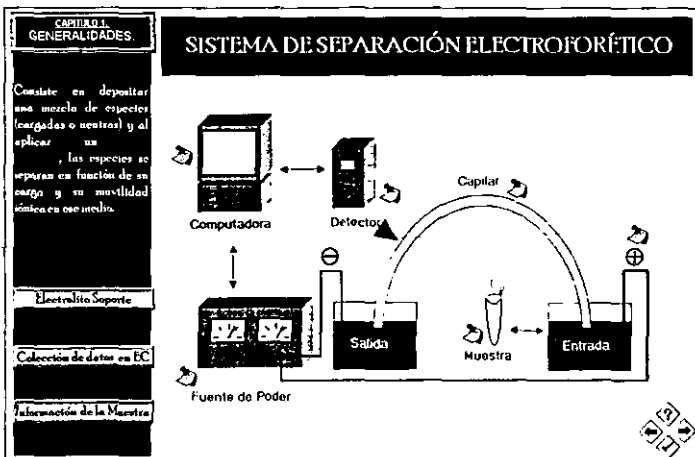
Además de éstos capítulos se cuenta con una ayuda, la cuál puede ser desplegada en cualquier parte del libro sin necesidad de salir de él, ya que forma parte del mismo libro y está elaborado con un botón que tiene un icono de interrogación, para cualquier duda del usuario, y muestra una página que indica el uso del programa que son las *hotwords*, que hace cada botón.

La relación entre éstos capítulos se muestra en el mapa de navegación, que no es lo mismo que el diagrama de flujo de datos, ya que éste último se utilizó como guía en la elaboración del sistema, y el otro para sirve para saber el orden en el cuál se puede explorar el sistema.

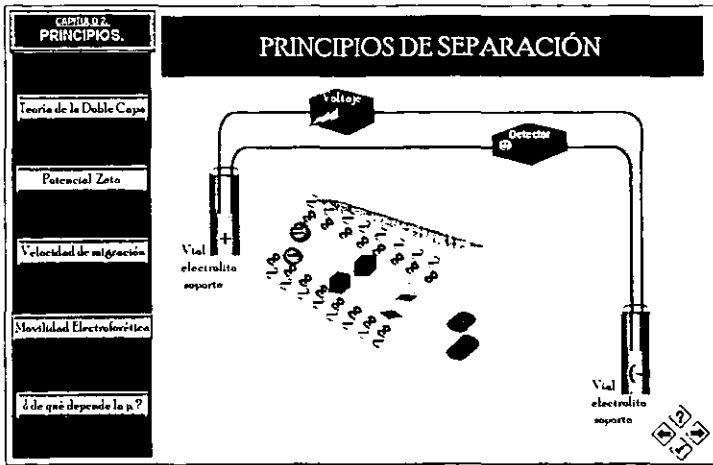
Una vez dentro de un capítulo o libro, se puede tener acceso a la información directamente desde el Menú Principal, que muestra en forma de diagrama los temas y subtemas de cada capítulo; por ejemplo si esta en generalidades y quiero saber los modos de electroforesis capilar, voy a la página menú principal y se presiona modos de separación y se elige el modo que quiero ver a fondo.



Cada página cuenta con el número de capítulo y nombre de éste, además del tema que se está tratando en ese momento en el borde izquierdo superior, los botones de navegación se encuentran en la parte inferior derecha, (mencionados anteriormente).



Normalmente en la primer página de cada tema, se encuentran una serie de botones indicando los subtemas en la parte izquierda, que al presionarlos muestran mayor información, o bien navega a otra página que muestra el subtema indicado, se recomienda al usuario que antes de presionar  $\Rightarrow$  (avance) termine de explorar todo el tema de interés, el programa guiará al usuario de manera sencilla y practica.



Es importante dar a conocer, que además del sistema informático computacional FEC, se cuenta con un escrito en papel, el cuál describe detalladamente (extenso) los mismos temas del sistema.

## 8.5 GUÍA DE INSTALACIÓN.

Para instalar el sistema multimedia FEC se requiere:

- ✓ Ambiente Windows 95 o superior
- ✓ Espacio disponible en disco duro mínimo de 200 Megabytes.
- ✓ Memoria RAM mínima de 32 Megabytes.

Para una ejecución óptima, ésta aplicación requiere ambiente Windows.

- ☐ Inserte el CD-ROM en la unidad lectora,

- ☐ Abrir el icono  'Explorador'

- ☐ Leer la unidad donde tenga el CD,

- ☐ Presione sobre el archivo Setup.exe.

El empaquetamiento del sistema se realizó con una utilería en inglés, la mayoría de los mensajes aparecen en ese idioma.

Una vez que se ha presionado sobre el archivo Setup.exe, se despliega el siguiente mensaje:

*Please wait*  
*Copying files temporary directory.*

Indica el inicio de la instalación.

Aparece la pantalla de instalación que muestra el nombre del usuario el nombre del programa y la forma en que se desea instalar.

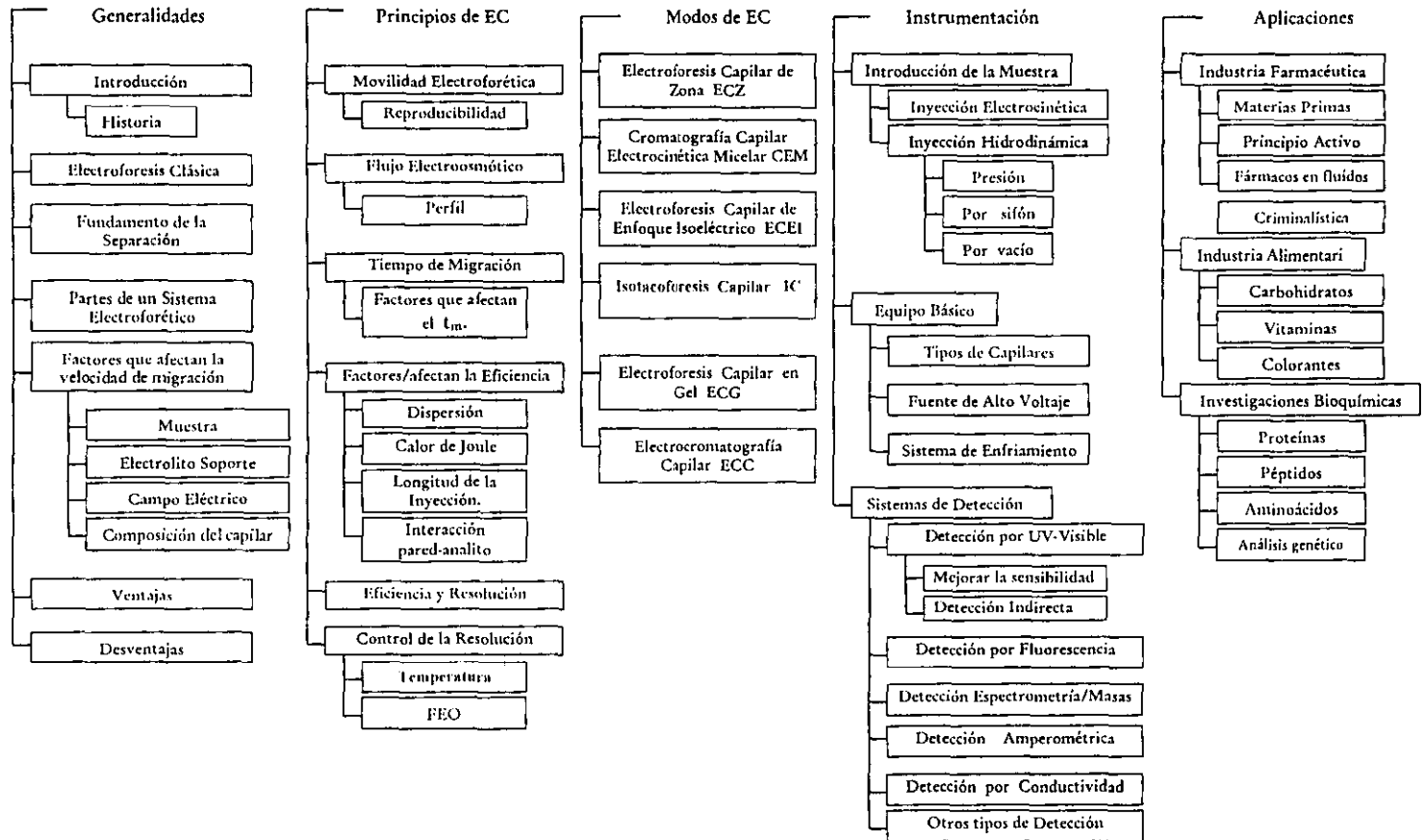
1. Esta versión computacional se desarrolló con *Asymetrix Multimedia Toolbook* versión 5.01, por lo que se requiere una serie de archivos llamados de *Runtime*, los cuáles actúan como soporte para la aplicación, estos archivos se deben copiar al subdirectorio de trabajo.
2. Presionar el botón de *Full-Install all files* (instalación completa). Esta opción copia en el subdirectorio C:\FEC todos los archivos del sistema (son los que tienen extensión .exe, y se pueden ejecutar por sí solos) e inmediatamente inicia la instalación.

Se muestra una caja de información donde se indica el archivo que se está instalando. Y un mensaje de bienvenida. Automáticamente se crea la carpeta FEC. Para después ejecutar el sistema.

3. Abrir la carpeta Electroforesis, seleccionar el icono FEC y se desplegará la primer pantalla del sistema. Por medio de ésta se podrá navegar por todo el sistema, y desde la página Menú Principal se puede acceso a todos los libros que constituyen al sistema multimedia.

En las siguientes páginas se muestran algunas de las pantallas que constituyen al Sistema Multimedia FEC.

# DIAGRAMA DE FLUJO DE DATOS SOBRE ELECTROFORESIS CAPILAR



PANTALLAS


REPRESENTATIVAS

DE FEC



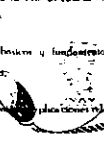

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUATSIMILAN

Objetivo principal de este curso es proporcionar a los estudiantes un conocimiento de los conceptos básicos y fundamentos en los que se basa la Electroquímica Cuántica.



Las técnicas, métodos y procedimientos relacionados con este método analítico.







Las técnicas de caracterización utilizadas en la actualidad en los países avanzados son la Cromatografía de Liquidos de Alta Resolución y la Electroquímica Cuántica, teniendo gran importancia en el análisis y purificación de diversos materiales.

Las técnicas, métodos y procedimientos relacionados con este método analítico.

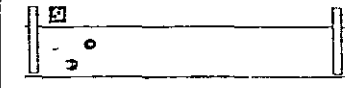



- Industria Farmacéutica: Control de la pureza de medicamentos y materias primas.
- Industria Alimentaria: Análisis de alimentos, control de calidad de los productos alimenticios de origen de los animales, control de la calidad de los productos alimenticios.
- Investigaciones Químicas: Análisis de materiales biológicos, sintéticos, polímeros, compuestos y sus derivados.
- Control de Calidad: Análisis de los productos de origen animal y vegetal.


Es un método analítico en el cual los iones orgánicos forman un precipitado.

Desde la naturaleza de los iones y la naturaleza de los compuestos orgánicos.



Se elige un electrolito que sea poco soluble en el medio acuoso.

La migración de los iones depende de la naturaleza y carga.






Detalle de un sistema generador de energía eléctrica en un sistema de potencia. Este sistema se puede utilizar para la generación de energía eléctrica en un sistema de potencia.

El uso de la energía eléctrica en un sistema de potencia se puede utilizar para la generación de energía eléctrica en un sistema de potencia.

Por lo tanto se pueden utilizar estos sistemas de potencia en un sistema de potencia.

También se puede utilizar este sistema de potencia en un sistema de potencia.

- Alta potencia.
- Resistencia a los cortocircuitos.
- Resistencia a los sobrecalentamientos.
- Múltiples y diversas aplicaciones.
- Por lo tanto se pueden utilizar estos sistemas de potencia en un sistema de potencia.

El desarrollo de un sistema de potencia en un sistema de potencia se puede utilizar para la generación de energía eléctrica en un sistema de potencia.

Desde la naturaleza de los iones y la naturaleza de los compuestos orgánicos.

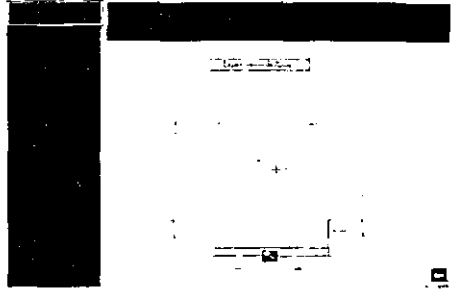
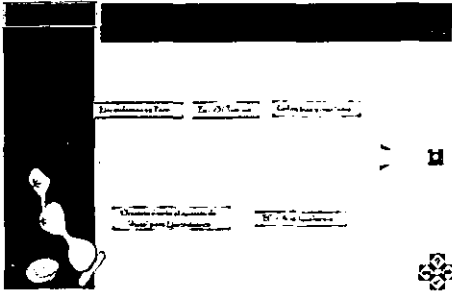
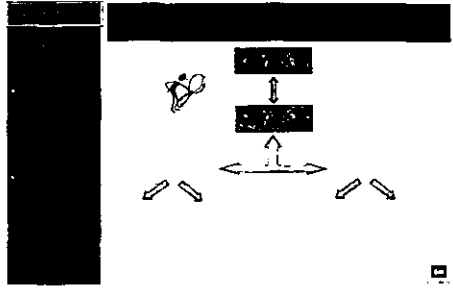
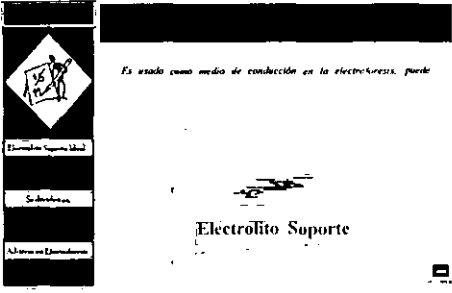
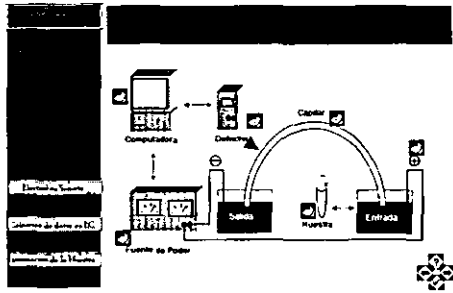
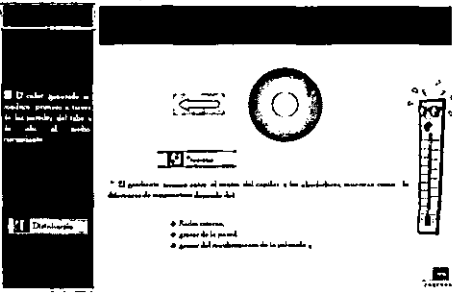
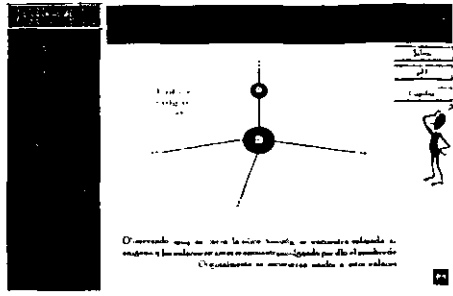
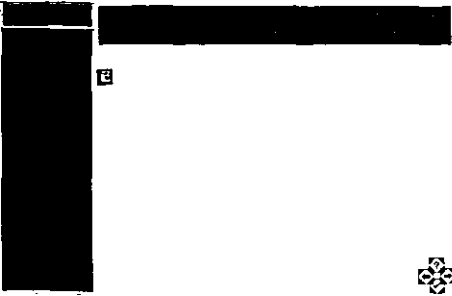
Se elige un electrolito que sea poco soluble en el medio acuoso.

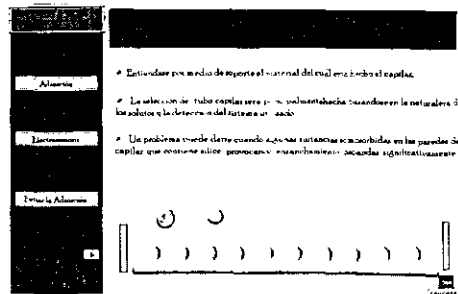
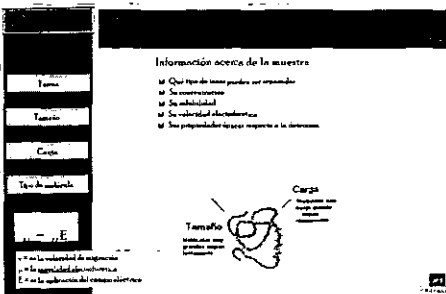
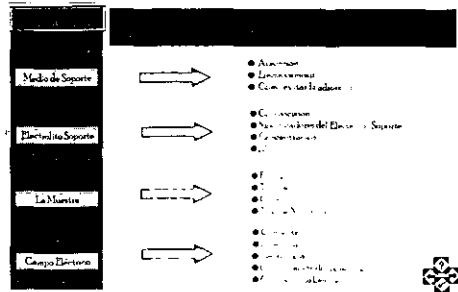
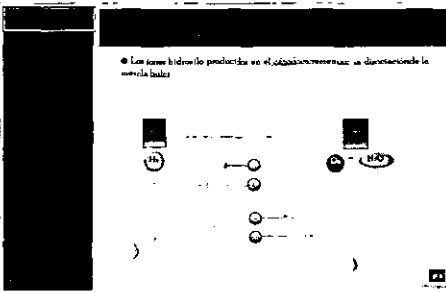
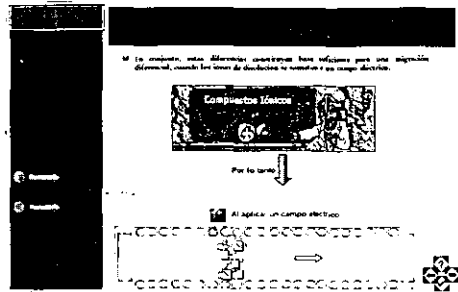
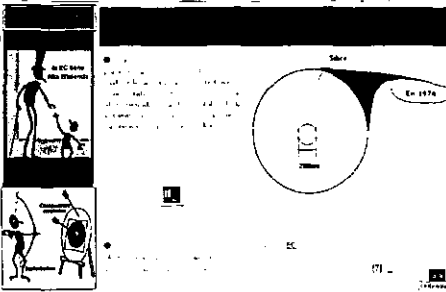
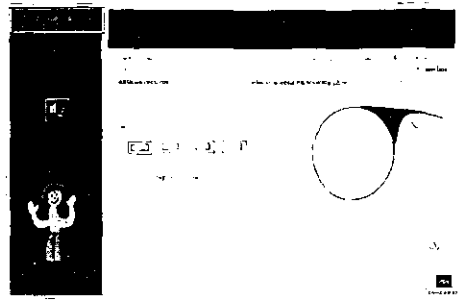
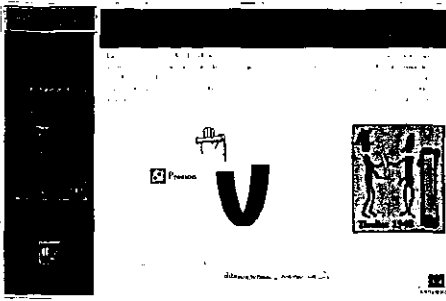
La migración de los iones depende de la naturaleza y carga.

El uso de la energía eléctrica en un sistema de potencia se puede utilizar para la generación de energía eléctrica en un sistema de potencia.

Por lo tanto se pueden utilizar estos sistemas de potencia en un sistema de potencia.







Por la estructura de la red de conductores y dependiendo del pH del electrolito aparece un fenómeno de carga (C) en la pared del capilar.

**Diagrama:** Se muestra un tubo capilar con una red de conductores en su interior. Se indica la presencia de un potencial eléctrico (E) y la estructura de la red de conductores.

Por lo que se forma un potencial (E) y el potencial voltagal en origen es luego de distribuido debido al desplazamiento de los iones, también llamado que los iones...

**Ley de Ohm**

La corriente que circula en el conductor es directamente proporcional a la diferencia de potencial aplicada en los electrodos e inversamente proporcional a la resistencia eléctrica del conductor.

$$I = \frac{E}{R}$$

**Diagrama:** Se muestran dos gráficos. El primero muestra la relación entre el potencial (E) y la corriente (I) en un conductor, resultando en una línea recta. El segundo muestra la relación entre el potencial (E) y la corriente (I) en un conductor con un potencial aplicado en los electrodos, resultando en una curva que decrece.

Como se diferencia entre las membranas completamente impermeables que solo permiten el paso de iones por los poros y las membranas que permiten el paso de iones y moléculas de agua.

El potencial de membrana depende de la capacidad del tubo y su grado de...

**Diagrama:** Se muestra un tubo con una membrana y un potencial de membrana (E) que depende de la capacidad del tubo y su grado de...

**Diagrama:** Se muestra un tubo con una membrana y un potencial de membrana (E) que depende de la capacidad del tubo y su grado de...

La doble capa es la región que rodea a un electrodo cargada formada por las cargas opuestas del medio que son atraídas y controladas por la superficie de la doble capa (tanto externa como interna) que se forma en la superficie de los electrodos.

El potencial de membrana depende de la capacidad del tubo y su grado de...

**Diagrama:** Se muestra un tubo con una membrana y un potencial de membrana (E) que depende de la capacidad del tubo y su grado de...

Los potenciales que rodean a la superficie del tubo son atraídos por el electrodo negativo atrayendo con ellos al disolvente, tal efecto voltagal en origen un flujo de disolvente debido al desplazamiento de los iones...

**Diagrama:** Se muestra un tubo con una membrana y un potencial de membrana (E) que depende de la capacidad del tubo y su grado de...

**Inversión del FEO usando un surfactante catiónico**

El potencial de membrana depende de la capacidad del tubo y su grado de...

**Diagrama:** Se muestra un tubo con una membrana y un potencial de membrana (E) que depende de la capacidad del tubo y su grado de...

**CONDICIONES DE VECTORES DE MOVILIDAD CON UN POTENCIAL**

La inversión de la muestra se realiza en el tubo capilar (análisis) y el electrodo se conectan del lado positivo, se dice en el tubo.

**Diagrama:** Se muestran los vectores de movilidad con un potencial (E) que depende de la capacidad del tubo y su grado de...

**COMBINACIONES DE VELOCIDADES Y DIRECCIONES**

Observar que el sentido y sentido han sido invertidos a las posiciones originales por lo que se tiene polaridad inversa, y que el FEO está en la misma dirección.

$\rightarrow$  FEO  $\rightarrow$   
 $\rightarrow$  FEO  $\rightarrow$   
 $\rightarrow$  FEO  $\rightarrow$   
 $\rightarrow$  FEO  $\rightarrow$   
 $\rightarrow$  FEO  $\rightarrow$

**Dispersión**

La movilidad aparente del espaldar puede calcularse con el tiempo respecto a esas partículas representadas.

La movilidad aparente del espaldar puede calcularse con el tiempo respecto a esas partículas representadas.

$H_0 = \frac{1}{R} \frac{H_0}{H}$

**Amplificación**

**Para Amplificar**

**Amplificación**

Las distancias de dispersión, del centro de masa de un grupo de partículas, pueden ser más exactas.

- 1) Cálculo de la movilidad aparente.
- 2) Cálculo de la movilidad aparente.
- 3) Distancia de dispersión aparente del centro de masa de un grupo de partículas.

Material de uso.

**Intensidad del Capilar C. Solo**

**CALOR DE VOLTE** Es el calor generado por el efecto Joule y depende de una polaridad de distribución de la corriente.

El efecto Joule es el calor generado por el efecto Joule y depende de una polaridad de distribución de la corriente.

El efecto Joule es el calor generado por el efecto Joule y depende de una polaridad de distribución de la corriente.

**Capilar**

El efecto Joule es el calor generado por el efecto Joule y depende de una polaridad de distribución de la corriente.

El efecto Joule es el calor generado por el efecto Joule y depende de una polaridad de distribución de la corriente.

El efecto Joule es el calor generado por el efecto Joule y depende de una polaridad de distribución de la corriente.

$I = \frac{L^2}{\mu V}$

Donde L es la longitud del capilar y V es el voltaje aplicado.

**DISPERSION**

Esta dispersión de la zona del analito y resulta de las diferencias entre velocidades de la zona y del analito.

La dispersión de la zona del analito y resulta de las diferencias entre velocidades de la zona y del analito.

La dispersión de la zona del analito y resulta de las diferencias entre velocidades de la zona y del analito.

$N = \left(\frac{L}{\sigma}\right)^2$

Después de haber calculado el número de platos, se puede calcular la dispersión de la zona del analito y resulta de las diferencias entre velocidades de la zona y del analito.

$H = \frac{L}{N}$

**Dispersión**

**DIFUSIÓN:** Es el primer orden de dispersión y depende de la polaridad de distribución de la corriente.

El primer orden de dispersión y depende de la polaridad de distribución de la corriente.

El primer orden de dispersión y depende de la polaridad de distribución de la corriente.

El primer orden de dispersión y depende de la polaridad de distribución de la corriente.

**Medida de la Intensidad del Capilar C. Solo**

Después de la inyección es importante que la longitud de la muestra sea menor que la longitud de la columna que se va a utilizar. La muestra debe ser lo suficientemente pequeña para el ancho de la columna que se va a utilizar.

Después de la inyección es importante que la longitud de la muestra sea menor que la longitud de la columna que se va a utilizar. La muestra debe ser lo suficientemente pequeña para el ancho de la columna que se va a utilizar.

Después de la inyección es importante que la longitud de la muestra sea menor que la longitud de la columna que se va a utilizar. La muestra debe ser lo suficientemente pequeña para el ancho de la columna que se va a utilizar.

El volumen de la muestra debe ser relativamente pequeño en relación al volumen del capilar. Por ejemplo un capilar de 1m que tiene un ancho interno de 0.25mm y un volumen de 0.25ml de muestra debe ser lo suficientemente pequeño para el ancho de la columna que se va a utilizar.

# DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

El Sistema Multimedia FEC se desarrolló tomando en cuenta la importancia de la Electroforesis Capilar en el área de la química analítica, ya que en los últimos años los resultados arrojados por dicha técnica parecen indicar su gran versatilidad en la resolución de problemas relacionados con la separación y determinación de especies cargadas y neutras; muestras con volúmenes muy reducidos que tienen interés en el campo de la Industria Farmacéutica, Industria Alimentaria, Medicina, Medio Ambiente, Bioquímica y Biotecnología. Dada su relevancia, es de gran importancia en la formación de los estudiantes de las carreras de: Químico Farmacéutico Biólogo, Ingenieros Químicos, Químicos, Químicos Industriales, y carreras afines; además por su gran aplicabilidad de interés para personas que desempeñen labores de investigación en el área de las ciencias químico-biológicas.

La Electroforesis Capilar es un tema muy extenso y complejo; cuando el estudiante ingrese al mar de información puede perderse, contribuyendo a esto que el 90% de ésta se encuentra en el idioma inglés, además él mismo, no podría saber que comenzar a leer para conocer dicha técnica. Por lo que es una buena oportunidad para dar a conocer técnica tan importante mediante un sistema multimedia, ya que plantea los temas de manera amena, fácil, interactiva y sobre todo rápida, ahorrándose la búsqueda de información para poder consultarla. El Sistema Multimedia FEC, fue diseñado para que sea comprendido por estudiantes con conocimientos básicos de física y química.

En el presente trabajo se da a conocer el diseño y desarrollo de un Sistema Multimedia que explica los Fundamentos de la Electroforesis Capilar como técnica analítica, el cual proporciona un medio adecuado para la transmisión de conocimientos acerca de dicha técnica de manera interactiva, combinando textos, imágenes, objetos gráficos (tablas, diagramas, esquemas), así como animaciones, video, y sonido mediante una computadora.

La información presentada en el Sistema Multimedia FEC, es la misma que se encuentra en éste trabajo aunque en forma condensada, pero la que se muestra en FEC, está enriquecida con imágenes y gráficos, además de animaciones, videos y sonidos, y por supuesto menos texto. FEC tiene una ventaja muy importante, pues la información

planteada son los fundamentos de la técnica, por lo que éstos no cambiarán con el paso del tiempo, así como los demás temas planteados, ya que FEC engloba mucha información que a la vez es primordial para entender los aspectos más importantes sobre la Electroforesis Capilar.

De acuerdo a la experiencia adquirida se consideró que los aspectos que hicieron efectivo el diseño de FEC fueron:

1. La recopilación de la información, la cuál fue seleccionada y organizada cuidadosamente, enfocada a aspectos básicos, con la finalidad de que el sistema tuviera un carácter preferentemente didáctico, pues se pretende que el material sea de consulta para la transmisión de información sobre Electroforesis Capilar.
2. La organización de la información llevó a la realización del diagrama de flujo de datos para poder realizar la interface del usuario, ya que permitió enlazar de manera adecuada los diferentes temas y subtemas.
3. El texto condensado definitivo, es la base del sistema, por lo que la depuración se basó en la detección de textos confusos, palabras clave no elaboradas, deficiencia de imágenes, y lo más importante determinar la veracidad y concordancia de la información.
4. El encontrar un equilibrio entre textos, diagramas, imágenes y formatos; ya que resultaría poco práctico y atractivo, para el usuario; por lo que se utilizaron diagramas e imágenes que dan mayor claridad a la información, permitiendo un menor uso de texto.
5. Tener un mismo formato establecido para las pantallas, es decir colocar en el mismo lugar durante todo el sistema los botones de navegación, títulos y subtítulos, para que el usuario se enfoque básicamente en la información y no tenga que estar buscando donde está el texto o donde está el botón de avance o retroceso.

FEC trata los aspectos electroforéticos de una manera diferente, fácil de entender, amena y sobretodo interactiva, amigable y fluida; ya que integra información de distintos medios como: libros, artículos e Internet, además permite que el usuario consulte la

información sin preocuparse por el idioma, al ritmo que desee, y con la profundidad que él requiera.

El manejo del sistema FEC es muy fácil, sólo requiere conocimientos básicos de computación para poder explorarlo, ya que la única tarea del usuario es presionar sobre los botones y ver que es lo que hace cada uno, además de que FEC despliega una ayuda en el momento que el usuario lo solicite.

El Sistema Multimedia FEC, no pretende sustituir al profesor en la enseñanza de la Electroforesis Capilar, por el contrario pretende apoyar considerándose como una herramienta alternativa para estimular a los alumnos a informarse, ayudando a que la transmisión de conocimiento sea dinámica, atractiva e interactiva.

El Sistema Multimedia FEC tiene las siguientes ventajas:

- ↯ La información que se presenta en FEC, se puede usar para la enseñanza ya que se puede mostrar con acetatos o diapositivas.
- ↯ Permite consultar la información tantas veces sea necesario, así como el tiempo, que se requiera.
- ↯ Por la forma en que se presenta la información es fácil de digerir.
- ↯ La información es útil para aquella persona que tiene conocimientos en el tema, mucho más para el que no los tiene, ya que el usuario explora de acuerdo a sus necesidades.
- ↯ Estimula el gusto por instruirse, ya que éste tipo de herramientas tienen el objetivo de enganchar al usuario a seguir explorando.

Por lo anterior el Sistema Multimedia FEC, es una herramienta útil para la enseñanza de la Electroforesis capilar como técnica analítica de separación, sin embargo presenta el inconveniente de que para poder usarlo se necesita de una computadora con algunos requisitos básicos para poder tener un buen desempeño de FEC.



CONCLUSIONES

---

## CONCLUSIONES

- ☑ Los factores que dieron origen al diseño y desarrollo de FEC, fue la enorme cantidad de información sobre Electroforesis Capilar, además de que ésta se encuentra disgregada en diversas fuentes (en su mayoría en inglés); así como por ser un tema importante en la formación de los estudiantes de las carreras en ciencias químicas.
- ☑ El resultado de la información recabada se integró en un sistema computacional en un ambiente multimedia denominado FEC, el cuál aborda los aspectos electroforéticos en un proceso de separación, así como los principios básicos, los modos de la electroforesis capilar, la instrumentación y las aplicaciones en diversas áreas.
- ☑ En la elaboración de FEC fue importante tener la información organizada y de manera condensada, la cuál formó parte del sistema y por otro lado el diseño es la parte fundamental de dicha presentación, ya que es necesario tener un equilibrio entre texto, imágenes, esquemas, animaciones, video y sonido, considerando que el exceso de texto mostraría un sistema cansado y aburrido para el usuario. La integración de éstos medios sirvió como apoyo para el desarrollo de la interface ya que es la que da la característica de interactividad.
- ☑ FEC es sumamente fácil de manejar, permite tener acceso a la información de manera rápida, amena y sobre todo interactiva, es un producto informático, educativo y cuyo desarrollo se basa en la computadora.
- ☑ FEC, se diseñó para ser usado y entendido por estudiantes con conocimientos básicos de Física y Química; principalmente para estudiantes de las carreras de Químico Farmacéutico Biólogo, Ingenieros Químicos,

---

Químicos, Químicos Industriales, carreras afines, así como personas interesadas en el tema o que realicen investigación en el área de química analítica.

- FEC se presenta como una herramienta alternativa que pretende apoyar al profesor en la enseñanza de la Electroforesis Capilar como técnica de separación.
- El sistema FEC es una herramienta útil para la transmisión de información sobre electroforesis capilar, haciendo que el usuario involucre todos sus sentidos, además que la adquisición del conocimiento sea más amena; un aspecto importante de FEC es su interactividad que permite al usuario determinar el orden en que desee revisar la información y el ritmo de trabajo.
- Como creadora de FEC, puedo decir que el desarrollo de un sistema multimedia y el éxito del diseño depende de:
  - Plantear el objetivo que se desea alcanzar con el sistema multimedia
  - Verificar los recursos con los que se cuenta para el desarrollo del sistema.
  - Trazar una metodología y un cronograma de actividades. Un factor determinante es la creación de una tabla de contenido que sirve de apoyo para posteriormente realizar un diagrama de flujo de datos y poder establecer la interface al usuario; es importante que el desarrollador posea una visión global del sistema, la relación y la secuencia en la que serán presentados; para que sea más fácil la elaboración de éste.

**BIBLIOGRAFIA:**

- Altria Kevin D., 1993 "Quantitative aspects of the application of capillary electrophoresis to the analysis pharmaceuticals and drug related impurities" *Journal of Chromatography*, 646, Pp. 245-257.
- Altria Kevin D., 1998 "Analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis", Glaxo Wellcome. Vol.2 Alemania, Pp. 21-30.
- Altria Kevin D., Bestford Janine, 1996 " Main component assay of pharmaceuticals by capillary electrophoresis; considerations regarding, precision, accuracy, and linearity data" *Journal of Capillary Electrophoresis*, 003, 1, Pp. 13-23.
- Altria Kevin D.; Creasey E.; Howells J.S; 1998 "Routine capillary electrophoresis trace level determinations of pharmaceutical and detergent residues on pharmaceutical manufacturing equipment" *Journal of liquid chromatography*, 21, Pp. 10931105.
- Altria Kevin D., Elgey J., Lockwood P., Moore D., 1996 "An overview of the applications of capillary electrophoresis to the analysis of pharmaceutical raw materials and excipients" *Chromatographia*, 42, Pp. 332-342.
- Altria Kevin D., Hadgett T. 1995 "An evaluation of the use of capillary electrophoresis to monitor trace drug residues following the manufacture of pharmaceuticals" *Chromatographia*, 40, Pp 23-35.
- Altria Kevin D., McLean R., 1998 "Development and optimization of a generic micellar electrokinetic capillary chromatography method to support analysis of a wide range of pharmaceuticals and excipients" *Journal of Pharmaceutical and Biomedic Analysis*, 18, Pp. 807-813.
- Altria Kevin D., Smith, N. W., Turnbull C. H., 1998 "Analysis of acidic compounds using capillary electrochromatography" *Journal of Chromatography B*, 717, Pp. 341-353.
- Bahena T. P. 1999, "Fluidiza. Desarrollo de un sistema computacional multimedia para explicar el proceso de fluidización aplicado a la farmacia industrial". Tesis de Licenciatura. F.E.S. Cuautitlán. U.N.A.M. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.
- Bjersdottir Inga, Tjernelund Jette, 1998 "No aqueous capillary electrophoresis its applicability in the analysis of food, pharmaceuticals and biological fluids. Electrophoresis" *Electrophoresis*, 19, Pp. 2179-2186.
- Borrós S., Barberá G., Biada J., 1999 "The use of capillary electrophoresis to study the formation of carcinogenic aryl amines in azo dyes", *Elsevier Science*, 43. Pp.189-196.
- Brunner L.J., Dipiro J.T., Feldman S., 1994 "Metabolic cage isolation reduces antipyrine clearance in rats", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46 Pp. 581-594.
- Calavska J. Lienhard S., 1993 "Comparative use of three electrokinetic capillary methods for the determination of drugs in body fluids" *Journal of chromatography*, 638, Pp. 335-342.

Cherkaoui S., Veuthey J-L., 2000 "Development and robustness testing of a nonaqueous capillary electrophoresis method for the analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs" *Journal of Chromatography A*, 874, Pp. 121-132.

Claessens H. A., Billiet H. A., 1995 "Capillary Electro separation Methods" Delft University of Technology, Mayo, Pp. 113-140, 164-172.

David Hage A. C., Carrie Wolfe, 1998 " Determination of nitrate and Nitrite in Water by Capillary Electrophoresis" *Journal of Chemical Education*, 75, No.12, Pp. 1588-1590.

Dabas P.C., Vescina M.C., Carducci C.N., 1997 "Determination of suramin by micellar electrokinetic chromatography with direct serum" *Journal of Capillary Electrophoresis*, 4, Pp. 253-262.

Detle C. Ebel S., Terabe S., 1994 "Neutral and anionic cyclodextrins in capillary zone electrophoresis: Enantiomeric separation of ephedrine and related compounds" *Electrophoresis*, 15, Pp. 799-810.

Esquisable A., Hernandez R.M., Gascon A.R., Igartua M., Calvo B., Pedraz J.L., 1997 "Determination of salbutamol enantiomers by high-performance capillary electrophoresis and its application to dissolution assays" *Journal of Pharmaceutical and Biomedic Analysis.*, 16, Pp. 357-368.

Fabre H., Castaneda Penalvo G., Kelly M., Maillots H., 1997 "Evaluation of capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic capillary chromatography with direct injection of plasma for the determination of cefotaxime and its metabolite" *Analytical Chemistry*, 69, Pp. 1364-1373.

Fanali Salvatore, Cristalli Michelle, Nardi Annalisa, 1990 "Capillary zone electrophoresis in pharmaceutical analysis" *Società chimica italiana*, 45, No. 6, Pp. 693-702.

Ferret S. T. 2000 "Criterios Generales para la Elaboración de un Manual de Calidad para la Industria Farmacéutica en Ambiente Multimedia". Tesina de Especialización en Proceso Farmacéuticos. F.E.S. Zaragoza. U.N.A.M. México, D.F.

Flurer C.L., Wolnik K.A., 1994 "Chemical profiling of pharmaceuticals by capillary electrophoresis in the determination of drug origin" *Journal of Chromatography B*, 674, Pp. 153-163.

Forestier F., Salvanet-Bouccara A., Levêque D., Junes P., Rakotondrainy C., Dublanchet A., Jehl F., 1996 "Ocular penetration kinetics of fosfomycin administered as a one-hour infusion" *Journal of Ophthalmology*, 6, Pp. 137-144.

Foret Frantisek, Bocek T., Krivánková L., 1993 "Capillary Zone Electrophoresis" Ed. VCH, Alemania, Pp. 7-35, 135-186.

Geise R.J., Machnicki N.I., 1995 "A study of parabens as model hydrophobic compounds by capillary electrophoresis and their determination in cosmetic formulations" *Journal of Capillary Electrophoresis*, 2, Pp. 69-73.

Gerald L. Klein, Carl R. Jolliff, 1994 "Capillary electrophoresis for the routine clinical laboratory" *CRC Handbook of Capillary Electrophoresis: A Practical Approach*, Pp. 419-457.

- Heiger N. David, (1997) "High performance Capillary Electrophoresis". Hewlett Packard Company. 3a ed. Francia. Pp 13-29, 36-39, 42-75, 78-95.
- Heinig K., Vogt C., Werner G., 1997 "Determination of Triton X-100 influenza vaccine by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis" *Journal of Analytical Chemistry*, 357, Pp. 695-701.
- Herb Schwartz, Tom Pritchett, 1999 "Separation of proteins and peptides by capillary electrophoresis: application to analytical Biotechnology" Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA, Pp. 73-95.
- Hogan B.L., Lunte S.M., Stobaugh J.F., Lunte C.E., 1994 "On-Line coupling of in vivo microdialysis sampling with capillary electrophoresis" *Analytical Chemistry*, 66, Pp. 596-607.
- Jaworska M., Szulinska G., Wilk M., Tautt J., 1999 "Capillary electrophoretic separation of N-acetylcysteine and its impurities as a method for quality control of pharmaceuticals" *Journal of Chromatography A*, 853, Pp. 479-485.
- Hernández Saldaña Martha Berenice. 2001 "Manual de Operación para el Manejo del Cromatógrafo CLAR Waters y del software 2010 en Ambiente Multimedia". Tesis de Licenciatura. F.E.S. Cuautitlán, U.N.A.M. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.
- Jeff Chapman, John Hobbs, 1999 "Putting Capillary Electrophoresis to Work" *LC GC The Magazine of separation Science*, 17, U.S.A. , Pp. 86-99.
- Jiménez Díaz Juan Ricardo. 1998 "Manual de Buenas Prácticas de Manufactura en un Sistema Multimedia". Tesis de Licenciatura. F.E.S. Cuautitlán, U.N.A.M. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.
- Johansson M., Pavelka R., Henion J.D., 1991 "Determination of small drug molecules by capillary electrophoresis-atmospheric pressure ionization mass spectrometry" *Journal of Chromatography*, 559, Pp. 515-522.
- Klein GeraldL, Jolliff Carl R., 1994 "Capillary electrophoresis for the routine clinical laboratory" *Handbook of capillary electrophoresis*, Florida, Pp.419-457.
- Kunkel A., Günter S., Watzig H., 1997 "Determination of pharmaceuticals in plasma by capillary electrophoresis without sample pretreatment reproducibility, limit of quantitation and limit of detection" *Electrophoresis*, 18 Pp. 1882-1891.
- Landers. James P., 1993 "Handbook of Capillary Electrophoresis" CRC press. USA. Pp 26-28, 64-66.
- Laver H. Hank, Ooms Bert J., 1991 "Advances in capillary electrophoresis the challenges to liquid chromatography and conventional electrophoresis" *Analytica Chimica Acta*, 250, Pp. 45-60
- Lehmann Raiver, Voelter Wolfagng, Liebich M., 1997 "Capillary electrophoresis in clinical chemistry" *Journal of Chromatography B*, 697 Pp. 3-35.
- Levêque D., Gallion-Renault, Monteil, F. Jehl, 1997 "Capillary electrophoresis for pharmacokinetic studies" *Journal of Chromatography B*, 697 Pp. 67-75.

- Liu L., Osborne L.M., Nussbaum M.A., 1996 "Development and validation of a combined potency assay and enantiomeric purity method for a chiral pharmaceutical compound using capillary electrophoresis" *Journal Chromatography A*, 745, Pp. 45-58.
- Lucanglioli S.E., Rodriguez V.G., Otero G.C.F., Carducci C.N., 1997 "Development and validation of capillary electrophoresis methods for pharmaceutical dissolution assays" *Journal Capillary Electrophoresis*, 4 Pp. 27-36.
- Marina M. L. Torre M. 1994 "Capillary Electrophoresis" *Talanta*, 41, Pp. 1411-1433.
- Monnig A., Curtis T., Kennedy Robert, 1994 "Capillary electrophoresis" *Analytical Chemistry*. 66, Pp. 280R-314-R.
- Narvéz A. M. 2000 "Elaboración de un sistema computacional multimedia sobre disolución de polvos y tabletas". Tesis de Licenciatura. F.E.S. Cuautitlán. U.N.A.M. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.
- Pajchel G., Tyski S., 1999 "Adaptation of capillary electrophoresis to piperacillin drug analysis" *Journal of Chromatography A*, 846 Pp. 215-223.
- Paul R. Hoddad, Dr Mirek Macka, 2000 "Ion analysis by capillary electrophoresis and capillary electrochromatography" University of Tasmania, Australia, Pp. 1-23.
- Penalvo Castaneda, Kelly M., H. Maillols, 1997 "Evaluation of capillary zone electrophoresis and micelar electrokinetic capillary chromatography with direct injection of plasma for the determination of cefotaxime and its metabolite" *Analytical Chemistry*. 69, Pp. 1364-1369.
- Piera E., Erra P., Infantge M.R., 1997 "Analysis of cationic surfactants by capillary electrophoresis" *Journal Chromatography A*, 757 Pp. 275-280.
- Pokorna L., Revilla A.L., Havel J., Patočka J., (1999) "Capillary zone electrophoresis determination of galanthamine in biological fluids and pharmaceutical preparatives: experimental design and artificial neural networks optimization" *Electrophoresis*, 20, Pp. 1993-2010.
- Pospíšilová M., Polášek M., Procházka J., 1997 "Separation and determination of pharmaceutically important polyols in dosage forms by capillary isotachopheresis" *Journal of Chromatography A*, 772, Pp. 277-283.
- "The Analysis of Explosive Constituents by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography" 1999, Prince CE application, P.O. Box 2194 7801 CD, e-mail princetechnologies@compuserve.com.
- " Inorganic Cation Analysis by Capillary Electrophoresis with indirect UV detection " 2000 Prince Technologies, P.O. Box 2194 7801 CD, e-mail princetechnologies@compuserve.com.
- Quang C., Khaledi M.G., 1994 "Chiral separation of acidic compounds by dextrin-mediated by capillary zone electrophoresis" *HRC-Journal of High Resolution Chromatography*, 17 Pp. 609-615.
- Rafael M. M. 1997 "Proyecto de Mezclado, Sistema Multimedia para apoyar la enseñanza de la Tecnología Farmacéutica". Tesis de Licenciatura. F.E.S. Cuautitlán. U.N.A.M. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.

- Revilla A.L., Havel J., Borovcová J., Vrchlabský M., 1997 "Capillary zone electrophoresis of hydroxynaphthalene carboxylic acids. Purity monitoring of  $\beta$ -hydroxy naphthoic acid in dye industry, *Journal of Chromatography A*, 772 Pp. 397-405.
- Revilla V., Havel J., Jandik P., 1996 "Peak splitting observed during capillary zone electrophoresis of  $\alpha$ - and  $\beta$ - naphthols in borate buffer" *Journal of Chromatography A*, 745 Pp. 225-232.
- Revilla V., Vrchlabský M., 1999 "  $\beta$ -hydroxy naphthoic acid synthesis monitoring by CZE and HPLC. Determination of Polynaphthyl Derivatives" *Journal of Chromatography A*, 836, Pp. 67-76.
- Revilla V., Vargas M., 2001 " El uso de la Electroforesis Capilar en la Industria Farmacéutica" parte II, *Revista Mexicana de la Asociación Farmacéutica*, Octubre-Diciembre, (en prensa).
- Rivera Vega, Maria P. 1996 "Electroforesis Capilar, una nueva herramienta para la química analítica" *Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México*. Pp.1-13.
- Ross A. Gordon, 1997 "Instrumental validation in capillary electrophoresis and checkpoints for method validation" *Analytical Chemistry*, 69, Pp. 275-284.
- Rubinson J.F., Rubinson K.A., 2000 "Química Analítica Contemporánea, Capítulo 14: Separaciones con voltaje aplicado: electroseparaciones" Pearson Education, México.
- Sadeghipour V., Varesio E., Giroud C., Rivier L. Veuthey J.L., 1997 "Analysis of amphetamines by capillary electrophoresis and liquid chromatography: application to drug seizures and cross-validation" *Forensic Science International*, 86, Pp. 1-8.
- Sam F. y Li, 1993 "Capillary Electrophoresis" Elsevier Science, The Netherlands. Amsterdam, USA, Pp. 1-7, 232-236.
- Sánchez M., Juan, 2001 "Técnicas de Separación Electroforesis capilar" *Apuntes de Química (2º ciclo Abril)*, UdG, Pp34.
- Songer-van de Griend C., Groningsson K., Westerlund D., 1996 "Chiral separation of local anaesthetics with capillary electrophoresis. evaluation of the inclusion complex of the enantiomers with heptakis (2,6-di-O-methyl)-beta-cyclodextrin" *Chromatographia*, 42 Pp. 263-274.
- Schmutz André, Thormann Wolfagn, 1994 "Assessment of impact of physico-chemical properties on monitoring drug levels by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct serum injection" *Electrophoresis*, 15, Pp. 1295-1303.
- Shihabi Z. K., 1998 "Therapeutic drug monitoring by capillary electrophoresis" *Journal of Chromatography A*, 807, Pp. 27-36.
- Skoog Douglas, James J. L., 1994 "Análisis Instrumental" 4a ed. Mc Graw Hill. España Pp. 785-787.
- Skoog D. A., Holler F.J., Nieman T.A., 2001 " Principios de Análisis Instrumental " *Capítulo 30: Electroforesis Capilar y Electrocromatografía*, Mc Graw Hill. 5ª ed., Madrid, España.
- Smith I. Feinberg J, 1979 "Cromatografía sobre papel y capa fina. Electroforesis " Ed. Alambra, España, Pp. 129-143.



- Smith Norman. 1999 "Capillary ElectroChromatography" Beckman Coulter Inc. , Fullerton California, USA. , Pp. 3-13.
- Soini H., Tsuda T., Novotny M.V., 1991 "Electrochromatographic solid-phase extraction for determination of cimetidine in serum by micellar electrokinetic capillary chromatography" *Journal of Chromatography*, 559, Pp. 547-556.
- Thomas B.R., Fang X.G., Chen X., Tyrell R.J., Godbahne S., 1994 " Validated micellar electrokinetic capillary chromatography method for quality control in the drug substances hydrochlorothiazide and chlorothiazide" *Journal of Chromatography*, 657, Pp. 383-397.
- Thormann Wolfgang, Lienhard Sabine, 1993 "Strategies for the monitoring of drugs in body fluids by micellar electrokinetic capillary chromatography" *Journal of Chromatography*, 636, Pp. 137-148.
- Thormann W., Minger A., Molteni S., Caslavská J., Gebauer P., 1992 "Determination of substituted purines by body fluids by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection" *Journal of Chromatography*, 593, Pp. 275-288.
- Vargas G., Havel J., Frgalová K., 1998 "Contribution to the analysis of thyreostatic drugs, *Journal of Capillary Electrophoresis*, 5:1/2, Pp.9 -21.
- Vargas G., Havel J., Hadasová E., 1997 "Direct determination of procainamide and N-acetylprocainamide by capillary zone electrophoresis in pharmaceutical formulations and urine" *Journal of Chromatography A*, 772 Pp. 271-285.
- Vargas G., Havel J., Patočka J., 1998 "Capillary zone electrophoretic determination of some drugs against Alzheimer's disease" *Journal of Chromatography A*, 802, Pp. 121-136.
- Vargas G., Revilla A.L., Havel J., Holý A., 1998 " Capillary electrophoresis of the new anti-AIDS agents 9-(2-phosphonylmethoxyethyl) adenine and 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)-2,6-diaminopurine in mixtures with some monoribonucleotides or the most common deoxynucleotides" *Electrophoresis*, 19, Pp. 2926-2934.
- Vargas M., Revilla V., 2001 " El uso de la Electroforesis Capilar en la Industria Farmacéutica" parte I, *Revista Mexicana de la Asociación Farmacéutica*, Julio-Septiembre, (en prensa).
- Wang Z., Huang A.J., Sun Y.L., Sun Z.P., 1996 " Cyclodextrins as buffer additives for the enantiomeric separation of pinacidil in capillary zone electrophoresis" *Journal Chromatography A*, 749, Pp. 300-311.
- Wainright Ann, 1990 " Capillary electrophoresis applied to the analysis of pharmaceutical compounds" *Journal of Microcolumn Separations*, 2, Pp. 166-175.
- Winefordner J. D., Khaledi M., 1998 "Chemical Analysis. High-Performance capillary Electrophoresis" Wiley-Interscience, USA.,vol.1, Pp. 99-107.
- Zhang Chau-Xuan, Thormann Wolfgang, 1994 "Determination of drug levels in human serum by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection using different quantitation strategies" *Journal of Capillary Electrophoresis*, 001:3, Pp. 208-218.