

00550

2



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“DESARROLLO DE MÉTODOS DE SEPARACIÓN QUIRAL Y
AQUIRAL DE COMPUESTOS DERIVADOS DEL IMIDAZOL
POR ELECTROFORESIS CAPILAR”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS
P R E S E N T A:
Q.A. SERGIO CAMACHO CRUZ

TUTORA: DRA. MARIA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ

MÉXICO, D.F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios la licencia para empezar y concluir una etapa tan significativa de mi vida.

Agradezco a la Universidad Nacional autónoma de México la oportunidad que me brindó de poder seguir mi desarrollo profesional por medio de la realización de estos estudios de posgrado.

Agradezco el apoyo de CONACyT primero por medio de la beca-crédito de posgrado que me otorgó durante mis estudios y después por medio de la beca que me brindó por mi participación en el proyecto de CONACyT con número J32430-E del cual la Dra. Ma Gabriela Vargas Martínez es responsable.

Agradezco el apoyo incondicional tanto académico como personal brindado por la Dra. Gabriela Vargas sin el cual no hubiera sido posible culminar el presente trabajo.

Agradezco la participación de la Dra. Alma Luisa Revilla consistente en comentarios, sugerencias, correcciones y recomendaciones en cuanto al contenido del presente manuscrito.

Agradezco la molestia que todos y cada uno de mis sinodales se han tomado para revisar este texto.

Agradezco a la FES-Cuautitlán el haberme brindado no solo un espacio en el cual pudiera llevar a cabo mi trabajo experimental si no la posibilidad de conocer a tanta gente tan valiosa.

Agradezco a todos y a cada uno de los integrantes del laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos por haber hecho, casi siempre, más llevadera la realización de mi tesis.

Agradezco a mis compañeros de la Maestría por su apoyo y compañerismo

DEDICATORIAS

Dedico este sencillo trabajo a la memoria de mi padre y a la presencia inquebrantable e incondicional de mi madre en todo lo que le da sentido a mi vida

Dedico este trabajo a ti Gaby por que simplemente eres mi mejor amiga y una persona excepcional

A mis amigos de toda la vida, valga esta tesis como testimonio de mi cariño

INDICE

	Página
<i>1-Resumen</i>	1
<i>2-Abstract</i>	3
<i>3-Objetivos</i>	4
<i>4-Introducción</i>	6
<i>5-Quiralidad</i>	12
<i>5.1 Definición</i>	12
<i>5.2-Tipos de quiralidad y su nomenclatura</i>	13
<i>5.3-Importancia de la quiralidad en los sistemas biológicos</i>	17
<i>5.4-Métodos de preparación de enantiómeros puros</i>	19
<i>5.5-Técnicas analíticas más empleadas en el análisis de compuestos quirales</i>	21
<i>6- La electroforesis capilar (EC) como método para la confirmación de la pureza enantiomérica</i>	23
<i>6.1-Esquema general de la instrumentación y del fundamento de las separaciones en EC</i>	23
<i>6.2-La separación electroforética</i>	27
<i>6.3-El Flujo Electroosmótico (EOF)</i>	30
<i>6.4-Formas de modificación del EOF</i>	32
<i>6.5-Tipos de EC</i>	36
<i>6.6-Necesidad del uso de selectores quirales</i>	40
<i>6.7-Tipos de selectores quirales usados en EC</i>	41
<i>7-Ciclodextrinas (CD)</i>	43
<i>7.1- Ciclodextrinas naturales</i>	43
<i>7.2- Ciclodextrinas modificadas</i>	46
<i>7.3-Aspectos teóricos de las separaciones quirales en la EC con CD's como selectores quirales (modelos de Wren-Rowe y de Vigh).</i>	47
<i>8-Antimicóticos</i>	55
<i>8.1-Clasificación de los antimicóticos</i>	55
<i>8.2- Química de los antimicóticos imidazólicos</i>	57
<i>8.3-Mecanismo de acción</i>	57

8.4-Efectos adversos del uso de antimicóticos imidazólicos	59
9-Parte experimental	61
9.1-Equipo y reactivos	61
9.2-Metodología general	62
10-Discusión y análisis de resultados	65
10.1-Optimización del tipo y concentración de buffer, temperatura de capilar y voltaje de separación	65
10.1.1-Efecto del tipo de buffer en la separación de una mezcla de miconazol, ketoconazol y un marcador neutro	66
10.1.2-Efecto de la concentración del buffer en la separación de una mezcla de miconazol, ketoconazol y un marcador neutro	71
10.1.3-Efecto de la temperatura del capilar en la resolución enantiomérica de miconazol	74
10.1.4-Efecto del voltaje aplicado en los tiempos de análisis, la eficiencia y la resolución de la separación de los enantiómeros de miconazol	77
10.2-Efecto del tipo y concentración de ciclodextrinas neutras en la separación enantiomérica de miconazol y ketoconazol	80
10.3-Efecto del pH del medio en la separación enantiomérica de miconazol	92
10.4-Evaluación de las CD's altamente sulfatadas como selectores quirales	95
10.4.1-Desdoblamiento de los picos de los antimicóticos (peak splitting)	98
10.5-Evaluación de las CD's altamente sulfatadas como selectores quirales en presencia de CTAB	119
10.6-Aplicación de los métodos desarrollados para el bifonazol y miconazol en la separación quiral de los principios activos de dos productos comerciales	136
10.7-Aplicación del método desarrollado para el ketoconazol en la determinación enantiomérica de este compuesto en muestras biológicas	139
10.8-Estudio comparativo de costos por análisis en separaciones quirales	143
10.9-Separación aquiral de una mezcla de derivados del imidazol	148
11-Conclusiones	156
12-Anexos	158
13-Lista de símbolos	176
14-Lista de abreviaturas	178
15-Referencias bibliográficas	180

1-RESUMEN

El objetivo principal del presente trabajo fue el de desarrollar los métodos analíticos para la separación quiral y aquiral* de cinco derivados del imidazol (bifonazol, econazol, ketoconazol, miconazol y sulconazol) mediante la técnica de electroforesis capilar, con la finalidad de contar con métodos basados en esta técnica que permitan separar no sólo los enantiómeros de los compuestos antes mencionados, sino también los de otros derivados similares molecularmente, además de establecer un método que permita la separación aquiral de la mezcla de los cinco derivados del imidazol previamente citados. Para el desarrollo de los métodos de separación quiral se evaluó la influencia de diversas variables experimentales tales como tipo y concentración de buffer y ciclodextrina, pH, tipo de capilar, temperatura y voltaje aplicado, en parámetros analíticos tales como la resolución, eficiencia de los picos y tiempos de análisis. Los métodos analíticos diseñados en este trabajo, previa optimización de todas las variables analizadas, fueron aplicados en la separación quiral de dos antimicóticos (bifonazol y miconazol) presentes en algunas formulaciones comerciales, y para el caso del ketoconazol, el método fue aplicado en la separación quiral de muestras biológicas (heces y orina) provenientes de animales de estudio a los cuales se les suministró el antimicótico por vía oral.

Con respecto al método aquiral, éste fue desarrollado, como ya se dijo, para conseguir la separación de una mezcla de los cinco derivados del imidazol. Para tal efecto se realizó un diseño experimental de monitoreo (dos factores a dos niveles, 2^2) en el cual los factores

*Es decir *no* quiral o método en el que no se realiza ninguna separación de naturaleza enantiómerica.

analizados fueron la concentración del surfactante, bromuro de N-Cetil-N,N,N-trimetil amonio (CTAB) y el pH.

2-ABSTRACT

The aim of this work was to develop the analytical methods for the chiral separation of five imidazole derivatives (bifonazole, econazole, ketoconazole, miconazole and sulconazole) by capillary electrophoresis. It is expected that the application of the developed methods will be useful to separate other similar imidazole derivatives. Besides, a non-chiral separation method for a mixture of the five imidazole derivatives was also developed. In order to develop the chiral separation methods, the influence of several experimental factors such as cyclodextrin type and concentration, pH, type and concentration of background electrolyte, capillary type, coating type, temperature and applied voltage in terms of resolution, efficiency and analysis time were tested. Once the experimental factors were optimized, the developed methods for bifonazole and miconazole were applied to acquire the chiral resolution of these compounds contained in some commercial products. Additionally, ketoconazole was orally administered to animals and the method to separate the ketoconazole enantiomers present in biological samples such as urine and feces. On the other hand, for the development of the non-chiral method, an screening design of two levels and two factors was applied (2^2). The studied factors were N-Cetyl-N,N,N-trimethyl ammonium bromide (CTAB) concentration and pH.

3-OBJETIVOS

Generales:

-Desarrollar los métodos de separación de los enantiómeros del bifonazol, econazol, ketoconazol, miconazol y sulconazol mediante la técnica de electroforesis capilar utilizando ciclodextrinas como selectores quirales.

-Desarrollar el método de separación aquiral para una mezcla de antimicóticos empleando la técnica de cromatografía capilar micelar electrocinética (CCME).

Particulares:

-Determinar la influencia de diversas variables experimentales tales como tipo y concentración de ciclodextrinas, pH, tipo y concentración de buffer o electrolito soporte, tipo de capilar, tipo de recubrimiento capilar, temperatura de separación y voltaje aplicado en parámetros experimentales tales como la resolución, eficiencia, tiempos de análisis y alteración de la línea base en las separaciones.

-Optimizar los métodos de separación para cada antimicótico en particular para lograr la mejor resolución de los picos en un menor tiempo.

-Aplicar los métodos desarrollados a la separación quiral de muestras comerciales de antimicóticos así como a muestras de naturaleza biológica con la finalidad de evaluar sus eficiencias en comparación con aquellas obtenidas con los estándares de los antimicóticos.

-Emplear un diseño experimental de monitoreo para determinar el efecto de los factores (concentración de CTAB y pH) en la separación quiral de la mezcla de los cinco derivados del imidazol.

4-INTRODUCCIÓN

Varios compuestos derivados del imidazol tales como bifonazol, econazol, ketoconazol, miconazol y sulconazol son ampliamente utilizados en el tratamiento terapéutico de micosis superficiales a nivel humano y veterinario [1]. Los requerimientos de este tipo de compuestos se han visto incrementados recientemente en el tratamiento de pacientes inmunodeprimidos tales como aquellos que padecen SIDA, cáncer, así como pacientes que han sido sometidos a algún tipo de transplante de órgano. La disponibilidad de nuevos derivados imidazólicos con actividad antimicótica [2,3], ha aumentado recientemente, introduciéndose al mercado nuevos principios activos tales como el Fluconazol, Itraconazol, etc.

Se ha encontrado que los enantiómeros de diversos antimicóticos presentan actividades distintas entre sí. Tales diferencias pueden estar relacionadas con la farmacodinámica, la farmacocinética y las propiedades toxicológicas de cada uno de estos isómeros.

Por ejemplo, los enantiómeros "R" del diniconazol y uniconazol (vinil triazoles) poseen una actividad fungicida más potente que los enantiómeros "S", mientras que estos últimos son más activos que los primeros en cuanto a su capacidad en la regulación del crecimiento de cierta variedad de plantas [4].

En realidad, en el área farmacéutica existen muchos y muy variadas familias de compuestos en las cuales se reportan diferencias de actividad biológica entre enantiómeros. Valga citar el que quizás sea el ejemplo más famoso, la talidomida [5], que fue introducida en Europa a finales de la década de los 50's para el tratamiento de náuseas en mujeres embarazadas. Tan

sólo 5 años después de su introducción al mercado, se reportaron diversos tipos de deformidades en alrededor de 10,000 recién nacidos en todo el mundo. Posteriores estudios relacionaron estos casos con la ingesta de este fármaco y más específicamente con su enantiómero "S".

Como consecuencia de éste y otros casos, la determinación de la composición enantiomérica de diversos compuestos químicos se ha convertido sin duda en una de las cuestiones que mayor interés ha acaparado por parte de organismos reguladores tales como la Food and Drug Administration (FDA) y otros del mismo tipo [6]. Este interés se ha incrementado aún más por el hecho de que una gran cantidad de compuestos quirales o enantioméricos son comercializados en su forma racémica, es decir, como una mezcla de los dos enantiómeros.

Cabe mencionar que no solamente en el área farmacéutica se presentan casos de compuestos con estas características. Por ejemplo, del área alimentaria se pueden citar casos, como el del aminoácido asparagina, del cual se sabe que el enantiómero "D" posee un sabor dulce mientras que el isómero "L" posee un sabor más bien amargo. Otro ejemplo lo constituye la carvona de la cual el isómero "S" despide un aroma a alcaravea (una planta perteneciente a la familia de las umbelíferas, conocida vulgarmente como comino de los campos), mientras que el isómero "R" huele a menta verde. El ácido ascórbico (una vitamina hidrosoluble) presenta una notable diferencia en la actividad de sus enantiómeros, ya que el isómero "D" es un agente eficiente contra el escorbuto, mientras que su contraparte "L" no exhibe tal propiedad.

En el campo de los agroquímicos existen situaciones semejantes como lo es la de la bermetrina, de la cual se ha reportado que el isómero "D" es mucho más tóxico para los humanos que el isómero "L" [7].

Ejemplos como los anteriormente expuestos caracterizan a la quiralidad como una propiedad de suma importancia de los compuestos que la poseen, cuyas implicaciones no solamente se remiten a la importancia de la determinación de la composición enantiomérica de estos y, por ende, a su estricto control en su presentación comercial sino que, además, repercuten directamente en la economía vinculada con su producción. Para tener una idea de las repercusiones económicas que esta cuestión conlleva puede citarse el hecho de que el mercado mundial relacionado con la producción de fármacos enantioméricos excedió los 96 mil millones de dólares sólo en 1998 (ver tabla 1) y se espera que esta suma rebase los 100 mil millones de dólares para el año 2001 [7]. Tal incremento no es otra cosa más que el resultado del interés por producir fármacos con una actividad terapéutica más específica y con menor toxicidad.

Tabla 1.- Ventas de enantiómeros en forma pura a nivel mundial durante 1998

<i>Tipo de fármaco</i>	<i>Ventas (millones de dólares)</i>
Antibióticos	23,200
Anticancerígenos	7,600
Antivirales	6,200
Cardiovasculares	21,100
Sistema nervioso central	7,800
Gastrointestinales	1,400
Hematológicos	6,200
Hormonales	11,600
Respiratorios	4,200
Misceláneos	6,900
Total	96,200

Fuente: Chem. Eng. News, Oct. 1999.

La obtención de compuestos enantioméricamente puros puede conseguirse bien mediante el desarrollo y aplicación de métodos preparativos para la separación enantiomérica de mezclas racémicas, o bien, por medio de síntesis homoquirales o estereoselectivas. Desafortunadamente, existen pocas publicaciones reportadas relacionadas con la síntesis de enantiómeros puros en el caso de derivados imidazólicos debido principalmente a la complejidad y dificultades inherentes a este tipo de reacciones [8]. Esto trae como consecuencia el que los métodos de separación comúnmente usados en este tipo de análisis impliquen mayores ventajas con respecto a las síntesis homoquirales.

Se ha reportado el empleo de diversas técnicas analíticas para la determinación quiral de derivados del imidazol; por ejemplo, el clotrimazol, miconazol y ketoconazol han sido determinados y cuantificados en presentaciones oleosas mediante cromatografía en capa fina [9] y en cremas por colorimetría [10]. Técnicas como cromatografía de gases (CG) [11, 12], espectrofotometría [13,14], polarografía [15] y resonancia magnética nuclear-potenciometría diferencial [16] han sido empleadas para la determinación de miconazol y clotrimazol. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se han llevado a cabo separaciones de naturaleza quiral de los antimicóticos antes mencionados.

Pocas son las técnicas analíticas empleadas en la separación enantiomérica de compuestos imidazólicos [17]. Como ejemplos de las técnicas más comúnmente empleadas puede citarse el uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) [18,19] así como de CG en el análisis quiral de antimicóticos derivados del imidazol tales como econazol, miconazol, bifonazol, ornidazol y enilconazol. Sin embargo, durante los últimos 20 años, la electroforesis capilar (EC) ha sido reconocida como una poderosa

técnica analítica en el área de las separaciones quirales [20] debido principalmente a que los selectores quirales pueden adicionarse al electrolito soporte (ES), utilizándose muy pequeñas cantidades de estos para llevar a cabo los análisis. Otra ventaja inherente a esta técnica consiste en el empleo de volúmenes pequeños de disolventes (aproximadamente 6 ml de solvente acuoso para cada corrida). Aunado a lo anterior, cabe mencionar que mediante esta técnica se obtienen altas eficiencias así como cortos tiempos de análisis.

Diversos grupos de investigación han reportado resoluciones enantioselectivas de mezclas racémicas por EC tanto de derivados del imidazol como del triazol usando ciclodextrinas (CD's) tanto nativas como modificadas como selectores quirales. Sin embargo, algunos de estos trabajos mostraron ciertas desventajas tales como resoluciones bajas y tiempos de análisis de hasta 40 minutos [21, 27]. Recientemente, un nuevo tipo de CD modificada fue introducido al mercado por Gyula Vigh en la que la característica principal es la presencia de varios grupos sulfato altamente ácidos (ionizados a cualquier valor de pH), que hacen que la molécula se comporte como un polianión. El empleo de este tipo de CD's ha mostrado un incremento en la resolución de mezclas racémicas de varios tipos de fármacos así como un decremento en los tiempos de análisis en algunos casos [28].

Por todo lo anterior, el presente trabajo de tesis tiene la finalidad de desarrollar los métodos de separación quiral y aquiral para algunos compuestos derivados del imidazol (bifonazol, econazol, ketoconazol, miconazol y sulconazol) utilizando la técnica de EC.

Para lograr tal objetivo se estudiará el efecto de diversos factores (pH, tipo y concentración de CD, tipo y concentración del ES, tipo de capilar, tipo y concentración de recubrimiento dinámico, temperatura, voltaje, etc) en la resolución enantiomérica de estos antimicóticos.

Se plantea la aplicación de estos métodos para la separación quiral de algunos antimicóticos presentes en muestras comerciales y biológicas. Además, para el desarrollo del método de separación aquiral se propone el uso de la técnica de CCME con el fin de realizar la separación simultánea de la mezcla de los cinco antimicóticos. Para encontrar las condiciones adecuadas de esta separación se propone la utilización del diseño experimental de monitoreo a fin de evaluar la influencia de parámetros como el pH y la concentración de surfactante.

5-QUIRALIDAD

5.1 Definición

La palabra *quiral* se deriva del griego “cheir” que significa mano. Se define como quiral a una molécula que puede existir como dos isómeros especulares que no pueden ser superpuestos.

Como puede apreciarse en la Fig. 1, las dos formas que puede adoptar esta molécula en el espacio no pueden trasladarse o superponerse pese a tener el mismo número y tipo de átomos unidos al carbono central, es decir pese a ser isómeros.

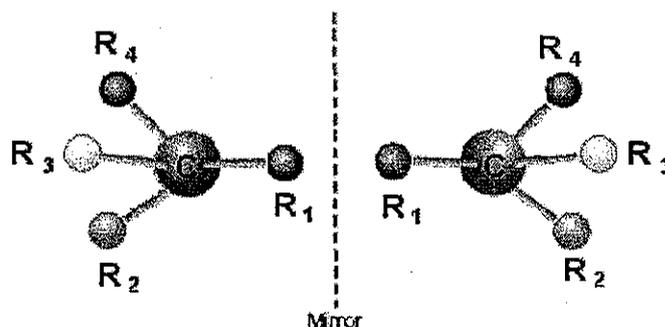


Figura 1. Ejemplo de un compuesto quiral y sus imágenes especulares (enantiómeros).

El carbono (**C**) que está unido a los 4 diferentes sustituyentes (R₁, R₂, R₃ y R₄) de la Fig. 1 se conoce como *centro o carbono quiral*, y se conocen como *enantiómeros* a cada una de las moléculas relacionadas con las imágenes especulares no superponibles.

La presencia de un centro quiral en una molécula le confiere un *centro de asimetría* y esta característica a su vez le confiere a la molécula la propiedad de desviar la luz polarizada de manera específica. Los enantiómeros poseen propiedades fisicoquímicas idénticas (punto de fusión, de ebullición, movilidad, solubilidad etc.), excepto en lo referente a la capacidad de cada uno de los enantiómeros de desviar el plano de la luz polarizada, siendo entonces sustancias *ópticamente activas*. Sin embargo, una mezcla de dos enantiómeros (llamada racemato o mezcla racémica) será ópticamente inactiva siempre que la composición enantiomérica sea 50-50%, debido a que la rotación óptica de un enantiómero cancela la rotación óptica del otro ya que son de la misma magnitud pero de sentido opuesto. El número de estereoisómeros o isómeros de una molécula quiral dependerá del número de carbonos quirales que posea.

Los *diastereoisómeros* son estereoisómeros que poseen más de un carbono quiral pero que no son imágenes especulares entre sí. Estos compuestos poseen propiedades químicas similares, más no idénticas, y propiedades físicas diferentes [29].

5.2-Tipos de quiralidad y su nomenclatura

La quiralidad no solamente puede existir teniendo a un átomo de carbono como centro quiral, de hecho el término centro quiral incluye la posibilidad de que el centro de asimetría recaiga en otros tipos de átomos además del carbono. Estructuras tetraédricas formadas por cuatro diferentes grupos sustituyentes alrededor de átomos de elementos tales como el silicio, nitrógeno, fósforo o azufre son ejemplos de compuestos quirales.

Elementos de los grupos V y VI de la tabla periódica pueden formar estructuras no planares con tres ligandos diferentes, en las cuales la presencia de un par no compartido de electrones del átomo central puede actuar como un cuarto ligando. Dos ejemplos de moléculas quirales en donde el átomo central es diferente al carbono se muestran en la figura 2.

Las moléculas quirales pueden ser de diferente naturaleza y poseer diferentes formas, sin embargo, todas ellas pueden ser clasificadas en tres categorías [30]:

- Quiralidad central: El espacio tridimensional es ocupado asimétricamente alrededor de un centro quiral.
- Quiralidad axial: el espacio tridimensional es ocupado asimétricamente alrededor de un eje quiral.
- Quiralidad planar: el espacio tridimensional es ocupado asimétricamente alrededor de un plano.

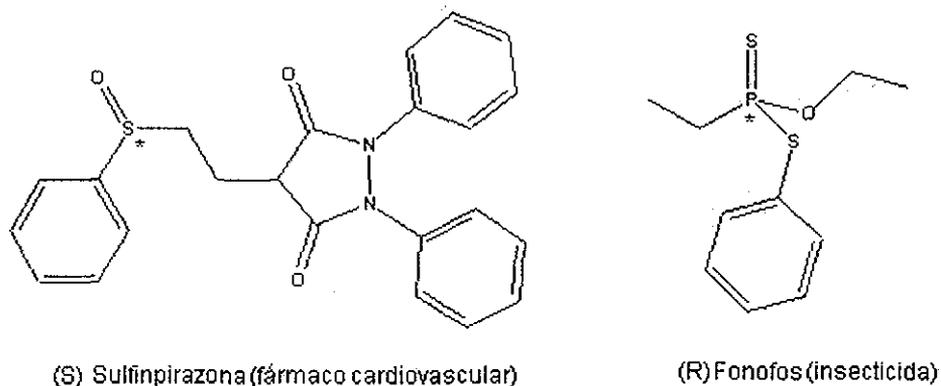


Figura 2. Ejemplos de moléculas quirales con centros quirales diferentes al carbono.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Como ya se ha dicho, los enantiómeros poseen propiedades físicas y químicas idénticas excepto en su propiedad para desviar el plano de la luz polarizada. De acuerdo con el sistema de nomenclatura propuesto por Emil Fisher en 1891, las moléculas con rotación óptica positiva (+) son conocidas como dextrorrotatorias o dextrógiras (por ejemplo, la D-anfetamina) y se identifican con una **D** al principio del nombre del compuesto, y aquéllas con rotación óptica negativa (-) son llamadas levorrotatorias o levógiras (por ejemplo la L-anfetamina) y se identifican con una **L**. Este sistema es principalmente usado en la clasificación de compuestos que poseen átomos de carbono asimétricos, de tal forma que no debe ser empleado como un sistema general de nomenclatura. Existen otros sistemas de nomenclatura como el sistema Cahn-Ingold-Prelog, que está basado en una serie de reglas que asignan prioridades a los átomos unidos al centro quiral relacionadas con su número atómico y masa, también se consideran el tipo de configuración *cis* o *trans* así como la presencia de pares de electrones no compartidos (a los cuales se les asigna un valor de número atómico igual a cero) entre otras. Este sistema es uno de los más empleados y emplea los prefijos R y S además de que implica dos pasos.

Paso 1. Se asigna un orden de prioridad a los cuatro átomos o grupos unidos al centro quiral. En el caso, por ejemplo, del bromocloroyodometano (CHClBrI), los cuatro átomos unidos al centro quiral son todos diferentes y la prioridad simplemente depende del número atómico; el átomo de número atómico mayor tiene preferencia. Así: I, Br, Cl, H tal como se muestra en la figura 3.

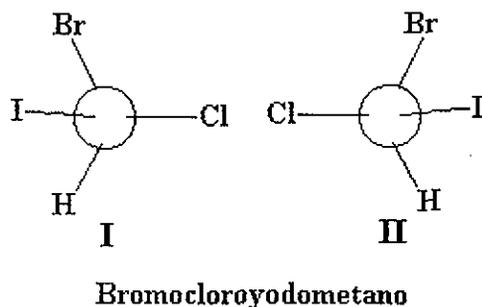


Figura 3.

Paso 2. Se visualiza la molécula orientada de modo que el grupo de prioridad más baja se aleje y luego se observa el ordenamiento de los grupos restantes. Si, procediendo desde el grupo de prioridad máxima hacia el de segunda y luego al de tercera, se sigue una trayectoria en el sentido en que se desplazan las manecillas del reloj, la configuración se especifica como R (del latín: rectus, “derecho”); si lo hace en el sentido contrario, es S (del latín: sinister, “izquierdo”). Así, las configuraciones I y II de la figura 3 se examinan como se es indica en la figura 4:

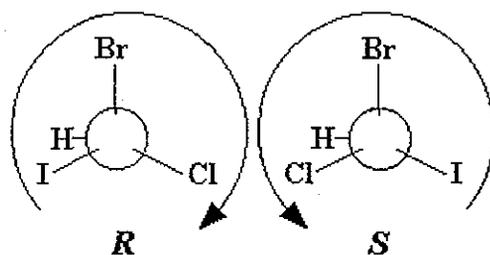


Figura 4.

Y se especifican como *R* y *S*, respectivamente.

Debido a la dificultad inherente a la asignación de una configuración (S) o (R) a moléculas helicoidales, se ha desarrollado un sistema alternativo conocido como sistema M,P para estos casos. Este sistema implica primeramente la observación de la hélice desde un

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

extremo, después, definir si el sentido de la hélice ocurre a favor del movimiento de las manecillas del reloj (en cuyo caso se le asigna una configuración P) o bien si el sentido es en la dirección opuesta (en cuyo caso se asigna una configuración M). Estos tres sistemas de nomenclatura son en general los más empleados en la clasificación de la mayor parte de las moléculas quirales.

5.3-Importancia de la quiralidad en los sistemas biológicos

El gran interés dirigido a las moléculas ópticamente activas se debe principalmente a que muchas de éstas se encuentran presentes en sistemas biológicos. Proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos poseen estructuras quirales que están asociadas a funciones específicas. Debido precisamente a su carácter quiral, los organismos vivientes poseen receptores que presentan diferentes respuestas biológicas a uno o a un par de enantiómeros en fármacos, alimentos, plaguicidas, etc., ya que reconocen el arreglo espacial de estas moléculas.

Una mezcla consistente en iguales cantidades de enantiómeros, esto es, un racemato, es obtenido experimentalmente mediante reacciones químicas llevadas a cabo en un ambiente aquiral. Por lo tanto, para obtener especies ópticamente puras es menester llevar a cabo la separación de la mezcla racémica. Además, es necesario lograr una separación que produzca un gran nivel de pureza enantiomérica dado que la presencia de impurezas de uno de los enantiómeros puede tener, como ya se ha mencionado, efectos indeseados de naturaleza toxicológica, farmacológica o de otro tipo. Aunado a lo anterior, debe tenerse en cuenta que este tipo de impurezas pueden generarse durante la misma síntesis del

compuesto quiral y reaccionar selectivamente en una o más etapas de este proceso y dar lugar a la formación de otros tipos de compuestos indeseados.

Contra lo que podría suponerse, no es una regla general el que los sistemas biológicos respondan (en forma terapéutica o deseable) a los isómeros "D". Un ejemplo de esto lo constituye la epinefrina de la cual el enantiómero "L" es 10 veces más potente como vasoconstrictor que el isómero "D".

La gran cantidad de fármacos con propiedades quirales junto con la elevada cantidad de casos documentados acerca de diferencias significativas entre las actividades de enantiómeros agudiza la necesidad de contar con estrategias que permitan asegurar con una exactitud importante la pureza enantiomérica de compuestos no sólo con aplicación en el área farmacéutica sino en la de muchas otras.

Es un hecho que aproximadamente el 60% de los fármacos más comúnmente prescritos poseen uno o más centros de asimetría. Un porcentaje muy elevado de los fármacos de mayor aplicación es usado bien en su forma racémica o bien en su forma diastereomérica con la desventaja adicional de que las diferencias en las propiedades fisiológicas de los enantiómeros de estos compuestos no han sido completamente documentadas en varios casos debido a las dificultades inherentes a la obtención de sus formas puras. Por tanto, la posibilidad de que un paciente esté ingiriendo un enantiómero inútil, o bien de efecto indeseable en su organismo, cada vez que ingiere un racemato, es considerable.

Para tener certeza de los efectos farmacológicos de los fármacos habitualmente usados así como de aquellos de reciente desarrollo es importante primero aislar y examinar los enantiómeros separadamente [30].

5.4-Métodos de preparación de enantiómeros puros

Existen dos formas para preparar compuestos enantioméricamente puros de manera comercial [31-33]. Uno de ellos consiste en el diseño de métodos de síntesis estereoselectiva mediante los cuales es posible obtener enantiómeros puros. El otro consiste en la resolución de mezclas racémicas en sus enantiómeros constituyentes el cual implica la gran ventaja de proporcionar ambos estereoisómeros, a diferencia del primero que sólo produce a uno de ellos.

-Métodos de síntesis estereoselectiva

Este tipo de síntesis suele ser en muchos casos demasiado elaborada y complicada. Por ejemplo, en los años setentas se desarrolló una síntesis para aminoácidos, basada en una hidrogenación con catálisis homogénea, que directamente producía enantiómeros puros.

El objetivo principal de este trabajo era el de producir proteínas sintéticas. Por ejemplo, para la síntesis de alanina partiendo de ácido l-acetamidopropenóico como sustrato aquiral, la primera etapa involucra una hidrogenación del enlace doble del sustrato en presencia de un catalizador (de Wilkinson) que previamente ha sido modificado para ser ópticamente activo mediante la adición de un ligando ópticamente activo. Por tanto, los reactivos en estas condiciones se hallarían en un medio quiral provisto por la esfera de coordinación del metal. Esto trae como consecuencia que haya la formación selectiva de uno de los dos enantiómeros. Pese a que los resultados obtenidos con estos catalizadores en algunos casos han sido relevantes y se han obtenido otros tipos de compuestos además de aminoácidos, la síntesis *per se* involucra varias etapas y considerando los errores experimentales que

podrían derivarse de cada una de ellas, el rendimiento final de este tipo de síntesis puede, en muchos casos, no ser del todo satisfactorio [29].

-Métodos de separación para la obtención de enantiómeros puros

Aún cuando los métodos cromatográficos pudieran parecer sumamente caros para varios investigadores, su aplicación se ha incrementado debido a que un conocimiento más completo de sus características ha demostrado que tecnológicamente y económicamente son técnicas muy ventajosas para la preparación tanto de compuestos ópticamente activos como de otros de gran valor en el área de la investigación. Las razones principales para recurrir a la cromatografía preparativa para obtener enantiómeros puros, por ejemplo la producción a gran escala del enantiómero *s*-naproxen, son las siguientes:

- ◆ Para evaluar propiedades biológicas del compuesto de interés
- ◆ Para el estudio de propiedades óptico-quirales de un compuesto de interés o bien de compuestos intermediarios
- ◆ Para el control de la síntesis de intermediarios quirales con el objeto de asegurar la producción del intermediario deseado
- ◆ Para el control del compuesto deseado en términos de su pureza enantiomérica

Tan importantes son los trabajos en esta área, que el premio Nobel de Química del 2001, lo ganaron 3 investigadores dedicados al desarrollo de catalizadores para síntesis estereo dirigidas (Anexo 1).

Debido a razones terapéuticas, toxicológicas y regulatorias, los compuestos farmacéuticos han sido sujetos a separaciones preparativas para investigar sus propiedades óptico-quirales

y biológicas. Es muy frecuente que para llevar a cabo el análisis de un enantiómero dado se requieran sólo pequeñas cantidades de éste, es por ello que los procesos cromatográficos se hacen tan importantes.

Las separaciones a escala preparativa pueden llevarse a cabo por cualquiera de las siguientes técnicas: cromatografía frontal, cromatografía de desplazamiento o cromatografía de elución [30].

5.5-Técnicas analíticas más empleadas en el análisis de compuestos quirales

El desarrollo de métodos de separación quiral continúa siendo un reto para los científicos dedicados a este campo. Una técnica universal para la separación de compuestos ópticamente activos no existe.

Hasta la fecha, los métodos cromatográficos [19,34,35] y electrocinéticos [36] son los que más se utilizan en el análisis de rutina de compuestos quirales.

La cromatografía de líquidos de alta resolución con sus más de 100 fases estacionarias quirales (CSP por sus siglas en inglés) cuya resolución es muy diversa, es muy empleada actualmente. Entre las CSP más usadas se encuentran las de fase inversa, como “Chiral AGP” (α -ácido glicoproteína, Enantiopack[®]), “Ultron” OVM (ovomucoide) y “Crownpak CR(+)” (derivados de éteres corona) y las de fase normal como “Chiralcel OD/OJ” y “Chiralpak-AD/AS” (derivados de celulosa-amilosa, Dialcel Chemical Industries). La cromatografía de fluidos supercríticos, que entre sus CSP más usadas incluye “Chiralcel OD/OJ” y “Chiralpak AD/AS”, es otra técnica empleada con relativa frecuencia en el

análisis de sustancias quirales, por ejemplo en el análisis o separación de derivados de aminoácidos [37]. La cromatografía de gases es usada en la separación de compuestos quirales volátiles [38-40] previa derivatización del analito o usando directamente ciclodextrinas como selectores quirales.

En general, las técnicas antes citadas se han aplicado a la separación quiral de diversos tipos de compuestos enantioméricos, pero la aplicación específica de técnicas analíticas al análisis de derivados del imidazol de naturaleza quiral está representada básicamente por las técnicas que a continuación se enlistan: HPLC [41, 42], CG [43], cromatografía en capa fina [9], espectrofotometría UV-Visible [44], RMN, potenciometría [16], amperometría [45] y polarografía [46].

6- LA ELECTROFORESIS CAPILAR COMO MÉTODO PARA LA CONFIRMACIÓN DE LA PUREZA ENANTIOMÉRICA

La EC es una técnica que se ha utilizado en diversas pruebas de pureza enantiomérica. Algunos ejemplos de su aplicación son: la separación de los enantiómeros de fluparoxán utilizando dimetil beta CD (DM β CD) como selector quiral [47]; la separación de los estereoisómeros “S” y “R” de bupivacaína a un nivel de 0.1% del isómero “S” utilizando DM β CD [48]; el análisis quiral de fenilpropanolamina a niveles del 0.1% del enantiómero “S” empleando HS γ CD. La efedrina y norefedrina son otros fármacos cuya pureza óptica ha sido determinada por medio de la técnica de EC [49]. Algunos métodos selectivos de CCME han sido aplicados para asegurar la pureza óptica de lotes de hidrocloreuro de trimequinol [50].

Los excelentes resultados en cuanto a selectividad y resolución obtenidos con la EC han podido en muchos casos permitir la determinación de impurezas de los estereoisómeros no deseados para varios compuestos quirales.

6.1-Esquema general de la instrumentación y del fundamento de las separaciones en EC

Toda separación vía electroforesis se realiza mediante la migración diferencial de solutos (cargados) sometidos a la acción de un campo eléctrico. En el caso de la técnica de EC, la separación se hace en capilares generalmente de sílice fundida, los cuales son llenados con solución amortiguadora o buffer.

El primer equipo comercial fue presentado al mercado internacional en 1988, mostrando un gran número de ejemplos de separaciones eficientes y rápidas de muestras de compuestos

iónicos y bio-macromoléculas [51]. Cabe señalar que todos los aparatos comerciales aplican esencialmente el mismo principio para realizar cualquier modalidad de EC. La instrumentación en esta técnica es relativamente sencilla como puede observarse en la figura 5 en la cual se muestra un diagrama esquemático típico de los componentes básicos del equipo de EC. Los extremos de un capilar de sílice fundida son sumergidos en el buffer contenido en dos viales, y el interior del capilar es llenado con ese buffer.

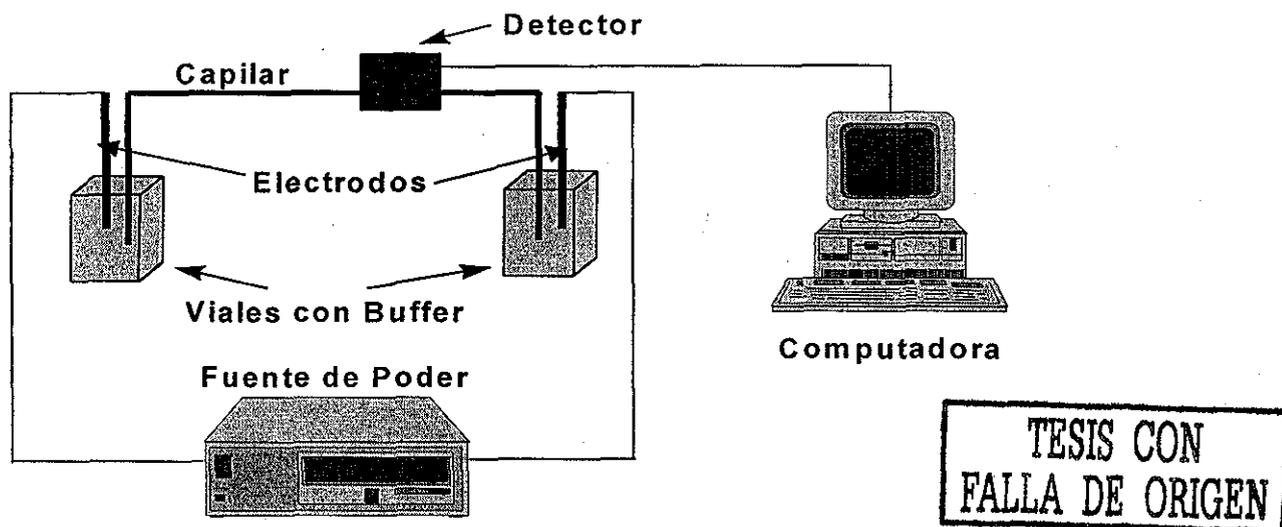


Figura 5. Diagrama esquemático de un sistema convencional de electroforesis capilar.

Cada vial contiene un electrodo de platino que sirve para establecer contacto eléctrico entre una fuente de poder de alto voltaje y la solución del interior de la columna capilar.

La introducción de la muestra se realiza reemplazando uno de los viales con buffer por un vial que contiene la muestra (disuelta en agua o en buffer) y luego aplicando por unos segundos una presión externa con ayuda de una bomba (inyección hidrodinámica) o bien un campo eléctrico (inyección electrocinética). Hecho lo anterior, se aplica el campo eléctrico para llevar a cabo la separación. La detección se realiza en el otro extremo de la columna ya

sea en línea (a través de la pared del capilar) con un detector UV-VIS, arreglo de diodos o fluorescencia, o fuera del capilar con detectores como índice de refracción, conductimetría, amperometría, e inclusive espectrometría de masas (ver tabla 2).

Dentro de las principales ventajas del uso de la EC están su completa automatización, la sencillez en el desarrollo de los métodos analíticos, los bajos costos debidos al uso de cantidades mínimas de reactivos, lo que hace posible el uso de disolventes caros sin elevar demasiado el costo del análisis. Todas estas ventajas han incrementado el interés de la comunidad científica por el uso de esta técnica, y como consecuencia, el número de publicaciones y la edición de libros al respecto ha aumentado en forma logarítmica durante los últimos 8 años [52-62].

Tabla 2. Detectores más comunes en EC y sus límites de detección aproximados.

<i>Detector</i>	<i>Moles</i>	<i>Molaridad^a</i>
Absorbancia UV/VIS	10^{-15} - 10^{-16}	10^{-5} - 10^{-7}
Absorbancia Indirecta	10^{-12} - 10^{-15}	10^{-4} - 10^{-6}
Fluorescencia	10^{-15} - 10^{-17}	10^{-7} - 10^{-9}
Fluorescencia Indirecta	10^{-14} - 10^{-16}	10^{-6} - 10^{-8}
Fluorescencia Inducida por Láser (LIF)	10^{-18} - 10^{-20}	10^{-13} - 10^{-16}
Espectrometría de Masas	10^{-16} - 10^{-17}	10^{-8} - 10^{-10}
Amperometría	10^{-18} - 10^{-19}	10^{-7} - 10^{-10}
Conductimetría	10^{-15} - 10^{-16}	10^{-7} - 10^{-9}
Índice de Refracción	10^{-14} - 10^{-16}	10^{-8} - 10^{-8}
Radiometría	10^{-17} - 10^{-19}	10^{-10} - 10^{-12}

^aDepende del volumen de muestra inyectado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dentro del capilar de sílice fundida, la superficie sólida se puede cargar negativamente debido a la ionización de los grupos silanol en ambientes acuosos (ver anexo 1). Para compensar esta capa de iones negativos, los contra-iones de estos aniones, es decir, los cationes presentes en el buffer, se alinean sobre la superficie del capilar para compensar el exceso de aniones.

Al aplicar una diferencia de potencial, los cationes que forman la capa compensatoria, migran hacia el cátodo y, debido a que se hallan solvatados, “acarrear” en su movimiento al electrolito soporte y a los diferentes compuestos con ellos. Este flujo de líquido que se origina bajo la presencia de un campo eléctrico, cuando una solución iónica está en contacto con una superficie sólida cargada, se denomina flujo electro-osmótico (EOF por sus siglas en inglés). En la figura 6 se presenta un esquema en donde se ilustra mejor lo antes dicho. Cabe mencionar que el movimiento de las diferentes especies en solución no sólo depende del EOF sino que además estará en función, por supuesto, de las propiedades que posean los analitos (su carga y masa).

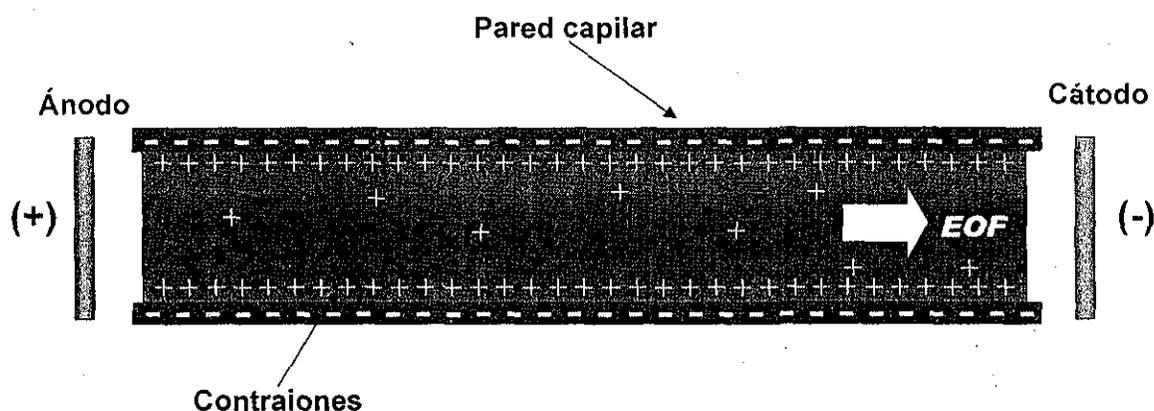


Figura 6. Diagrama esquemático del flujo electroosmótico (EOF) dentro del capilar.

6.2-La separación electroforética

Como ya se mencionó, una separación electroforética implica el movimiento diferencial de moléculas cargadas propiciado por la imposición de un campo eléctrico. La velocidad de un soluto cargado en ausencia de EOF puede calcularse con la siguiente expresión:

$$v = \mu_e E \quad (1)$$

donde: v = velocidad del soluto o molécula cargada (ion)

μ_e = movilidad electroforética

E = campo eléctrico aplicado

El campo eléctrico es función solamente del voltaje aplicado así como de la longitud del capilar empleado. Dados un ion y un medio se tiene que la movilidad del primero es constante y por tanto característico, de esto se deduce que la movilidad de un ion será determinada por el balance de fuerzas entre la fuerza eléctrica ejercida sobre éste y la fricción que el medio ejerce sobre él, relación que viene dada por la siguiente expresión:

$$\mu_e \propto [\text{fuerza eléctrica } (F_E)]/[\text{fuerza friccional } (F_F)] \quad (2)$$

es decir, $F_E = -F_F$ ya que son vectores opuestos y la suma de ambos da el vector resultante

Por su parte, F_E viene dada por

$$F_E = qE \quad (3)$$

donde q = carga del ion

y F_F para un ion esférico viene dado por:

$$F_F = -6 \eta \pi r v \quad (4)$$

donde: η = viscosidad de la solución

r = radio del ion

v = velocidad del ion

π = No. Pi (≈ 3.1416)

Durante la electroforesis se lleva a cabo un balance de estas fuerzas y se cumple la siguiente condición para un estado estacionario:

$$qE = 6 \eta \pi r v \quad (5)$$

Despejando a v de (5) y sustituyendo en (1), se obtiene una ecuación que describe la movilidad en términos de parámetros físicos:

$$\mu_e = q/(6 \eta \pi r) \quad (6)$$

Esta ecuación claramente demuestra que iones pequeños con alta densidad de carga poseerán elevadas movilidades, mientras que aquellos iones grandes con baja densidad de carga tendrán movilidades bajas.

La velocidad de un soluto cargado tal como está definida en la ecuación (1) también se conoce como velocidad electroforética aparente (v_{ap}) y puede ser determinada cuando la distancia recorrida (L_d) por el soluto es dividida por el tiempo de migración. La velocidad aparente es proporcional a la fuerza del campo eléctrico aplicado y es el resultado de dos factores: la movilidad electroforética de la especie en cuestión y el EOF del cual ya se hizo mención antes y se profundizará más adelante. La movilidad electroforética efectiva de un catión dado (μ_{ef}) (ecuación 7), está dada por la sustracción de la movilidad electroforética del EOF (μ_{EOF}) a la movilidad electroforética aparente (μ_{ap}) del soluto antes dicho. Es decir, la movilidad electroforética efectiva de un catión dependerá de la μ_{EOF}

$$\mu_{ef} = \mu_{ap} - \mu_{EOF} \quad (7)$$

En una separación por EC cuando un soluto se ve sometido a la acción del campo eléctrico, el sentido de su migración dependerá de la intensidad, dirección y sentido de su propio vector el cual a su vez será resultado de la propia naturaleza eléctrica del soluto. Como puede apreciarse en la figura 7, un catión electromigrará del sitio de introducción de la muestra (el ánodo en polaridad normal), al cátodo. Si se considera que al existir el EOF también migrará hacia el mismo electrodo entonces se deduce que las especies cargadas positivamente migrarán más rápido que las neutras y aún más que las negativas. Dicho en otras palabras, al actuar el vector fuerza del EOF en la misma dirección y sentido que los del vector de un catión, se produce un aumento en la velocidad de migración de esta especie. Debido a que los vectores fuerza del EOF y de un anión actúan en sentidos opuestos, la velocidad de éste hacia el cátodo será menor que la de una especie neutra y más aún que la de un catión. El movimiento neto del anión será hacia el cátodo siempre y cuando la magnitud del vector del EOF sea superior al de éste, de lo contrario, dicho movimiento será hacia el ánodo.

Respecto a las especies neutras (que en la figura 7 vienen representadas por las letras N), debido a que carecen de cargas, su movimiento ocurre sólo en virtud del movimiento del EOF, de tal forma que estas especies viajarán a la misma velocidad que la del EOF.

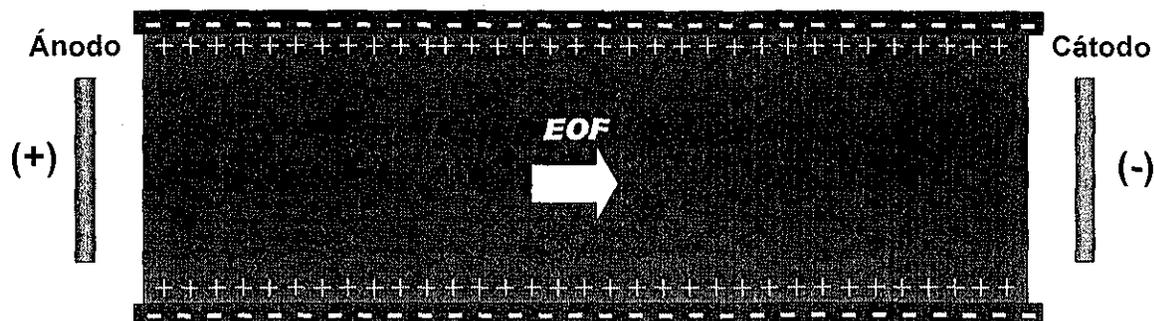


Figura 7. Diagrama esquemático del orden de separación de especies catiónicas (+), aniónicas (-) y neutras (N) bajo la influencia del EOF al aplicar una diferencia de potencial en electroforesis capilar.

6.3-El Flujo Electroosmótico (EOF)

Un elemento de gran importancia en la técnica de EC es el flujo electroosmótico (EOF) el cual se define como el flujo del volumen del líquido en el capilar originado por la migración de la capa de contraiones del electrolito soporte (iones de carga contraria a la de los grupos de las paredes del capilar) formada tanto en las paredes del capilar, como en las del electrodo de carga opuesta, debido a la imposición de un campo eléctrico. Para el caso de superficies de sílice fundida, son los grupos silanol (SiOH , los cuales, como se mencionó anteriormente, pueden predominar en su forma aniónica a $\text{pH} > 6$) los que definen un exceso de cargas negativas. Al entrar en contacto con el buffer, los contraiones (especies cargadas positivamente) se aproximan a la superficie para mantener el balance de cargas dando lugar a una doble capa que a su vez establece una diferencia de potencial (potencial zeta).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Una vez que se aplica el voltaje a lo largo del capilar, los cationes que conforman a la doble capa empiezan a migrar tanto hacia las paredes del capilar como hacia el cátodo, y como éstos están solvatados, conforme migran “arrastran” al grueso del líquido con ellos.

La magnitud del EOF puede ser evaluada en términos de movilidad con la siguiente expresión:

$$\mu_{\text{EOF}} = (\epsilon\xi/\eta) \quad (8)$$

donde: μ_{EOF} = movilidad del EOF

ϵ = constante dieléctrica del medio o de la solución

ξ = potencial zeta

η = viscosidad del electrolito soporte

Se sabe que el potencial zeta está esencialmente gobernado por la carga en la superficie de la pared interna del capilar. Dado que la carga de la superficie del capilar depende del pH, la magnitud del EOF también dependerá de éste. A valores altos de pH donde los grupos silanol se hallan predominantemente desprotonados, el EOF es significativamente mayor al generado a valores de pH bajos, donde los grupos silanol están principalmente protonados.

El potencial zeta también depende de la temperatura, de la constante dieléctrica del medio y de la fuerza iónica, cuando ésta última es grande, la doble capa en la pared capilar se ve comprimida al mismo tiempo que el potencial zeta disminuye, esto trae como consecuencia que el EOF disminuya.

Un aspecto importante del EOF es su perfil plano (ver figura 8). Este hecho es de importancia relevante ya que no contribuye a la dispersión de los solutos, en contraste con el perfil generado por una bomba externa el cual es parabólico producto de la fuerza de

cizalla en la pared del capilar. A diferencia del primero, el perfil parabólico contribuye en gran medida a la dispersión de los solutos, teniendo como consecuencia un detrimento en la eficiencia y resolución de la separación.

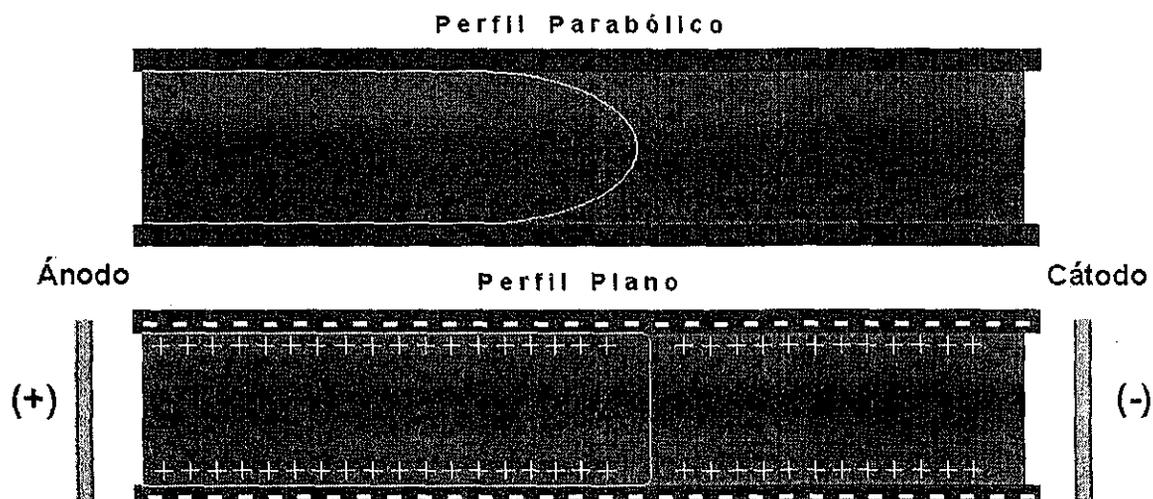


Figura 8. Diagrama esquemático de los tipos de perfil generados en cromatografía de líquidos (perfil parabólico) y en electroforesis capilar (perfil plano).

6.4-Formas de modificación del EOF

Como ya se ha explicado, el EOF es un elemento importante durante el proceso electroforético. Sin embargo, dependiendo del tipo de separación que se esté llevando a cabo, en ocasiones es importante disminuir su efecto o incluso invertir su sentido. La disminución del EOF puede lograrse de varias formas: con recubrimientos dinámicos, con recubrimientos permanentes y disminuyendo el pH.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Recubrimientos dinámicos.- Esta modalidad requiere el uso de compuestos que posean cargas contrarias a las de los grupos silanol del capilar. Al ocurrir esta interacción, se compensan eléctricamente la mayor parte de las cargas negativas de los grupos silanol por medio de las moléculas del compuesto a emplear como recubrimiento, y por tanto los contraiones del buffer no crean la doble capa sobre la superficie interna del capilar. Esto trae como consecuencia que al aplicar la diferencia de potencial no exista o disminuya notablemente el EOF ya que no hay una capa de contraiones que se desplace en dirección al cátodo, además de que las moléculas del recubrimiento se hallan fuertemente adsorbidas a la superficie del capilar. Diversas aminas tales como la trietanolamina (TEA), la etilamina, la trietilamina, la galactosamina, etc. [63, 64], han sido empleadas para realizar este tipo de recubrimientos. El empleo de algunos surfactantes catiónicos [65] utilizados por debajo de su concentración micelar crítica (CMC), puede disminuir también el EOF debido a que al interaccionar la carga positiva del surfactante con los grupos silanol, la porción hidrofóbica de esta molécula no induce la formación de la capa de contraiones con lo que se crea un efecto semejante al anteriormente descrito, esto viene representado esquemáticamente en la figura 9-B. Si, por el contrario, estos surfactantes se emplean por arriba de su CMC, puede formarse una segunda capa de éstos por interacción de las porciones hidrofóbicas entre las moléculas de surfactante adheridas directamente a la superficie del capilar, con las cadenas hidrofóbicas de las moléculas de la segunda capa (ver figura 9-C). Esto trae como consecuencia que las cargas positivas de las moléculas de la segunda capa de surfactante queden expuestas al entorno acuoso y por tanto favorezcan la formación de una capa de contraiones provenientes del buffer que en este caso estará compuesta por aniones, teniendo como resultado una inversión del EOF al momento de aplicar una diferencia de potencial.

Este tipo de recubrimientos se caracteriza porque puede ser removido mediante lavados, de ahí su nombre de *dinámico*.

Este tipo de recubrimiento también se utiliza con la finalidad de evitar fenómenos de adsorción (más que con el objeto de suprimir el EOF) de algún analito de interés que pudiera ser retenido en la pared interna del capilar. Esto se consigue en virtud de que las moléculas de recubrimiento compiten por los grupos silanol con las moléculas de analito dejando, por tanto, menos sitios disponibles en la superficie capilar para que ocurran adsorciones.

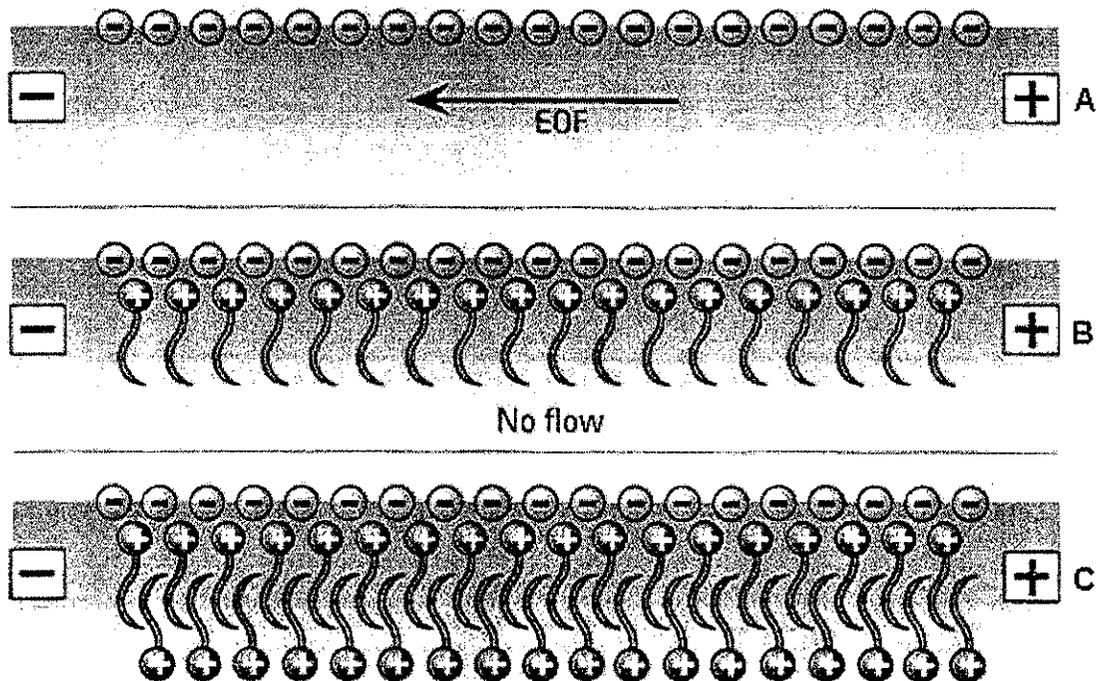


Figura 9. Diagrama esquemático de la supresión o eliminación (B) e inversión (C) del EOF por adición de un surfactante catiónico.

Recubrimientos permanentes.- La característica principal de estos recubrimientos consiste en que están unidos a la superficie interna del capilar de manera covalente, es decir químicamente y por lo tanto no pueden ser removidos por un lavado convencional. Sin embargo, con la finalidad de conservar la integridad de la película de recubrimiento (y por ende la reproducibilidad de resultados) es necesario evitar condiciones extremas (principalmente referidas al pH) tanto de lavado como de operación. Dos recubrimientos permanentes muy empleados en electroforesis capilar son los de poliacrilamida (PAA) [66] y de alcohol polivinílico (PVA) [67, 68]. Un recubrimiento permanente modifica notablemente el EOF (lo reduce por las mismas razones que un recubrimiento dinámico). Por ejemplo, para realizar la técnica de electroforesis capilar de enfoque isoeléctrico (cuyas características se explican más adelante), es necesario utilizar un capilar recubierto o neutro, ya que de esta forma se conserva el gradiente de pH indispensable para llevar a cabo la separación por esta técnica. El empleo de capilares recubiertos, sin embargo, ha sido mayormente enfocado a evitar fenómenos de adsorción de compuestos tales como las proteínas. Debido a la gran cantidad de regiones ionizables en una proteína, existe una probabilidad alta de que ocurran interacciones entre estos centros y los grupos silanol del capilar, lo cual puede traducirse en fenómenos de adsorción, dispersión o ensanchamiento anormal de los picos, o incluso desdoblamiento de picos.

Otra forma de modificar el EOF consiste en la operación a valores ácidos de pH. A valores bajos de pH la mayor cantidad de grupos silanol en el capilar se hallan protonados, es decir, neutros por lo cual ocurre un efecto similar al descrito para los recubrimientos dinámicos.

6.5-Tipos de Electroforesis Capilar

El término de electroforesis capilar engloba diversos modalidades de esta técnica, todas ellas típicamente usadas para analizar una amplia variedad de moléculas considerando aspectos como su tamaño y propiedades químicas. Los diferentes tipos pueden ser agrupados en dos clases:

- ◆ Modalidades sin fenómenos de reparto
- ◆ Modalidades con fenómenos de reparto (cromatográficos)

-Modalidades de electroforesis sin fenómenos de reparto

i-Electroforesis capilar de zona (ECZ).- Este tipo de electroforesis es el más empleado y sus lineamientos y características han sido ya comentados en la sección 6.1.

ii-Enfoque isoeléctrico capilar (EIC).- Esta técnica es ampliamente usada para el análisis de proteínas y péptidos [69-71]. En EIC la muestra es mezclada con una solución de anfolitos que poseen varios grupos o funciones amino y ácido carboxílico. Cada anfolito difiere en cuanto al número de grupos ácidos y básicos que posee con respecto a los demás. A continuación, el capilar es llenado con la mezcla de la muestra y los anfolitos. Un extremo del capilar es sumergido en un ácido (con el ánodo) y el otro extremo es sumergido en una base (con el

cátodo). Posteriormente se aplica un voltaje a través del capilar, lo cual genera un gradiente de pH a lo largo del mismo. Aquellos anfólitos con menor valor de punto isoeléctrico (pI) migran hacia medios ácidos y aquellos con mayor pI migran hacia medios básicos. Las proteínas, que al igual que los anfólitos también son zwitteriones, migran hacia uno u otro electrodo dependiendo de su pI. La proteína detendrá su recorrido cuando alcance la región del gradiente de pH en el capilar igual a su pI. Una vez alcanzada esta condición, la proteína es eléctricamente neutra y por tanto no se ve ya afectada por el campo eléctrico aplicado. Esta técnica es realizada generalmente con un capilar neutro con la finalidad de evitar alteraciones en el gradiente de pH que pudieran ser propiciadas por el EOF.

iii-Electroforesis capilar en gel (ECG).-La mayor parte de los análisis hechos con esta técnica han empleado capilares con recubrimiento permanente con el objeto de minimizar el EOF, ya que de existir éste podría haber un movimiento de la matriz de gel. Primeramente, el capilar es llenado con el gel para crear una matriz a través de la cual las moléculas son "tamizadas". La separación se basa en el tamaño y forma de las moléculas, por tanto, las moléculas más pequeñas encontrarán menos resistencia a migrar a través de la red del polímero por lo que viajarán a una velocidad más rápida. Existen dos tipos de matrices para esta técnica: *geles químicos*, los cuales están covalentemente unidos a la pared interna del capilar y que son usados principalmente para el análisis de oligonucleótidos sintéticos. Por el contrario, los *geles físicos* no están covalentemente unidos al capilar y consisten de redes entrecruzadas de polímeros de dextrán, agarosa, etc. que sirven para llevar a cabo un tamizado molecular.

iv-Isotacoforesis capilar (ITC).-Esta técnica es similar a la de ECZ. La diferencia estriba en que en ITC el ES es discontinuo (en ECZ es continuo). Esto significa que en ITC el ES en el vial localizado en el extremo de inyección del capilar es diferente a aquél del extremo de salida o de detección del capilar. En ITC cada uno de los componentes de la muestra se moverá al detector con la misma velocidad (iso: igual, tacho: velocidad) aunque la movilidad de cada componente y el campo eléctrico de cada zona sean distintos. Un electrolito *líder o guía* es introducido al capilar antes de la muestra. El electrolito líder debe poseer una movilidad superior a la de cualquier componente de la muestra. Un electrolito *terminal* debe ser introducido al capilar después de la muestra y su movilidad debe ser menor a la de cualquier componente de ésta. Tanto los electrolitos líder como terminal así como todos los componentes de la muestra deben ser o bien aniónicos o bien catiónicos. Aquellos iones que tengan idénticas movilidades se separarán para formar zonas individuales. La zona de mayor movilidad determinará la velocidad a la cual el resto de las demás zonas migrarán. El ancho de cada zona es una función de la concentración del componente.

Una de las principales desventajas de esta técnica consiste en que las separaciones no se hacen en forma de picos sino como zonas lo cual implica mayores dificultades para su cuantificación, motivo por el cual se usa principalmente como método de preconcentración.

- Modalidades de electroforesis con fenómenos de reparto (cromatográficos)

i-Cromatografía capilar micelar electrocinética (CCME).- La cromatografía capilar micelar electrocinética se basa en el reparto de los solutos neutros entre una fase móvil (electrolito soporte) y una fase pseudo estacionaria (micelas). Se requiere la adición de micelas al ES para que la separación, principalmente de compuestos neutros, se realice por medio de un proceso de reparto dentro y fuera de las micelas por parte de los analitos. La migración de las micelas se produce por medio de dos fuerzas:

- ◆ Electroforesis: Debido a que las micelas poseen carga, migran bajo la imposición de un campo eléctrico
- ◆ EOF: Esta fuerza ya descrita actúa sobre todas las especies en solución independientemente de sus cargas

La migración electroforética de las moléculas neutras ocurre cuando sucede su reparto con la micela cargada (la cual es considerada como una fase pseudo estacionaria). Naturalmente, aquellos compuestos con mayor carácter hidrofóbico residirán una mayor parte del tiempo dentro de las micelas. Las micelas pueden migrar a favor del EOF o contra éste, lo cual dependerá de la carga de éstas y de la polaridad del sistema.

Para el caso de sustancias cargadas (cationes o aniones) la separación en CCME ya no sólo se basa en un proceso solamente cromatográfico, sino en una combinación de electromigración y cromatografía.

ii-Electrocromatografía capilar (ECC).-Esta técnica tiene varias similitudes con HPLC donde los analitos se reparten entre dos fases. Una de estas fases está fijada en el empaqueo de un capilar o soporte de la columna (fase estacionaria) y la otra fase es continuamente bombeada a través de la columna (fase móvil). En ECC se requiere de una fase estacionaria pero no de bomba. El movimiento de la fase móvil se debe al EOF promovido por la presencia de grupos silanol residuales y la imposición de una diferencia de potencial en una columna, por ejemplo, de C₁₈. La separación de los analitos ocurre por su interacción con la fase estacionaria y su interacción con la fase móvil propicia su migración además de su movilidad electroforética, si es que tienen carga. La suma de estos factores en el movimiento del analito causa mucho menos dispersión en los picos que la que resulta del flujo impulsado mecánicamente por bombas en HPLC.

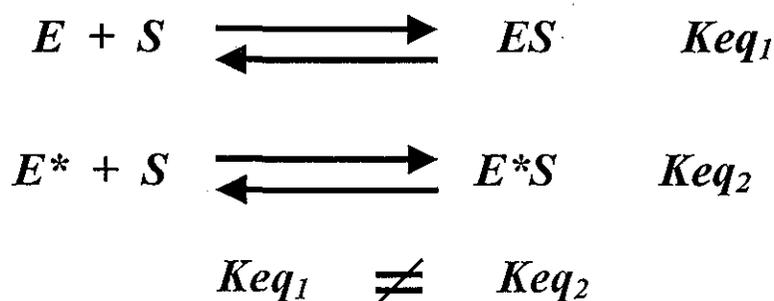
6.6-Necesidad del uso de selectores quirales

Como los enantiómeros son compuestos que poseen propiedades fisicoquímicas idénticas, también poseen la misma movilidad bajo un campo eléctrico aplicado. Esto hace que su análisis sea hoy en día, todo un reto para los químicos analíticos que requieren resolver el problema del análisis de este tipo de compuestos.

La forma más común para crear diferencias entre las movilidades de los enantiómeros es mediante su interacción con compuestos llamados selectores quirales, para formar productos conocidos como diasterómeros.

Como ya se ha mencionado, los diasterómeros son estereoisómeros no especulares y por tanto no enantioméricos. Los selectores quirales son sustancias que pueden interactuar de forma selectiva con los enantiómeros de las mezclas racémicas.

Estas sustancias son a su vez quirales, lo que les permite participar en equilibrios químicos cuyas constantes de equilibrio con cada uno de los enantiómeros poseen valores distintos. El siguiente esquema presenta el equilibrio simplificado de la interacción compuesto quiral-selector quiral, en la cual E y E^* representan a los enantiómeros, S al selector quiral y Keq_1 , Keq_2 a las constantes de formación de las interacciones enantiómero-selector quiral.



Esquema del equilibrio químico entre un par de enantiómeros (E y E^*) y un selector quiral (S).

6.7-Tipos de selectores quirales usados en EC

Existen diversos reportes en los cuales se documenta el uso de varios tipos de selectores quirales en EC tales como ciclodextrinas naturales y cargadas, éteres corona, polisacáridos, proteínas, micelas, antibióticos macrocíclicos y alcaloides [72].

Los antibióticos glicopeptídicos, y los análogos de la ansamicina, kanamicina, estreptomycin, fradiomicina y vancomicina han sido también empleados como selectores quirales [73].

En la tabla 3 se muestra una clasificación general de los tipos más usados de selectores quirales. En ésta se plantean dos subclases en los selectores dividiéndolos entre aquellos presentes en solución, ya sea en el ES o en la fase móvil, y aquellos unidos a un soporte sólido conformando una fase estacionaria.

Tabla 3. Tipos de selectores quirales comúnmente empleados.

Selector en la fase móvil	Selector en la fase estacionaria
<i>EC con fases móviles quirales:</i>	<i>Columnas llenas de gel:</i>
Eteres corona	Con ciclodextrinas
Ciclodextrinas	Albumina de suero bovino
Antibióticos macrocíclicos	<i>Columnas inmovilizadas:</i>
Heparina	Con ciclodextrinas
<i>EC con micelas quirales:</i>	<i>Columnas empaçadas:</i>
Sales biliares	1 α -ácido glicoproteínas
Sal de sodio del N-dodecanoil-L-valinato	Con ciclodextrinas
Sal de sodio de la dodecil-L-alanina	
Digitonina	
Ciclodextrinas con surfactantes	

Como se puede apreciar en la tabla 3, las ciclodextrinas son uno de los tipos de selectores quirales más empleados por lo que a continuación se explicarán sus propiedades con mayor detalle.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7-CICLODEXTRINAS

Las ciclodextrinas (CD's) tal como hoy son conocidas, fueron llamadas celulosinas cuando fueron descritas por primera vez por Villiers [74] en 1891. Posteriormente Schardinger identificó tres tipos de CD naturales la alfa, beta y gama a los cuales se hacía referencia como los "azúcares de Schardinger". Durante 25 años, entre 1911 y 1935, Pringsheim fue uno de los investigadores más prolíficos en la investigación de estos compuestos, demostrando que estos podían formar complejos estables con otros compuestos en soluciones acuosas. Para mediados de la década de los 70's, todas las CD's naturales habían sido caracterizadas estructural y químicamente y se había estudiado la formación de varios complejos más.

7.1- Ciclodextrinas naturales

Las CD's naturales son obtenidas a partir de moléculas de azúcares luego de ser sometidas a la acción de la enzima *ciclodextrina glucosiltransferasa*. Esta enzima es sintetizada por diversos organismos pero el más conocido es *Bacillus macerans*. Estructuralmente las CD's consisten de 6, 7 u 8 unidades de D-glucopiranosil (llamadas α , β y γ respectivamente) conectadas por enlaces α -(1,4) glucosídicos (ver figura 10). El arreglo tridimensional o espacial más estable para estos oligosacáridos no reductores es la de un toroide (ver figura 10) con la presencia de grupos hidroxilo primarios en la abertura más pequeña del toroide e hidroxilos secundarios en la abertura mayor. El interior del toroide es hidrofóbico.

Varios tipos de atracción de carácter débil como fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, atracciones electrostáticas, hidrofóbicas, etc. se ven involucradas en la estabilización de los complejos formados entre la CD y el compuesto de interés. El equilibrio asociado a la formación de estos complejos conocidos como de *inclusión*, depende de la concentración de la CD y la del compuesto interaccionante. Además, la velocidad a la cual se forma este complejo está determinada en gran medida por la accesibilidad de la molécula huésped a la cavidad hidrofóbica de la CD.

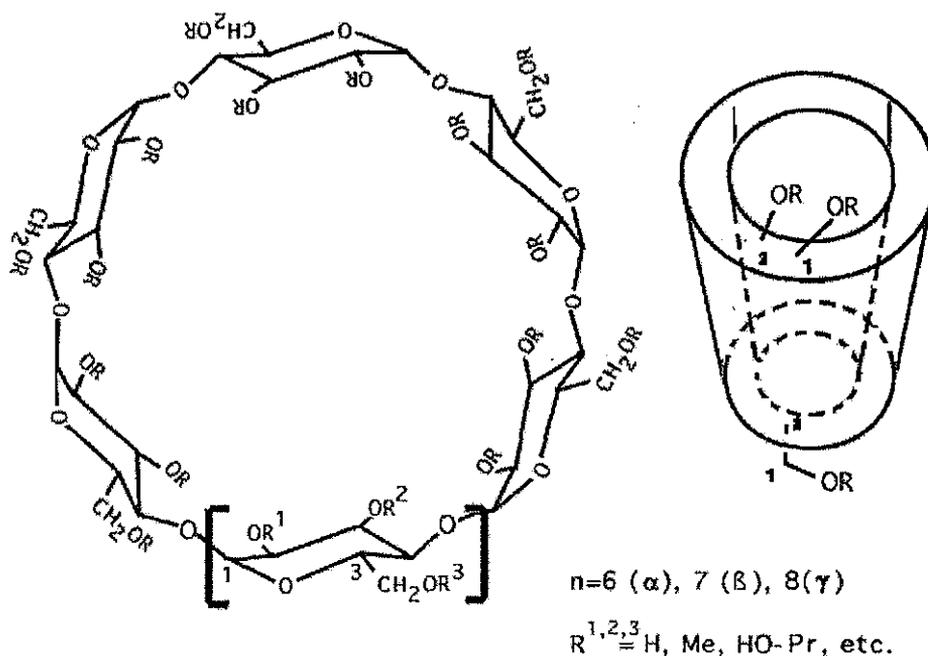


Figura 10. Diagrama esquemático de la geometría de una ciclodextrina.

La accesibilidad de una molécula a la región hidrofóbica de la CD depende de la geometría de la primera y del tamaño de la segunda, de tal suerte que la dinámica de este proceso es sumamente variable considerando la vasta gama de tipos de moléculas existente. Es sabido

que los complejos de CD's con diversos fármacos son formados rápidamente incluso con moléculas con elevado carácter lipofílico ya que aún este tipo de moléculas es en algún grado solvatado con moléculas de agua. La presencia de las moléculas de agua en la molécula lipofílica facilitan el paso de ésta a través de los grupos hidroxilo (polares) situados en la entrada a la región hidrofóbica de la CD; el proceso parece involucrar interacciones entre las moléculas de agua de la molécula lipofílica y los grupos hidroxilo de la CD. Una vez situada la molécula lipofílica en la región hidrofóbica de la CD, las moléculas de agua son expulsadas del ambiente lipofílico permitiendo que la primera adopte su conformación más estable dentro de la cavidad. En los casos en que los compuestos son insolubles el equilibrio de interacción antes descrito puede llevarse horas e incluso días.

Generalmente la disociación del complejo es rápida, casi siempre causada por un repentino incremento en el número de moléculas de agua fuera de la cavidad de la CD. Aún cuando puede haber una barrera energética que impida la disociación del complejo, el gradiente de concentración impulsa la reacción hacia la disociación. Debido a la poca abundancia de moléculas de CD la reformación del complejo se hace poco probable y por tanto el compuesto huésped pasa a su forma libre.

Además de su empleo como seletores quirales, por sus características, las CD's pueden ser empleadas también para incrementar la solubilidad de compuestos pocos solubles, "proteger" a diversos compuestos de las condiciones imperantes de su microambiente o para impartir otras propiedades físicas (aroma, sabor), etc.

7.2- Ciclodextrinas modificadas

No fue sino hasta finales de la década de los setentas cuando diversos investigadores comenzaron a modificar químicamente a las CD's, con la finalidad de eliminar problemas de toxicidad y de solubilidad en éstas. Desde entonces, se han realizados varios trabajos en los que se han introducido diferentes tipos de grupos funcionales en las CD's [75-77].

En teoría, una molécula de CD puede incorporar $3(n)$ sustituyentes, donde n representa el número de unidades de glucopiranososa que constituyen a la CD. El grado de sustitución (GS) de una CD se refiere al número de sustituyentes que posee, los cuales pueden ser del mismo tipo o combinados.

Los diferentes tipos de funciones químicas que pueden unirse químicamente a una CD se hacen reaccionar con los grupos hidroxilo primarios y secundarios de ésta. Debido a que la reactividades de los grupos hidroxilo son diferentes, la reacción produce una mezcla de hasta miles de diferentes formas ópticas y posicionales. Por ejemplo, la hidroxipropil β CD (HP β CD) consiste de una mezcla sumamente compleja de varias formas isoméricas y de varios derivados sustituidos de esta CD. Existen 2,097,151 arreglos posibles para la HP β CD. En el rango de 3 a 11 sustituciones, cada grado de sustitución está relacionado con un número determinado de posibilidades el cual es descrito por la siguiente ecuación:

$$\frac{a!}{(a-b)! b!} \quad (9)$$

donde a es el número de grupos hidroxilo en la β CD y b es el GS. Por ejemplo, para una CD trisustituída existen 1330 posibles formas isoméricas. Cada uno de estos isómeros está

asociado con $2(n)$ isómeros ópticos y dado que cada CD posee 28 carbonos quirales y cada hidropropil β CD añade un carbono asimétrico más, resulta que el número de posibles formas isoméricas puede llegar a ser enorme.

La característica de producir mezclas de múltiples isoformas al modificar a las CD's les confiere propiedades fisicoquímicas importantes a estos compuestos, por ejemplo aquellas asociadas con el aumento de su solubilidad y cambios en su toxicidad.

El GS de una CD es comúnmente determinado por espectrometría de masas (EM) o por resonancia magnética nuclear (RMN), sin embargo, estas técnicas no dan información exacta acerca de la localización de los sustituyentes. Teóricamente, el GS para la α CD es 18, 21 para la β CD y 24 para la γ CD, no obstante, los grupos sustituyentes con sus propios grupos hidroxilo representan oportunidades adicionales de modificación.

7.3- Aspectos teóricos de las separaciones quirales en la Electroforesis Capilar con CD's como selectores quirales (modelos de Wren-Rowe y de Vigh).

Para lograr una separación de naturaleza quiral en presencia de un equilibrio dinámico se requiere que al menos cuatro condiciones sean satisfechas:

- 1.- Que las constantes de equilibrio de cada enantiómero con el selector sean diferentes
- 2.- Que el equilibrio establecido entre enantiómeros y selector quiral implique la formación de cantidades significativas tanto de productos como de reactivos.
- 3.-El equilibrio debe de alcanzarse mucho más rápido que lo que dure la separación.

4.- Las movilidades de los reactivos y de los productos deben ser diferentes, lo cual implica que ya sea la CD o el analito deben estar cargados.

Entre los modelos propuestos para representar los equilibrios químicos en cuestión encontramos el de *Wren y Rowe*. Según éste, para un par de enantiómeros (*A* y *B*) que interactúan con un selector quiral (*C*) se proponen los siguientes equilibrios:



donde μ_1 es la movilidad electroforética del analito libre en solución y μ_2 es la movilidad electroforética del complejo analito-ciclodextrina. K_1 y K_2 son las constantes de formación de los dos complejos. En su forma libre *A* y *B* poseen la misma movilidad electroforética en solución. Se asume que las movilidades electroforéticas de los complejos *AC* y *BC* son las mismas. Si *A* y *B* tienen diferentes afinidades por *C* de tal suerte que K_1 y K_2 son diferentes y las movilidades electroforéticas del par de enantiómeros en su forma libre y como complejo son distintas, entonces es factible la resolución quiral. Si el equilibrio de intercambio del enantiómero *A* entre su forma libre y como complejo es muy rápida entonces la movilidad electroforética aparente de *A* será una función de la proporción del tiempo que permanezca en su forma libre y de la proporción que esté complejado, es decir:

$$\mu_a = \left(\frac{[A]}{[A]+[AC]} \right) \mu_1 + \left(\frac{[AC]}{[A]+[AC]} \right) \mu_2 \quad (10)$$

$$[AC] = K_1[A][C] \quad (11)$$

y por tanto

$$\mu_a = \frac{\mu_1 + \mu_2 K_1 [C]}{1 + K_1 [C]} \quad (12)$$

La diferencia en las movilidades electroforéticas aparentes de A y B viene dada por

$$\Delta\mu = \frac{\mu_1 + \mu_2 K_1 [C]}{1 + K_1 [C]} - \frac{\mu_1 + \mu_2 K_2 [C]}{1 + K_2 [C]} \quad (13)$$

expresión que puede rearrreglarse de la siguiente forma

$$\Delta\mu = \frac{[C](\mu_1 - \mu_2)(K_2 - K_1)}{1 + [C](K_1 + K_2) + K_1 K_2 [C]^2} \quad (14)$$

A partir de la ecuación 14 puede apreciarse que la diferencia en las movilidades electroforéticas aparentes será cero si $K_1 = K_2$ o $\mu_1 = \mu_2$. Pero la diferencia en las movilidades será cero también si $[C] = 0$ o si $[C]$ es muy grande. Esto implica que entre estos dos extremos se hallará un valor de $[C]$ que proporcionará un valor máximo en la diferencia de las movilidades electroforéticas aparentes y por lo tanto un máximo en la separación de ambos enantiómeros. Esta aproximación considera diferencias en movilidades más que resoluciones porque desde el punto de vista matemático, es mucho más complicado establecer ecuaciones que involucren a la resolución además de que debe considerarse el efecto del EOF, la dispersión de las bandas debida a la difusión y otros factores tal como el tipo de introducción de muestra [78].

Este modelo ha sido probado mediante la sustitución de valores probables para los parámetros μ y K en la ecuación 14, y se ha encontrado que entre más grande sea la diferencia en las movilidades electroforéticas de los enantiómeros, más grande es la diferencia entre las constantes de equilibrio. Mediante la generación de curvas teóricas de

diferencias de la movilidad electroforética aparentes en función de la concentración de selector quiral, se ha encontrado que dicha diferencia será mayor cuando la movilidad electroforética del complejo analito-selector quiral sea opuesta a la del analito libre. Esto sugiere que el empleo de selectores quirales con carga opuesta a la del analito podría promover aún más la separación enantiomérica.

Empleando cálculo diferencial y a partir de la ecuación 14 se puede obtener una ecuación que permita obtener la concentración óptima teórica de selector quiral

$$[C]_{opt} = \frac{1}{K_1 K_2} \quad (15)$$

Analizando la ecuación 15, puede observarse que el conocimiento de la magnitud de las constantes de formación puede ser sumamente útil para seleccionar la concentración óptima de selector quiral, además, puede inferirse que, mientras mayor sea la magnitud de las constantes de formación, menor será la concentración óptima de selector quiral y viceversa. La constante de equilibrio K_2 estará asociada a la constante K_1 mediante una razón de proporción, por ejemplo, $K_2 = nK_1$. Combinando las ecuaciones 14 y 15 puede obtenerse otra ecuación que permita el cálculo de la diferencia de la movilidad electroforética aparente a la concentración óptima de selector quiral:

$$\Delta\mu = \frac{(n-1)(\mu_1 - \mu_2)}{(n+1)^2} \quad (16)$$

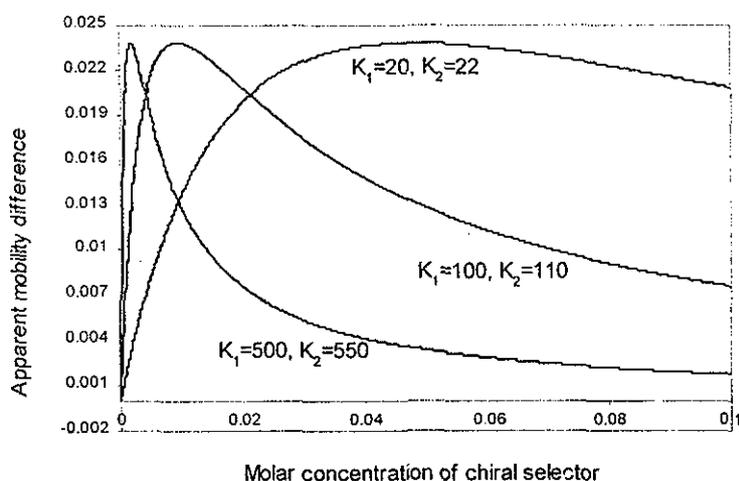
donde n = la razón de proporción entre las constantes K_1 y K_2 .

Puede apreciarse en esta ecuación que la diferencia en las movilidad electroforéticas de dos enantiómeros será grande si el porcentaje de la diferencia entre K_1 y K_2 es grande y la

diferencia en las movilidades entre el analito y el complejo selector quirál-analito es también grande.

Se han encontrado excelentes correlaciones entre las curvas teóricas obtenidas con este modelo y curvas experimentales obtenidas al realizar separaciones quirales de propranolol con β CD y metil β CD [79].

Se asume que las CD's poseen una porción hidrofóbica dentro de su cavidad en la cual se asienta el analito por medio de su región también hidrofóbica. Esto sugiere que la adición de una sustancia como el metanol podría reducir la afinidad del analito por la CD e incrementarla por el buffer, es decir, habría una disminución de la magnitud de las constantes de equilibrio K_1 y K_2 . El que el cambio en las constantes de equilibrio lleve a un incremento o decremento en la diferencia de las movilidades electroforéticas dependerá si la concentración de CD está por arriba o por debajo de su valor óptimo. Esto puede ser mejor observado en la figura 10.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 10. Curvas teóricas generadas mediante la ecuación (14) para diferentes valores de K_1 y K_2 . [80]

Supóngase que se tiene un buffer con una concentración 40 mM de selector quiral y con constantes de equilibrio de $K_1 = 500$ y $K_2 = 550$. Si la adición de metanol al buffer modificara de tal forma los valores de las constantes tal que $K_1 = 100$ y $K_2 = 110$ entonces la diferencia en las movilidades electroforéticas aparentes, y por ende la separación, se incrementaría en un factor aproximado de 3 (ver figura 9). Supóngase ahora que la concentración de selector quiral en el buffer es de 10 mM y que el valor de las constantes de equilibrio son $K_1 = 100$ y $K_2 = 110$ para ambos enantiómeros. Si la adición de metanol cambiara el valor de las constantes de equilibrio tal que ahora $K_1 = 20$ y $K_2 = 22$ entonces la diferencia en las movilidades electroforéticas aparentes disminuiría a casi la mitad del valor original en presencia de metanol, con una disminución concomitante en el nivel de separación. La correlación entre los resultados obtenidos aplicando este modelo respecto a la función de los disolventes orgánicos en la separación enantiomérica, ha sido excelente frente a los resultados experimentales obtenidos durante la separación quiral de propranolol en presencia de metanol y acetonitrilo [80].

En resumen, se puede concluir que una vez seleccionada una CD apropiada y un valor de pH, la concentración óptima de CD puede ser conocida si las constantes de equilibrio de ambos enantiómeros con la CD son conocidas. Sin embargo, esta aproximación puede ser aplicada si se cumplen las siguientes condiciones:

- Se asume que la estequiometría de los complejos es 1:1. La simplificación de complejos de orden superior puede llevar a errores significativos en los resultados, por lo tanto, es importante determinar con exactitud la estequiometría.
- La constante de equilibrio de cada complejo debe de ser conocida o calculada experimentalmente. Otros equilibrios asociados tales como aquellos relacionados a

las propiedades ácido-base del analito (pK_a), deben conocerse o calcularse experimentalmente. Esto significa que más de un equilibrio podrían influir en el sistema (interacción de la CD con las formas protonada y no protonada del analito). Entonces, el sistema puede ser descrito como un equilibrio aparente y por tanto la constantes aparentes de equilibrio pueden ser calculadas.

Una limitación importante asociada al cálculo de las constantes de equilibrio de estos sistemas es el tiempo que dichos procedimientos implican, ya que varias concentraciones de CD deben de ser probadas, además de que se deben hacer cálculos de la concentración de CD en su forma libre. Adicionalmente a esto, es menester realizar mediciones experimentales de los cambios de viscosidad relacionados con los incrementos de la concentración de CD para poder hacer correcciones en los datos de movilidad.

Por otra parte, *Vigh y colaboradores* [81-83] han desarrollado varios modelos basados en equilibrios ácido-base para la separación enantiomérica de ácidos y bases débiles con propiedades quirales, como una función del pH y de la concentración de β CD. Este tipo de modelos reconoce tres diferentes casos cuando se emplean CD's en separaciones quirales:

- i) En separaciones desionoselectivas, sólo el enantiómero no disociado interactúa selectivamente con la CD.
- ii) En separaciones ionoselectivas, sólo el enantiómero disociado interactúa selectivamente con la CD.
- iii) En separaciones duoselectivas tanto la forma no disociada como la disociada del enantiómero interactúan con la CD.

Si se toma como referencia esta teoría, entonces es posible obtener separaciones quirales exitosas con CD's incluso a valores de pH lejanos al valor de pKa del analito (separaciones tanto ionoselectivas como duoselectivas) o bien a pH's cercanos del valor de pKa del analito (separación desionoselectivas). Esto significa que, empleando tres valores diferentes de pH, uno superior, otro inferior y el otro igual al pKa, es posible obtener cierto grado de separación siempre y cuando se use una CD selectiva para el analito. Esto de alguna forma proporciona una idea acerca del rango de pH al cual determinada CD posee un carácter selectivo para los isómeros del analito. Sin embargo, es recomendable realizar una posterior optimización de las condiciones probadas.

Estas dos teorías pueden considerarse como una herramienta muy útil para entender el proceso que ocurre durante una separación quiral. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, existen limitaciones y varias restricciones para llevar a cabo aplicación, además de que no es sencillo aplicarlos cuando el número de analitos que debe analizarse sea grande.

8-ANTIMICÓTICOS

Fue en la década de los 60's cuando se descubrió la griseofulvina, primer medicamento empleado de manera sistemática para el tratamiento contra los dermatófitos. A partir de entonces, pero sobre todo durante los últimos 20 años, se han descubierto una gran cantidad de compuestos con esta aplicación. Las enfermedades causadas por hongos son muy comunes en pacientes que tienen muy dañado su sistema de defensa o inmunológico como es el caso de los enfermos de SIDA, o que han estado ingiriendo fármacos, antitumorales, o bien, han sido sometidos a terapias con radiación. También aparecen en pacientes tratados con hormonas esteroideas, como el cortisol, en sujetos con diabetes y en quienes han seguido tratamientos antibióticos durante mucho tiempo. A estas micosis se les conoce como "Oportunistas" [84].

En México la mayor parte de este tipo de infecciones ocurren en piel y pulmón, la tiña de los pies y uñas predominan en forma importante, la candidiasis tegumentaria es la segunda micosis de importancia, las infecciones en pliegues cutáneos, uñas, vulvovaginitis y balanitis son las formas más frecuentes [85].

8.1-Clasificación de los antimicóticos

Los antimicóticos se clasifican en 5 grupos principales: Azoles, Polienos Flucitosina, Griseofulvina y algunos productos químicos que por sus propiedades han demostrado ser útiles en la terapia antimicótica. De estos, el grupo de los azoles es uno de los más

importantes. Dentro de este grupo, existe una amplia gama de antimicóticos y su clasificación se basa primordialmente en su modo de acción, su origen y estructura molecular. El avance de los nuevos fármacos ha abierto un gran campo de investigación que constituye todo un reto en el tratamiento de las micosis y en la lucha para su erradicación.

Desde 1940, los azoles han ocupado un papel muy importante dentro de la quimioterapia antimicótica para tratamientos de micosis tópicas (miconazol, clotrimazol) y ha mejorado notablemente con la introducción de antimicóticos orales de uso sistémico (ketoconazol).

Diversas investigaciones han producido una serie de nuevos productos efectivos, (fluconazol y sertaconazol, por ejemplo) algunos incluso, aún están en proceso de prueba, con el fin de disminuir su toxicidad hacia los seres humanos y mejorar el tratamiento.

Los azoles se dividen en dos grupos: los derivados del imidazol y los derivados del triazol, (ver Tabla 4), el modo de acción es generalmente el mismo para los dos grupos, sólo los diferencia el desarrollo de su historia, sus características y principalmente su vía de administración.

Tabla 4 Clasificación de los azoles.

<i>Derivados del Imidazol</i>	<i>Derivados del triazol</i>
Bifonazol	Fluconazol
Butoconazol	Itraconazol
Clotrimazol	Terconazol
Econazol	Vibunazol
Fenticonazol	
Isoconazol	
Ketoconazol	
Lombazol	
Miconazol	
Oxiconazol	
Sulconazol	
Tioconazol	

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

8.2-Química de los antimicóticos imidazólicos

Como puede observarse en la figura 12, la característica más común e importante de este tipo de compuestos es la presencia de un grupo heterocíclico de cinco sustituyentes conocido como *imidazol* (de ahí el nombre genérico de estos antimicóticos). Puede notarse en estas estructuras cuáles son las porciones que les confieren las propiedades ácido-base a estas moléculas (identificadas por el átomo de hidrógeno en rojo). En todos los casos, el nitrógeno ubicado en la posición 3 del grupo imidazol es el que le imparte su papel de base débil a estos compuestos, aunque cabe mencionar que en el caso del ketoconazol, el nitrógeno de la posición 4 de la piperazina (pK_{a2}) representa una segunda región con propiedades del mismo tipo. Algunas características químicas y físicas de estos compuestos son mostradas en la tabla 5.

8.3-Mecanismo de acción

Las investigaciones, indican que los azoles inhiben una serie de reacciones-citocromo P450 dependientes, inhibiendo a la enzima 14α -desmetilasa, la cual se encarga de transformar lanosterol a ergosterol. La supresión de ergosterol altera la composición de la membrana celular y por consiguiente detiene el crecimiento en las células micóticas. La 14α -desmetilación de los esteroides depende del citocromo P-450 y esta supresión resulta de la interacción entre el nitrógeno del azol (presente en imidazoles y triazoles) y la porción hemo del citocromo P-450 del hongo.

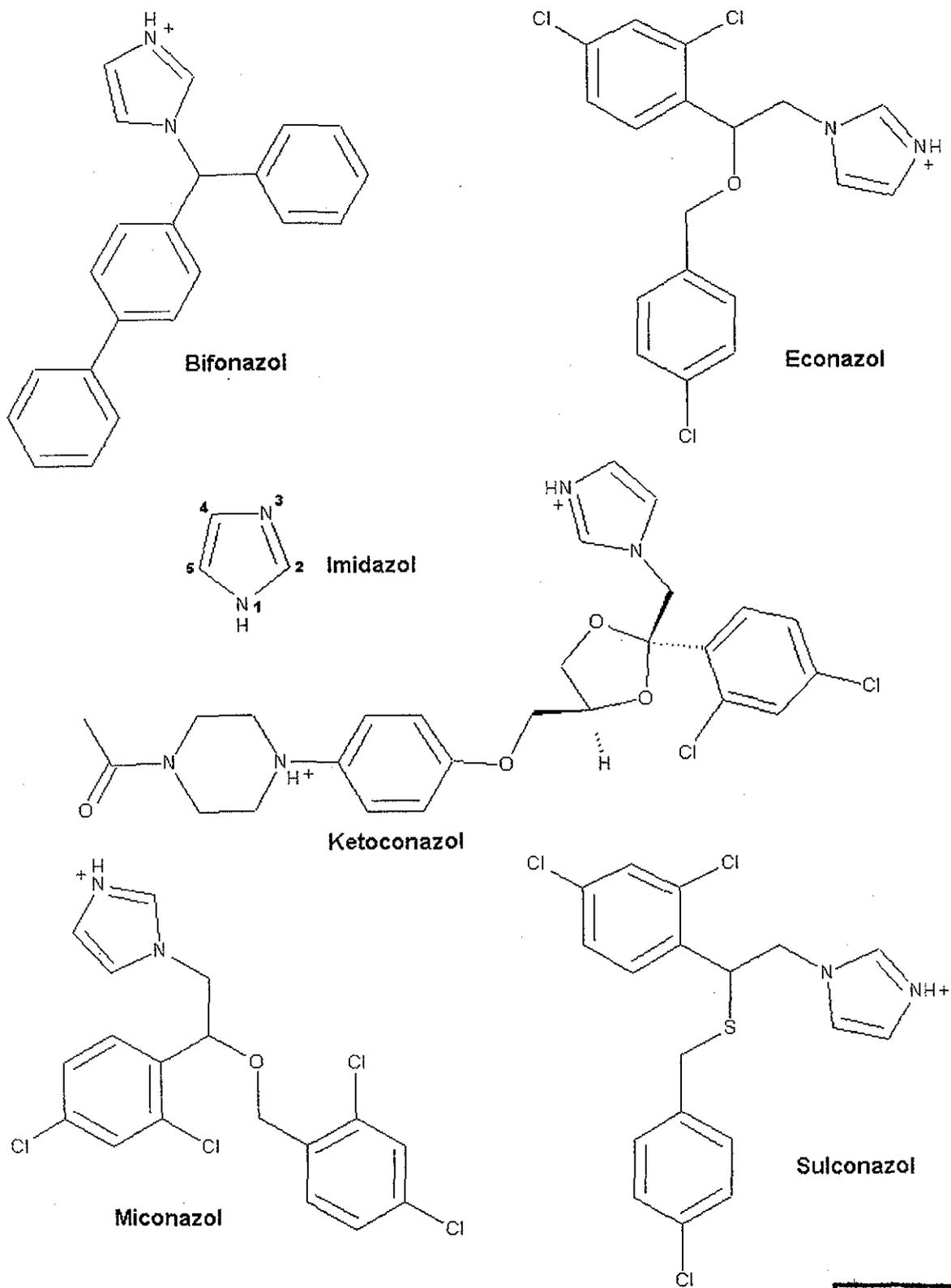


Figura 12. Estructuras de derivados del imidazol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 5. Propiedades físicas y químicas de derivados del imidazol.

Compuesto	<i>Bifonazol</i>	<i>Econazol</i>	<i>Ketoconazol</i>	<i>Miconazol</i>	<i>Sulconazol</i>
pKa ₁	6.55 ± 0.22	6.69 ± 0.12	6.54 ± 0.12	6.67 ± 0.12	6.56 ± 0.12
pKa ₂			5.41 ± 0.6		
Solubilidad	Agua: <0.1mg/100ml	Agua: insoluble	Agua: casi insoluble	Agua: insoluble	Agua: insoluble
P.M.(g/mol)	310.39	381.7	531.4	416.1	407.82
P.H.(°C)	142	86.8	146	135	132

Los imidazoles o triazoles bloquean el sitio normalmente ocupado por el oxígeno a la porción heterocíclica de la molécula, inhibiendo la acción de la enzima C-14 demetilasa, y evitando la 14-desmetilación del lanosterol.

La biosíntesis de ergosterol se divide en cuatro etapas: a) formación de ácido mevalónico; b) polimerización del ácido mevalónico para la formación del escualeno; c) ciclización a lanosterol y d) modificación de lanosterol a ergosterol. Las cuatro etapas de la biosíntesis de ergosterol pueden servir de blanco potencial para las drogas antimicóticas [86].

8.4-Efectos adversos del uso de antimicóticos imidazólicos

En muchos casos la aplicación cutánea de antimicóticos azólicos genera eritemas a nivel local, ardor local, a veces sensación quemante y comezón.

El uso prolongado de varios antimicóticos derivados del imidazol, por ejemplo el ketoconazol y el clotrimazol ha sido asociado a la aparición de casos de hepatitis, provocada principalmente por una elevación asintomática de los niveles de algunas enzimas hepáticas por encima del 50% de los niveles normales (se ha encontrado hasta una

incidencia del 14% en una población de 1000 pacientes [87]. Sólo se ha reportado un pequeño número de casos en que la ingestión de este tipo de medicamentos haya tenido consecuencias letales, y la mayoría de estos seguramente están asociados a la prolongación del tratamiento aún cuando no existiera evidencia de micosis. Estudios recientes sugieren la posibilidad de revertir daños hepáticos tan sólo con detener el tratamiento a base de este tipo de compuestos, pero su prolongamiento podría también estar asociado a daños incluso más serios que aquellos de naturaleza hepática [88].

Aunque raros, se han reportado algunos casos de anafilaxis (hipersensibilidad de un organismo animal a una proteína extraña después de una primera inyección de la misma), luego del primer suministro de ketoconazol. La administración de ketoconazol por vía sistémica, presenta un potente efecto teratogénico en animales, de ahí que no se recomiende tomarlo durante el primer trimestre del embarazo en humanos.

9-PARTE EXPERIMENTAL

9.1-Equipo y reactivos

Todas las mediciones se llevaron acabo en un equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ, Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), utilizando capilares de sílice fundida de 50 μm de diámetro interno, 60.3 cm de longitud total (50.1 cm long. efectiva) y en algunos experimentos se emplearon capilares con recubrimientos neutros de alcohol polivinílico y poliacrilamida con las mismas dimensiones que los capilares anteriores adquiridos de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA).

Entre los reactivos utilizados están el bromuro de N-Cetil-N,N,N-trimetil amonio, CTAB (Merck, Darmstadt, Germany). α , β y γ cyclodextrinas (αCD , βCD y γCD); metil, dimetil e hidroxipropil β cyclodextrinas (M βCD , DM βCD e HP βCD); α , β y γ ciclodextrinas altamente sulfatadas (HS αCD , HS βCD y HS γCD) de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA); trietanolamina, econazol, nitrato de sulconazol, bifonazole de SIGMA CHEMICAL CO., (St. Louis, MO, USA); miconazol y ketoconazol donados por Janssen Pharmaceutical (Huejotzingo, Puebla, México).

Los ácidos fosfórico, acético, benzoico, bórico, cítrico, oxálico, fórmico, clorhídrico y tartárico así como el hidróxido de sodio fueron adquiridos de J.T.Baker (Xalostoc, Edo. de México, México).

Mycospor polvo cada 100 g contienen 1 g de bifonazol (BAYER DE MEXICO, S. A. de C.V.)

Neomicol solución cada 100 ml de solución contienen 2 g de nitrato de miconazol (MEDIX, S.A. de C.V.)

9.2-Metodología general

El electrolito soporte (ES) utilizado, buffer de fosfatos, se preparó adicionando la cantidad adecuada de NaOH 0.1 M a una solución de ácido fosfórico hasta alcanzar el pH requerido y que al aforar al volumen total la concentración de buffer fuera de 30 mM.

Al inicio del día el capilar fue siempre preconditionado utilizando lavados de NaOH 0.1 M, agua y ES, 10, 5 y 5 minutos respectivamente aplicando una presión de 20 psi en cada lavado. Entre corridas se realizaron lavados de 2 minutos a 20 psi con ES seguidos por llenados del capilar durante 1 minuto a 20 psi con la CD seleccionada. La introducción de la muestra se hizo de forma hidrodinámica durante 5 segundos a 0.5 psi y la separación se realizó aplicando un campo eléctrico de 30 kV. La detección de todos los antimicóticos se llevó a cabo a 200 nm, y la temperatura del capilar se mantuvo constante a 15 °C durante todas las mediciones.

Para la separación (aquiral) de la mezcla de antimicóticos al ES utilizado se le adicionó la cantidad adecuada de surfactante para obtener la concentración deseada de CTAB y, por supuesto, se omitió el paso del llenado del capilar con CD.

Las soluciones estándar de los antimicóticos con las cuales se realizaron varios de los análisis para optimizar los factores experimentales estudiados durante las separaciones quirales, fueron preparadas acidificando el medio de disolución (agua) debido a que estos

compuestos en general poseen baja solubilidad y requieren pH's ácidos para estar protonados y por ende en disolución. En algunos casos, igualmente para experimentos en que se realizaron separaciones quirales, se prepararon estándares de los antimicóticos en presencia CTAB 10 mM ya que previas pruebas de solubilidad demostraron la eficacia de este surfactante para solubilizar a todos estos compuestos, incluso, estando todos ellos mezclados tal como se requirió para los experimentos de la separación aquiral.

Las muestras de las presentaciones comerciales fueron preparadas de la siguiente forma:

Se pesó la cantidad adecuada de "*Mycospor*" polvo para preparar 50 ml de una solución 8×10^{-4} M, antes de aforar se mezcló el polvo con 40 ml de una solución de CTAB 10 mM y se disolvió mediante agitación y con ayuda de un sonicador, posteriormente se filtró y la solución resultante fue completada hasta 50 ml con CTAB 10 mM en un matraz aforado. Con esta solución se hicieron los experimentos de separación quiral del bifonazol.

Debido a que la presentación comercial del miconazol se hallaba en solución, entonces, simplemente se tomó el volumen adecuado de *Neomicol* para preparar también una solución 8×10^{-4} M y posteriormente se aforó a 50 ml con CTAB 10 mM y se introdujo directamente al equipo de electroforesis capilar.

Para obtener las muestras de heces y orina se administró oralmente *Nizoral* 200 mg una vez por día durante 3 días a dos animales de estudio: una rata y un ratón con la finalidad de detectar cualitativamente la presencia de este antimicótico. La presentación comercial de este medicamento es en tabletas, por lo cual se pulverizaron tres de éstas, se obtuvo un promedio luego de pesar 10 de ellas y se preparó una solución con una bebida azucarada pesando una cantidad específica del medicamento para que la concentración final de éste fuera la adecuada para poder ser suministrada tanto a la rata como al ratón de acuerdo a su

peso y considerando el valor de la dosis letal media de ketoconazol ($DL_{50} = 166 \text{ mg/Kg}$). Se suministraron 0.5 y 3.5 ml de la solución preparada al ratón y la rata respectivamente una vez por día durante tres días, con lo cual los animales tomaron aproximadamente un tercio de la DL_{50} del antimicótico. Una vez suministrado el medicamento, se colectaron muestras de orina y de heces de ambos animales durante diez días contados a partir del día siguiente en que se dio el primer suministro. Posteriormente, las muestras de heces colectadas fueron pretratadas antes de introducir las al sistema de electroforesis capilar extrayendo éstas en una solución de CTAB 10 mM y luego separando los sólidos insolubles por medio de un proceso de filtración. Las soluciones obtenidas fueron introducidas al equipo de electroforesis capilar. Con respecto a las muestras de orina, éstas fueron introducidas directamente sin tratamiento previo.

10- DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

10.1-Optimización del tipo y concentración de buffer, temperatura de capilar y voltaje de separación

Los primeros experimentos se realizaron con los principios activos miconazol y ketoconazol del total de los cinco antimicóticos derivados del imidazol utilizados en todo nuestro estudio. Como podemos observar en la figura 12 y en la tabla 5, la molécula de miconazol posee un grupo amino con propiedades ácido-base cuyo valor de pKa calculado* es aproximadamente de 6.7, mientras que el ketoconazol posee dos grupos ionizables cuyos valores de pKa son 6.5 y 5.4. Esto nos sugiere que bajo la influencia de un campo eléctrico, estas moléculas se comportarán como cationes, si el pH del medio en que estén disueltas es lo suficientemente ácido ya que en estas condiciones adquirirán cargas positivas. Por lo anterior, el pH al que se llevaron a cabo los primeros experimentos fue de 4.7 asegurando de esta forma que los analitos estuvieran protonados (dados sus valores de constantes de ionización) y así propiciar su electromigración hacia el cátodo (polaridad normal) y por ende su detección.

Estos experimentos preliminares se llevaron a cabo empleando un detector de arreglo de diodos con el fin de obtener los espectros de absorción de dos de los antimicóticos estudiados, ketoconazol y miconazol (ver figura 12) y así determinar sus longitudes de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{máx}}$). En los análisis subsecuentes las detecciones se llevaron a cabo

(*) Los valores de pKa de estas moléculas al no estar reportados experimentalmente se calcularon teóricamente por medio del software ACD/Labs™.

con un detector de luz ultravioleta (UV) a una λ fija de 200 nm, asumiendo que, dadas las similitudes de los espectros de absorción obtenidos para el ketoconazol y el miconazol (ver figura 13), y considerado las semejanzas en las estructuras moleculares de los cinco derivados del imidazol, el resto de los antimicóticos (bifonazol, econazol y sulconazol) tendrían igualmente, una absorción máxima a $\lambda_{\text{máx}} = 200$ nm o muy cercana a este valor.

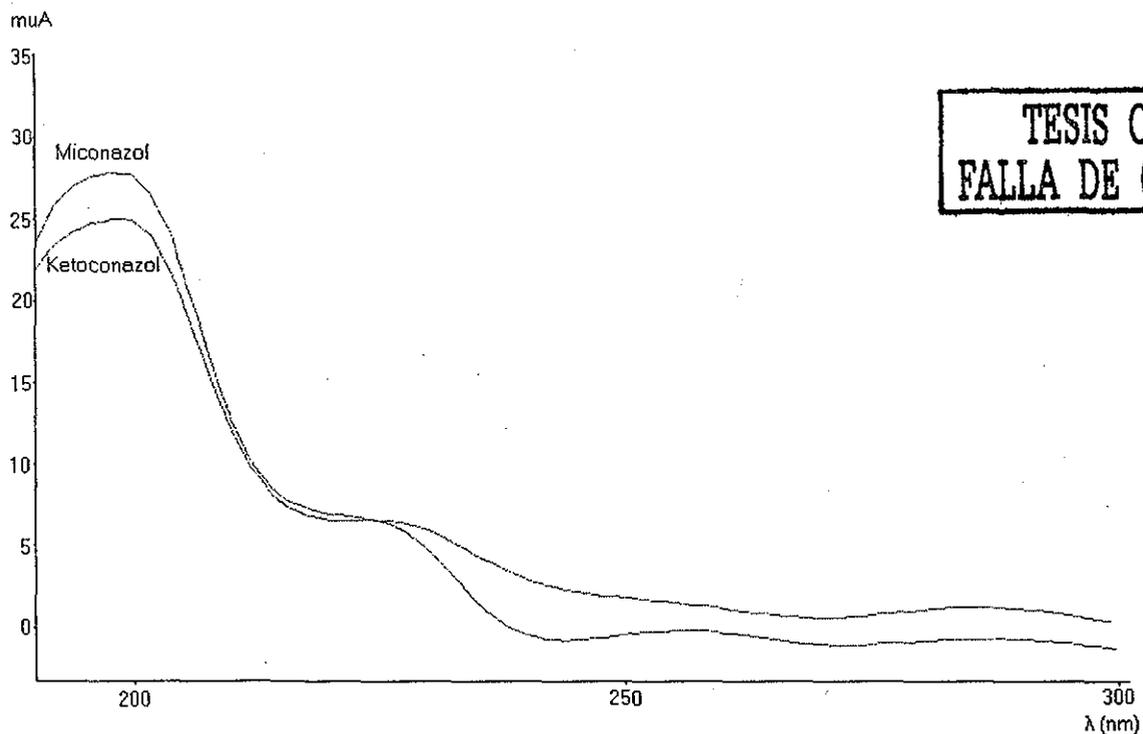


Figura 13. Espectros de absorción de ketoconazol y miconazol obtenidos con un detector de arreglo de diodos en buffer de fosfatos 30 mM, pH 4.7.

10.1.1-Efecto del tipo de buffer en la separación de una mezcla de miconazol, ketoconazol y acetona

El efecto de la naturaleza del buffer (ES) en el perfil del electroferograma para la separación de miconazol, ketoconazol y acetona como marcador neutro, fue estudiado utilizando primeramente los buffers de fosfatos, acetatos, formiatos y tartaratos (figura 14)

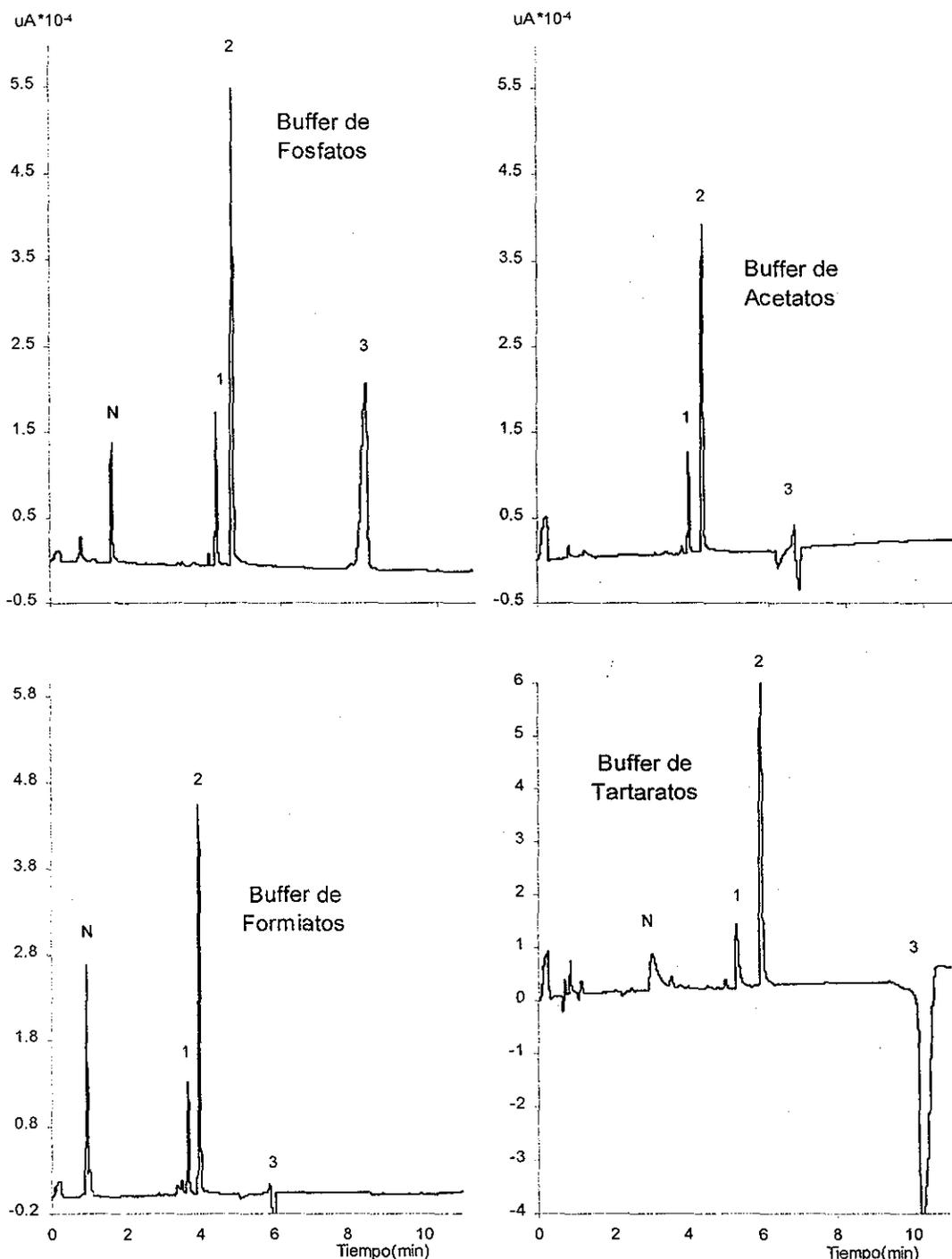
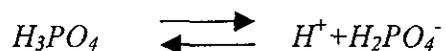


Figura 14. Efecto del tipo de buffer en la separación de: Miconazol (1), Ketocanazol (2) y acetona (3). N = desconocido. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 60.2 cm de longitud total (50 cm de longitud al detector), 50 μm de diámetro interno, inyección por inlet a 0.5 psi de presión durante 5 segundos, 20 kV de voltaje aplicado, polaridad normal, 15°C, detección a 200 nm. Electrolitos soporte utilizados: Buffer 30 mM, pH 4.7 de las composiciones descritas en la figura.

todos a una concentración 30 mM. Como puede apreciarse en esta figura, el buffer de fosfatos proporcionó mejores resultados en cuanto a la forma y altura de los picos obtenidos, esto es, los perfiles tanto de la línea base como de absorbancia, la eficiencia y la simetría de los picos de los compuestos analizados fueron comparados con los de otros buffers. De hecho, sólo en este buffer la acetona presentó una absorbancia mucho mayor a la del solvente empleado. El que un buffer presente poca o nula absorción es un hecho deseable si consideramos que éste es uno de los criterios a evaluar cuando se debe elegir entre un grupo de buffers. Por tanto, la baja absorción del buffer de fosfatos resultó más conveniente para la separación llevada a cabo ya que la absorbancia obtenida de los antimicóticos presentes en solución fue máxima. El que se hayan detectado los picos de los dos antimicóticos a tiempos de migración menores que el del marcador neutral (acetona), bajo las condiciones empleadas, confirma que ambos compuestos se comportan como cationes al pH impuesto y que los vectores de fuerza de sus movilidades electroforéticas están orientados en dirección al cátodo. Aun cuando en todos los buffers la dirección a la que viajaron los cationes fue la misma, se halló que los analitos migraron a diferentes tiempos, lo cual pone de manifiesto la influencia del tipo de buffer en la magnitud de las movilidades electroforéticas de los analitos por lo que éste fue otro factor importante en la selección del buffer más adecuado. Debido a la naturaleza diferencial de cada uno de los electrolitos soporte utilizados, también se les asocia diferencias en sus fuerzas iónicas [89], ya que al disociarse contribuyen con diferentes especies iónicas al medio, situación que también afecta a las movilidades electroforéticas de los analitos.

Experimentalmente se observó que las movibilidades de los analitos fueron disminuidas en aquellos casos en que los buffers aumentaron su fuerza iónica comparando, por ejemplo, los electroferogramas del buffer de fosfatos y el de tartaratos (figura 13).

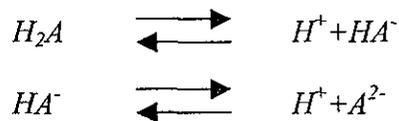
Para el buffer de fosfatos, la fuerza iónica queda definida por el equilibrio siguiente:



El cual genera dos especies iónicas. A pH 4.7 este equilibrio predomina, ya que aún cuando el ácido fosfórico posee otros dos valores de pKa (7.21 y 12.32), estos son básicos y por tanto no predominan con sus equilibrios de disociación a pH's ácidos. Por medio de la siguiente ecuación que permite el cálculo de la fuerza iónica:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n C_i Z_i^2 \quad (17)$$

donde I es la fuerza iónica del medio, C es la concentración del ion y Z es la carga de éste, se obtiene una $I = 0.075M$ para este buffer. Para el caso del ácido tartárico, se conocen dos valores de pKa (3.04 y 4.37) que a pH 4.7 favorece los siguientes equilibrios:



Puede observarse que estas reacciones involucran la presencia de tres especies iónicas, mismas que al considerar en la ecuación (17) resultan en un valor de $I = 0.09M$, lo cual explica las diferencias en cuanto a fuerza iónica entre estos dos amortiguadores.

En la figura 14 se presentan los resultados de otros tres tipos de buffer probados en idénticas condiciones a las anteriores. Es notable la gran absorción que exhibieron los mismos, incluso, por arriba de los valores de aquellas debidas a la acetona y los dos

antimicóticos (picos negativos). Por lo tanto, estos buffers con elevadas absorciones quedaron inmediatamente descartados.

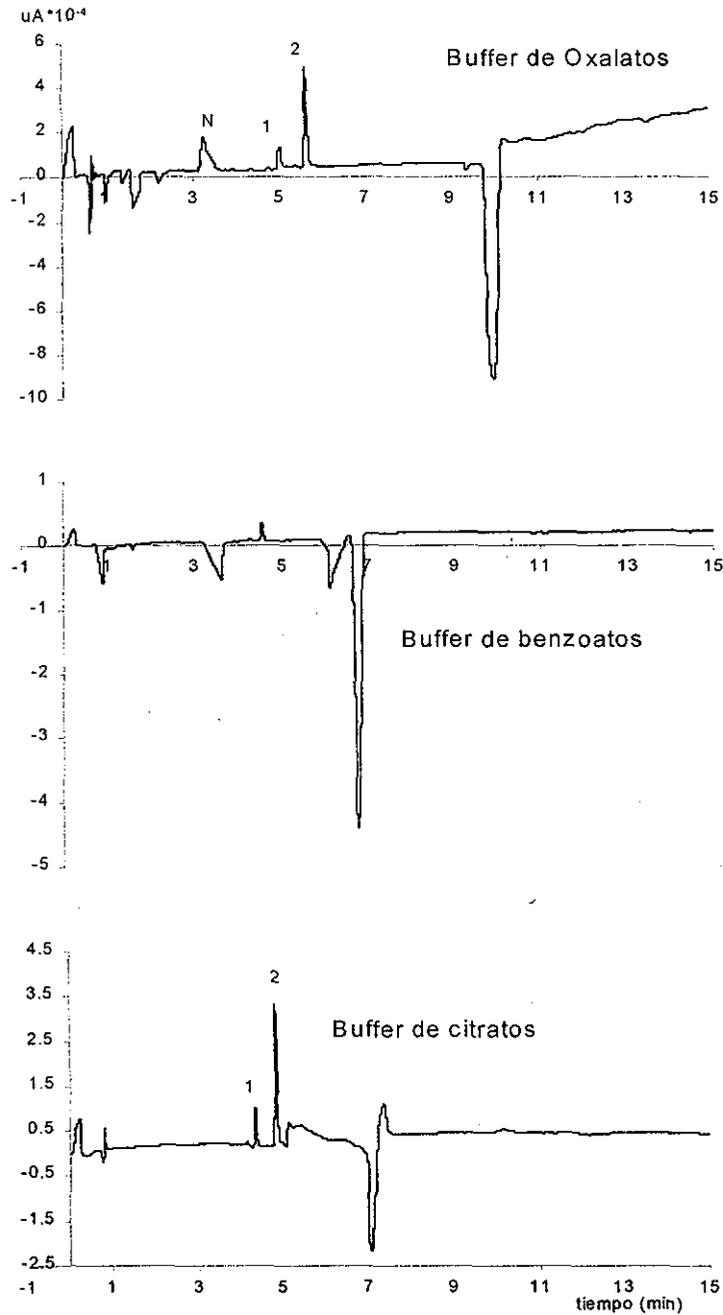


Figura 15. Efecto del tipo de buffer en la separación de: 1-Miconazol, 2-Ketocanazol y 3-acetona. Condiciones: las mismas que las de la figura 14.

En base a los electroferogramas obtenidos, se puede decir que la calidad de la separación así como la magnitud en la movilidad electroforética de los analitos, son características que están relacionadas estrechamente con el tipo de buffer empleado durante la separación, influyendo aspectos como la fuerza iónica y la viscosidad, factores que se conoce tienen repercusión en el potencial zeta del sistema (ver sección 6.3). Por todo lo anterior, se eligió para hacer los siguientes experimentos al buffer de fosfatos.

10.1.2-Efecto de la concentración del buffer en la separación de una mezcla de miconazol, ketoconazol y acetona

Después de la elección del buffer de fosfatos como el más adecuado, se procedió a hacer el estudio de la influencia de la concentración del buffer en la calidad de la separación. En la figura 15 aparecen los resultados del experimento que consistió en llevar a cabo una serie de separaciones de los antimicóticos ketoconazol y miconazol en buffer de fosfatos de diferentes concentraciones, con la finalidad de seleccionar la concentración óptima del electrolito soporte a emplear.

Los electroferogramas con mejores eficiencias a tiempos de análisis razonables se obtuvieron a concentraciones de 30 y 40 mM. A concentración 40 mM de fosfatos se observó un electroferograma muy semejante al obtenido a 30 mM, pero con el inconveniente de que el valor de la corriente se incrementó de manera importante (aproximadamente 270 μA), por lo tanto, se eligió como concentración óptima la de 30 mM. A concentraciones superiores a 40 mM, 50 mM en este caso, se observó que el valor de la corriente se excedió demasiado (aproximadamente 300 μA), hasta un 25% más a la

correspondiente a 30mM, lo cual no se consideró conveniente por mucho que se ganara en cuanto a resolución, debido a las alteraciones que pueden ocurrir en el perfil de los electroferogramas debido al calentamiento de Joule generado.

Cuando se usó el buffer a bajas concentraciones como 10 y 20 mM, se apreció experimentalmente que el principal inconveniente consistió en que se obtuvieron picos con menor eficiencia, resolución y altura para los dos antimicóticos y la acetona. Al analizar los cuatro electroferogramas de la figura 16, se puede apreciar que existe una relación entre el incremento de la concentración del buffer y el nivel de resolución alcanzado, siendo ésta directamente proporcional, es decir, a medida que se aumentó la concentración (fuerza iónica del medio) también lo hizo la resolución entre el ketoconazol, miconazol y acetona. De la misma forma es el efecto en la eficiencia (N) en la separación al incrementar la fuerza iónica del buffer, aspecto que es más fácilmente identificable en la gráfica de la figura 17 en donde puede notarse que el valor de N (o número de platos teóricos el cual depende de la longitud de la columna o capilar y de la altura del plato teórico) se incrementó a medida que se aumentó la concentración del buffer para todos los casos.

Aun cuando a concentraciones 10 y 20 mM se obtuvieron tiempos de migración menores a los correspondientes a 30 mM para todos los analitos, el tiempo de análisis aún es razonablemente corto (aproximadamente 6 minutos) con la ventaja obtenida a nivel de resolución y eficiencia en comparación con concentraciones más bajas, por lo que se eligió 30 mM como concentración óptima de buffer.

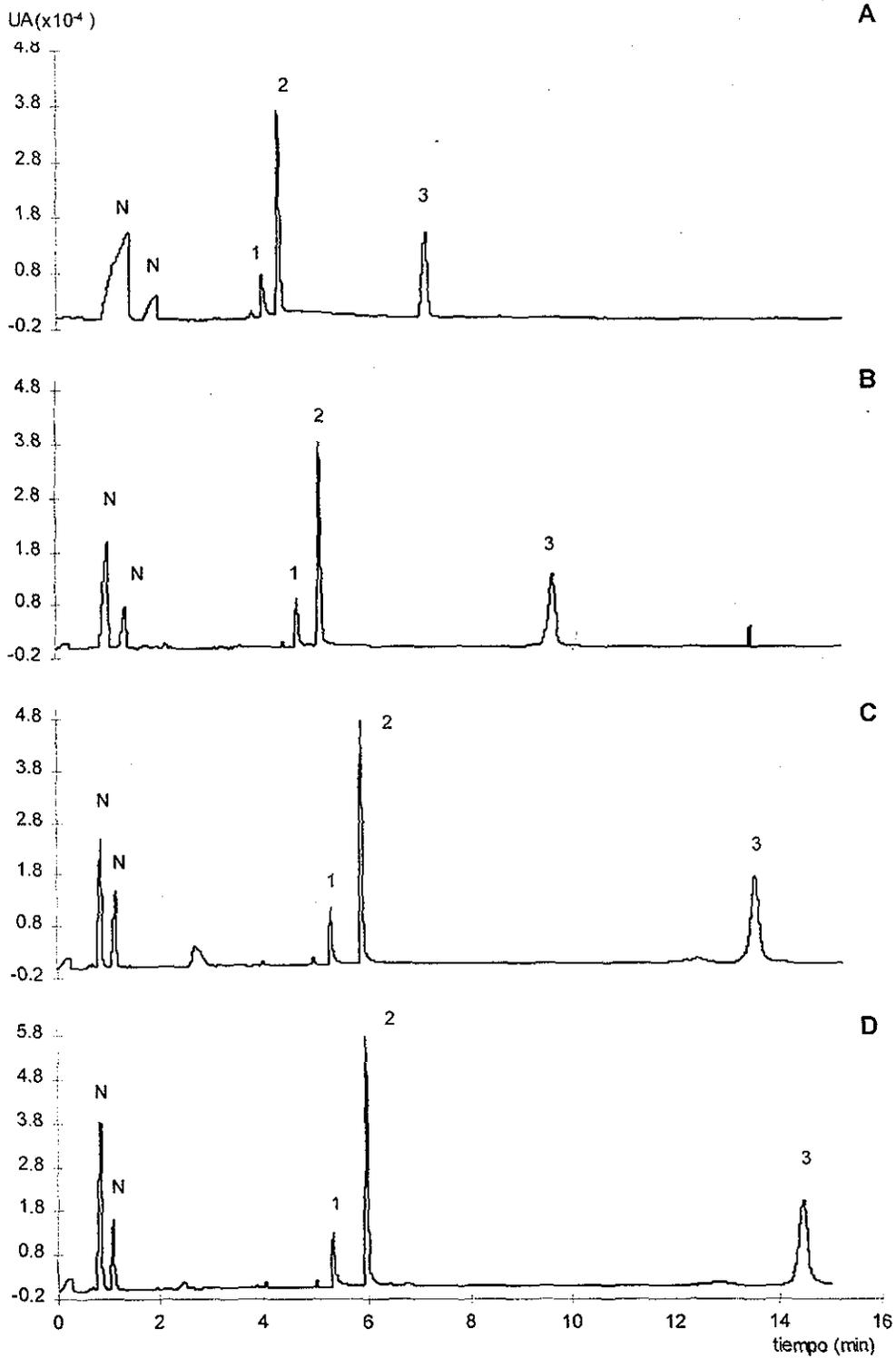


Figura 16. Influencia de la concentración del buffer de fosfatos en la separación de dos antimicóticos: Miconazol (1), Ketoconazol (2), Acetona (3), N = desconocido. A = 10 mM, B = 20 mM, C = 30 mM y D = 40 mM. Condiciones: las mismas que en la figura 13.

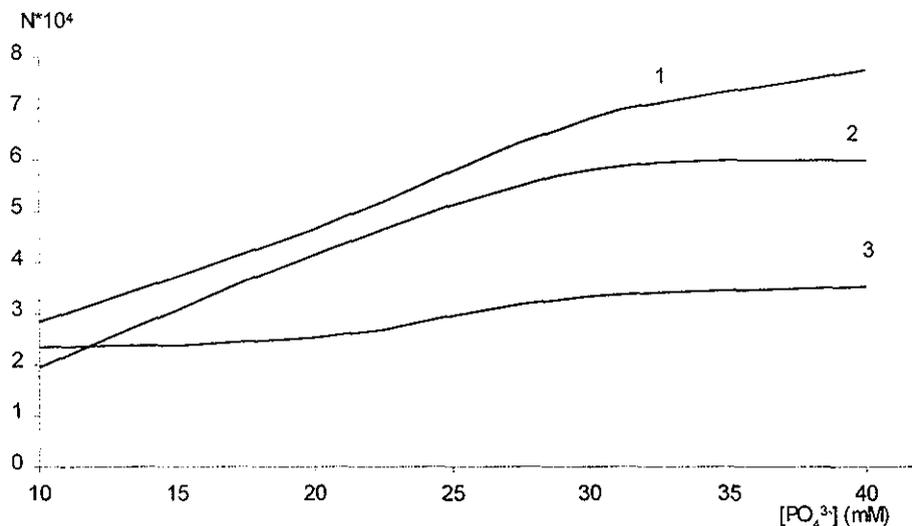


Figura 17. Efecto de la concentración del buffer de fosatos pH 4.7 en la eficiencia de la separación de 1-ketoconazol, 2-miconazol y 3 acetona como marcador neutro. Condiciones: las mismas que las de la figura 13.

10.1.3-Efecto de la temperatura del capilar en la resolución enantiomérica de miconazol

Un parámetro de suma importancia en las separaciones electroforéticas lo constituye la temperatura. Como ya se mencionó anteriormente, al ser aplicado un voltaje el valor de la corriente eléctrica generada a lo largo del capilar dependerá del valor del primero, siendo esta relación directamente proporcional, de tal forma que un aumento en la corriente eléctrica se verá acompañado de un incremento en la temperatura del sistema lo cual puede originar gradientes de temperatura y por ende gradientes de viscosidad en el medio. Los cambios en la viscosidad del medio interfieren directamente en la calidad de la separación, por lo tanto, es importante mantener constante este factor.

La figura 18 presenta los EFG's de los experimentos realizados para determinar la influencia de la temperatura en la separación enantiomérica de miconazol. Puede observarse en estos resultados que la resolución, la dispersión así como los tiempos de

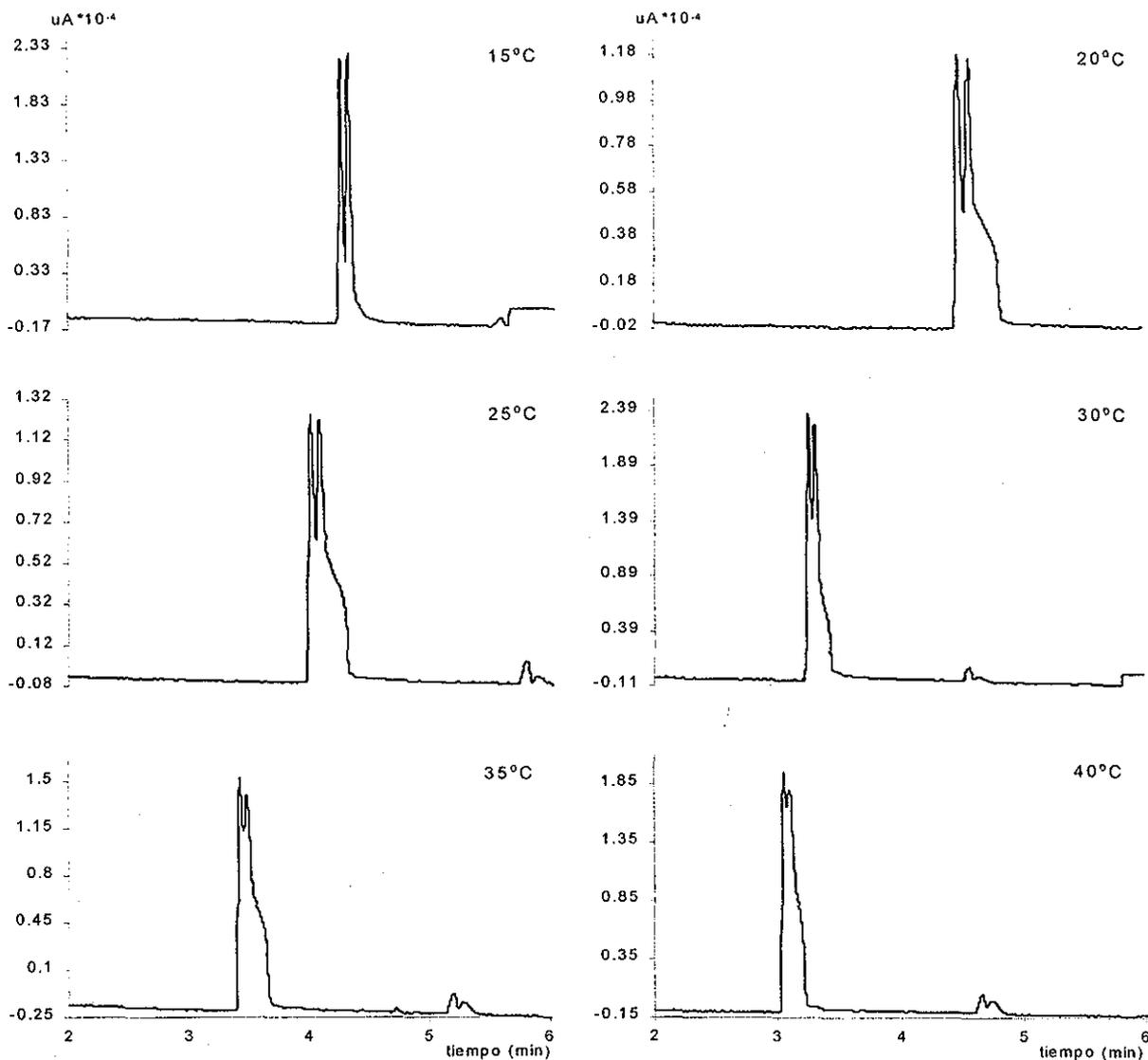


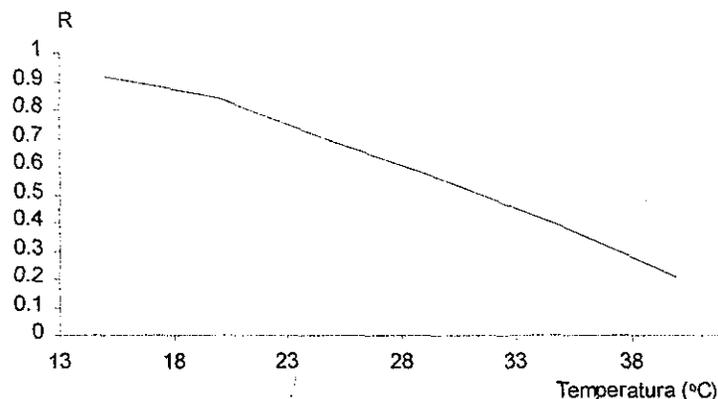
Figura 18. Efecto de la temperatura del capilar en la resolución enantiomérica de miconazol. Condiciones: 30 kV de voltaje aplicado, buffer de fosfatos 30 mM pH 4.7 con HP β CD 1.0 mM como selector quiral. El resto de las condiciones fueron idénticas a las de la figura 13.

análisis de los picos de los dos isómeros de miconazol fueron parámetros notablemente afectados por las diferentes temperaturas evaluadas (15, 20, 25, 30, 35 y 40 °C). Puede observarse en esta figura que a medida en que la temperatura aumentó, los tiempos de análisis disminuyeron lo cual probablemente se debió a que dicho aumento provocó una

disminución de la viscosidad del buffer, facilitando (haciendo más rápida) de este modo la migración de los isómeros de miconazol a través del capilar. Sin embargo, como el tiempo neto de los isómeros dentro del capilar fue menor a altas temperaturas, entonces, el equilibrio de interacción entre los isómeros y la HP β CD probablemente tuvo menos tiempo para llevarse a cabo y por tanto la resolución de ambos fue menor a medida que se aumentó este factor, tal como puede apreciarse en los EFG's de esta figura. Los resultados obtenidos en estos análisis coinciden con algunas investigaciones en las que se ha demostrado experimentalmente que la temperatura en el capilar durante separaciones quirales puede modificar significativamente la estabilidad de los complejos de inclusión formados entre los analitos y las ciclodextrinas. Generalmente, un incremento en la temperatura provoca un decremento en la constante de estabilidad del complejo debido a que el primero afecta tanto a la viscosidad del electrolito soporte, reducción del tiempo de migración, como a la cinética de la transferencia de masa de los analitos y los selectores quirales [90]; tal como se ha reportado en el caso de la separación de los enantiómeros de α -amino alcoholes empleando ciclodextrinas como selectores quirales [91]. Termodinámicamente, se sabe que en general para reacciones exotérmicas un incremento en la temperatura favorece el desplazamiento del equilibrio de dichas reacciones hacia la formación de los reactivos que sería el caso de las reacciones de formación de complejos de inclusión entre el analito y la ciclodextrina mientras que para reacciones endotérmicas un incremento en la temperatura favorece el desplazamiento de éstas hacia la formación de los productos [92].

También en esta figura puede apreciarse que la temperatura óptima de separación fue de 15°C. La figura 19 muestra una gráfica en donde puede notarse mejor cómo a medida que se aumentó la temperatura de separación disminuyó la resolución* (R o R_S) de los enantiómeros de miconazol.

Figura 19. Gráfica del efecto de la temperatura del capilar en la resolución enantiomérica de miconazol. Condiciones: las mismas que las reportadas en la figura 18.



10.1.4-Efecto del voltaje aplicado en los tiempos de análisis, la eficiencia y la resolución de la separación de los enantiómeros de miconazol

En la figura 20 se presentan las gráficas de la influencia del voltaje aplicado en los tiempos de análisis, eficiencia y resolución de la separación de los enantiómeros de miconazol. Tal como puede apreciarse en estas gráficas, en todos los casos, el empleo de voltajes altos contribuyó de manera positiva en los tres parámetros estudiados. Por ejemplo, la gráfica 20-A muestra que el tiempo más corto de análisis se obtuvo al valor máximo de voltaje aplicado, esto es, a 30 kV. Este resultado es debido a que al aplicar una diferencia de potencial cada vez mayor (mayor voltaje) las especies cargadas aceleran su migración

*Se entiende por resolución R o R_S a la medida cuantitativa de la capacidad de una columna o capilar para separar dos analitos (por ejemplo A y B) y matemáticamente se define como:

$R = [2*(t_{RB}-t_{RA})]/[W_A+W_B]$ donde t_{RB} es el tiempo de retención del pico del analito B y t_{RA} lo es del analito A y para los cuales se cumple que $t_{RB} > t_{RA}$. W_A y W_B representan los valores de las anchuras de las bases de ambos picos respectivamente.

aparte de que se incrementa el valor del EOF y como en estos experimentos los sentidos de la migración de los analitos así como la del EOF coinciden, entonces ambas fuerzas se suman en el sentido o dirección de detección de los analitos. Un inconveniente de la aplicación de potenciales elevados consiste en la generación de corrientes elevadas, lo cual implica el inconveniente de que se genera calentamiento de *Joule*, sin embargo, como la temperatura se mantuvo constante, esta desventaja pudo ser eliminada.

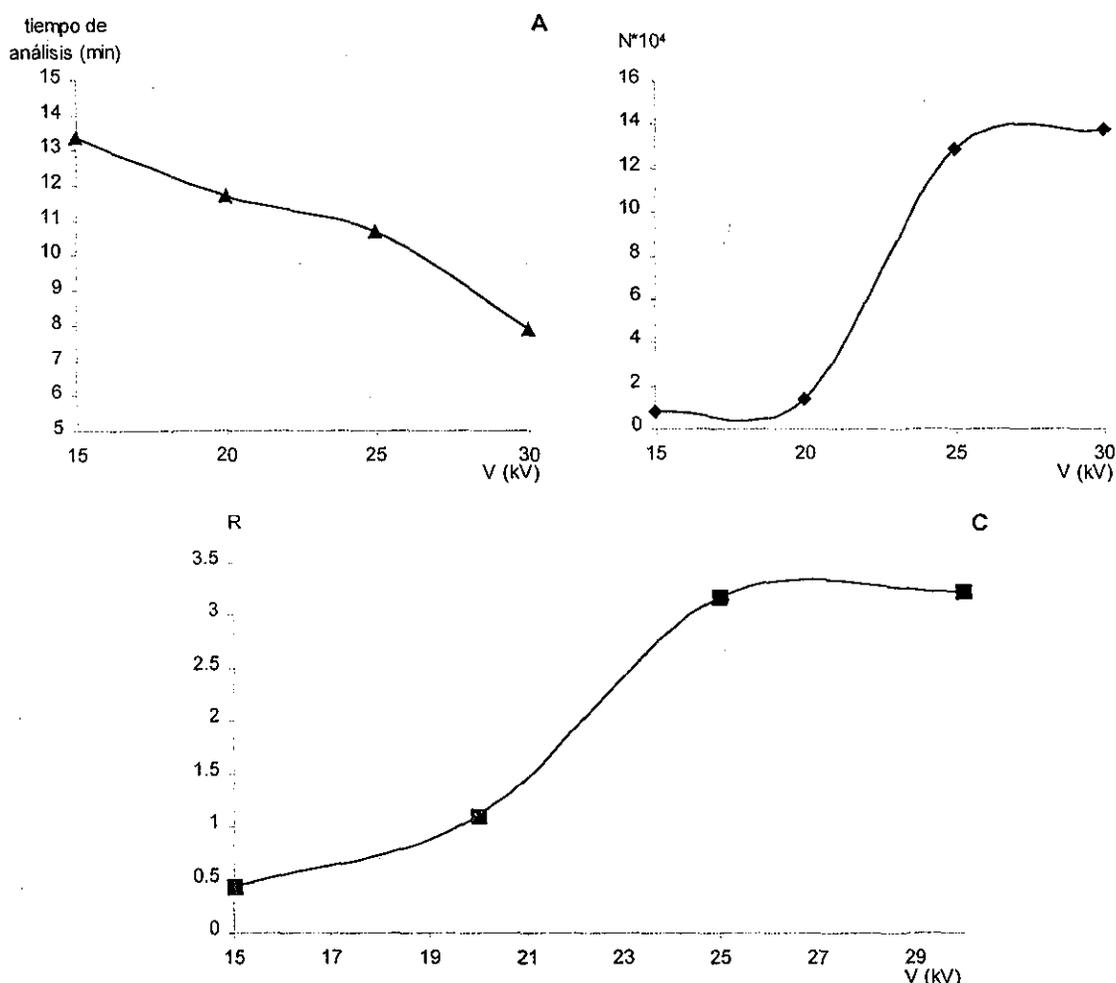


Figura 20. Gráfica del efecto del voltaje aplicado (15, 20, 25 y 30 kV) en el tiempo de análisis (A), eficiencia (B) y resolución (C) de la separación enantiomérica de miconazol. Condiciones: las mismas que las de la figura 18 con excepción del voltaje.

Con respecto a la eficiencia de la separación, a partir de la figura 20-B se observa que ésta se incrementó conforme se aumentó el voltaje y su máximo valor se obtuvo a 30 kV.

Puede considerarse como una regla el hecho de que a mayores voltajes de operación se obtienen mayores eficiencias de separación, salvo en aquellos casos en que la fuerza iónica de la muestra sea mucho mayor que la del buffer de corrida, o bien que el calentamiento de *Joule* sea excesivo, que en cualquiera de los dos casos se favorecería la presencia de fenómenos de dispersión. En base a los resultados presentados en la figura 19 se puede inferir que la fuerza iónica de las soluciones estándar no fue lo suficientemente excesiva al grado de promover fenómenos de dispersión al aumentar el voltaje de separación, ya que las eficiencias obtenidas siempre fueron crecientes. El mismo razonamiento puede aplicarse al efecto que pudo haber tenido el calentamiento de *Joule* (en el remoto caso de que se hubiera generado a temperatura controlada) al incrementarse el voltaje de separación.

10.2-Efecto del tipo y concentración de ciclodextrinas neutras en la separación enantiomérica de miconazol y ketoconazol

Una vez definidos tanto la composición óptima del buffer como su concentración se procedió a evaluar la influencia del tipo de selector quiral (en este caso ciclodextrinas) en la separación de los enantiómeros de miconazol y ketoconazol.

Cabe mencionar que la selección de los tipos de ciclodextrinas a ser evaluadas como selectores quirales se llevó a cabo empleando criterios químicos como los que a continuación se describen:

1.- El complejo de inclusión resultante de la interacción analito-CD debe proporcionar una carga neta a fin de que bajo la influencia de un campo eléctrico migre por si mismo{ ya sea al ánodo o bien al cátodo. Esto quiere decir que este complejo poseerá una movilidad efectiva neta, diferente de la generada por el flujo electroosmótico (EOF) cuando se utilizan capilares de sílice fundida. Como se mencionó en la sección 6.2, ecuación (7), la movilidad aparente (o total como también se conoce) de un analito, es igual a la suma de las movilidades del EOF, μ_{EOF} y la movilidad efectiva del analito, μ_{ef} .

$$\mu_{ap} = \mu_{ef} \pm \mu_{EOF}$$

Debido a la interacción podemos concluir que cualquier sustancia que sea neutra es decir que no posea una movilidad intrínseca, se moverá únicamente por efecto del vector fuerza generado por el EOF, y a su misma velocidad.

$$V_{sust. Neutra} = V_{EOF} \tag{18}$$

donde :

$$V_{EOF} = \mu_{EOF} E$$

V_{EOF} = velocidad del flujo electroosmótico

E= campo eléctrico aplicado

Es decir, en una mezcla de compuestos neutros, estos migrarán por causa del EOF, y serán detectados como un pico único en el electroferograma sin lograrse separación alguna.

Todo lo anterior demuestra la importancia de generar complejos de inclusión que posean una carga neta y que puedan migrar por sí mismos. Por lo tanto, podemos proponer la siguiente tabla para la elección del selector quiral adecuado para cada sustancia.

Tabla 6. Selección del tipo de CD adecuada para cada analito de acuerdo a su carga.

Compuesto	CD neutra	CD aniónica	CD catiónica
Anión	✓	—	✓
Neutro	—	✓	✓
Catión	✓	✓	—

* Siempre que el complejo analito-CD posea al final una carga neta

De acuerdo a la tabla 6 y considerando que nuestros analitos problema se comportan como cationes a pH ácido (ver valores de pKa), se propuso el empleo de las siguientes CD's:

- Alfa ciclodextrina (α CD)
- Beta ciclodextrina (β CD)
- Metil beta ciclodextrina (M β CD)
- Dimetil beta ciclodextrina (DM β CD)
- Hidroxipropil beta ciclodextrina (HP β CD)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con la finalidad de evaluar la posible enantioselectividad de cada una de las CD's, se adicionaron éstas a concentración 10 mM en buffer de fosfatos 30 mM pH 4.7. El resto de las condiciones a las que se realizaron las separaciones fueron las siguientes:

-V (voltaje) = 30 kV

-Polaridad: Normal

-T (temperatura)= 15 °C

-Capilar de sílice fundida; $L_T = 60.2$ cm, $L_D = 50$ cm.

(L_T = longitud total. L_D = longitud al detector)

-Detector: UV

- λ (longitud de onda)= 200 nm

De los experimentos realizados usando la lista anterior de CD's, sólo se observó enantioselectividad con la HP β CD lográndose una leve separación en el caso de los enantiómeros de miconazol (ver figura 22), mientras que para las otras CD's sólo se lograron observar algunos cambios en el tiempo de migración del antimicótico (figuras 21 y 22). Cabe resaltar la manera en que la presencia de la DM β CD aumentó el tiempo de migración del miconazol, lo cual probablemente se deba a que, durante la separación, entre el selector quirral y el analito ocurrieron interacciones de algún tipo aunque la falta de resolución nos indica que esta interacción no fue de naturaleza enantioselectiva, de tal suerte que las modificaciones en las movibilidades electroforéticas de los dos isómeros hayan sido iguales, lo que significa que no hubo discriminación entre uno y otro (al menos a la concentración probada del selector quirral). Otro aspecto que tal vez influyó en la modificación de los tiempos de migración pudo ser el aumento en la viscosidad del medio

(buffer), asociada al empleo de diferentes CD's las cuales poseen diferentes solubilidades y estructuras.

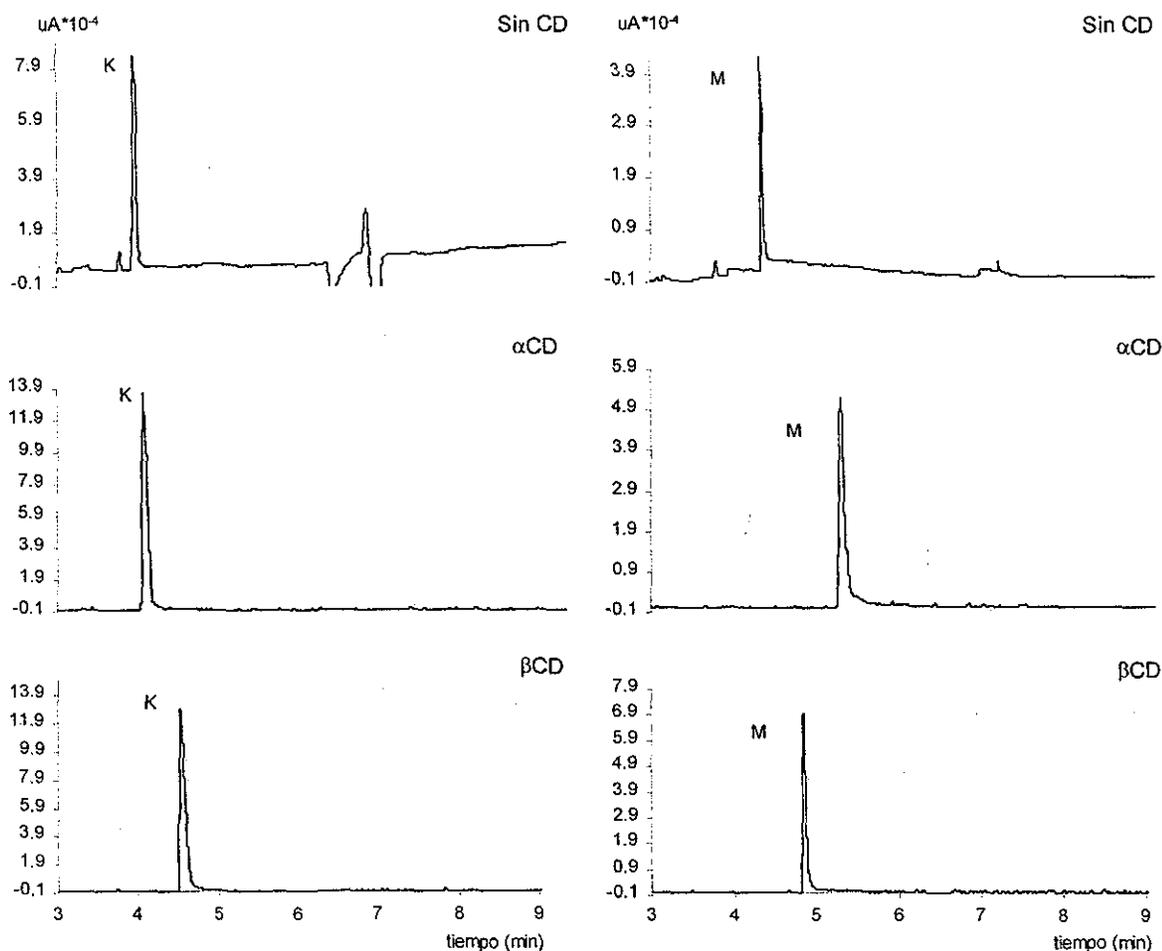


Figura 21. Efecto del tipo de ciclodextrina (α CD y β CD 10 mM) en la resolución enantiomérica de ketoconazol (K) y miconazol (M). Condiciones: las mismas que las de la figura 18 con excepción del tipo de CD, el cual se especifica para cada caso.

Como se mencionó en la sección 7.3, diferentes interacciones pueden ocurrir entre un analito específico y una CD, pero para que la CD presente enantioselectividad por los enantiómeros de una sustancia, necesariamente el selector debe llevar a cabo al menos tres

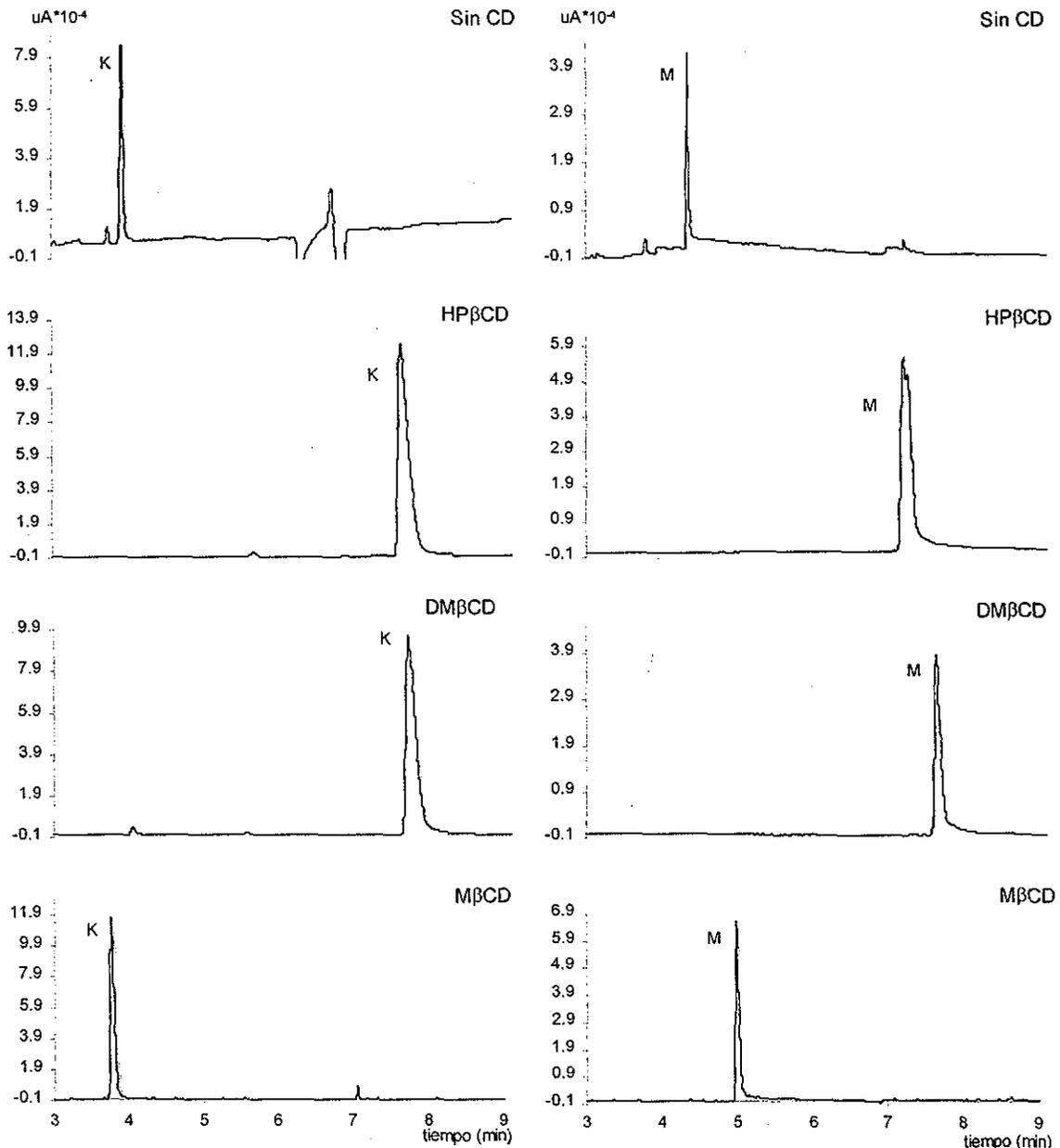


Figura 22. Efecto del tipo de ciclodextrina (HPβCD, DMβCD y MβCD 10 mM) en la resolución enantiomérica de ketoconazol (K) y miconazol (M). Condiciones: las mismas que las de la figura 18, excepto por el tipo y concentración de CD empleado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

tipos diferentes de éstas (una de las cuales es de naturaleza enantioselectiva, ver anexo 3), con el objeto de estabilizar al complejo de inclusión y crear diferencias significativas entre las constantes de equilibrio de cada uno de éstos [93].

El hecho de que todas las CD's utilizadas aumenten los tiempos de migración (con respecto a los tiempos obtenidos en ausencia de CD tanto de miconazol como del ketoconazol podría deberse a la interacción ocurrida de los analitos con cada una de las CD's aunado al aumento en la viscosidad del medio (generado principalmente por la presencia de las CD's), el cual, de acuerdo a la ecuación 19, influye directamente en la disminución de la movilidad de los analitos.

$$\mu_i = \frac{Z_i e}{6\pi\eta r_i} \quad (19)$$

Donde:

Z_i = carga del ion

e = carga del electrón (en coulombs)

η = viscosidad.

r_i = radio del ion.

Podemos ver en las figuras 21 y 22 que aunque el aumento en la viscosidad del medio podría considerarse de la misma magnitud para cada una de las ciclodextrinas, ya que fueron preparadas a la misma concentración (10 mM), el aumento en el tiempo de migración es significativamente distinto en cada caso. Esto nos hace pensar que debido a que la carga neta del complejo de inclusión es proporcionada por el analito (catión a pH

ácido), entonces el retraso en la migración del analito hacia el detector, podría estar relacionado con la fuerza de interacción del complejo antimicótico-CD (A-CD, donde A = antimicótico y CD = DM β CD, HP β CD o M β CD), de lo que se puede inferir que las constantes de equilibrio de los analitos estudiados son mayores con la DM β CD, pudiéndose proponer el siguiente orden respecto a la magnitud relativa de las constantes de equilibrio:

$$K_{A-DM\beta CD} > K_{A-HP\beta CD} > K_{A-M\beta CD}$$

Como se mencionó anteriormente, la magnitud de la K_{cq} del analito con la ciclodextrina no garantiza la enantioselectividad, sino las diferencias que el selector quiral pueda originar entre las constantes de equilibrio con cada uno de los enantiómeros.

$$\Delta K = K_{E1} - K_{E2}. \quad (20)$$

Lo anterior se pone de manifiesto en el electroferograma del miconazol de la figura 21 donde se observó enantioselectividad únicamente con la HP β CD y no con la DM β CD que al parecer presenta una interacción de mayor fuerza. De igual forma con la M β CD no hubo enantioselectividad.

Una consecuencia de la interacción de la DM β CD con el miconazol fue la dispersión de este último reflejada en la anchura del pico del electroferograma. Una situación muy diferente se halló para los resultados con la α CD, β CD y M β CD (ver figuras 20 y 21), ya que en estos casos se registraron los tiempos de migración menores, lo cual implica que las interacciones de estos selectores quirales con el miconazol son más débiles, por tanto permanecen menos tiempo dentro del capilar y por ende se dispersan menos, aspecto acorde también con los valores de eficiencia (N) superiores obtenidos para estas ciclodextrinas. Como cabría esperarse, las dispersiones de los picos de estos electroferogramas fueron

menores comparadas con las de los electroferogramas de la DM β CD e HP β CD, esto debido en gran parte a que el fenómeno de difusión de los analitos provoca que los picos se ensanchen con el tiempo.

Con respecto al análisis de los isómeros de ketoconazol, se halló que con ninguna de las ciclodextrinas probadas, (por lo menos a concentración 10 mM), se logró separar a éstos (ver figuras 21 y 22). Al igual que en el caso del miconazol, los tiempos de migración se vieron modificados de manera diferencial en función del tipo de ciclodextrina empleada.

Considerando que, al menos para el miconazol, la HP β CD presentó cierta selectividad, el siguiente experimento consistió en probar diferentes concentraciones de este selector quiral con la idea de encontrar la concentración óptima en la cual se observa la resolución más alta. Aún cuando a 10 mM no hubo ninguna evidencia de separación para el ketoconazol, se realizaron, no obstante, análisis de este antimicótico a otras dos concentraciones de HP β CD para, al menos, descartar que la resolución de estos enantiómeros fuera una función de la concentración de dicha ciclodextrina.

Los resultados de estos experimentos se pueden observar en la figura 23 para el miconazol, y en la 25 para el ketoconazol.

La separación de los enantiómeros de miconazol depende de la concentración de la HP β CD tal como lo muestran los resultados de la figura 23. Resultados semejantes han sido reportado por Wren y Rowe [78] para la separación de compuestos β -bloqueantes. Obteniendo los valores de resolución R_s para cada uno de los electroferogramas, se elaboró la tabla 7 y a partir de estos datos se hizo una gráfica de R_s vs. [HP β CD], misma que se muestra en la figura 24, en donde se ve con mayor claridad el efecto del que se hace

mención. En esta gráfica puede apreciarse que la resolución en función de la concentración de HP β CD pasa por un máximo, [HP β CD] = 1 mM, aunque los valores de R_s no son muy diferentes a las concentraciones de 0.5 y 3 mM, sin embargo se consideró 1 mM como la concentración óptima de separación.

No se observó ningún efecto en la resolución de los isómeros de ketoconazol empleando 3 concentraciones diferentes de HP β CD, lo cual descarta prácticamente la posible selectividad de este compuesto por estos dos enantiómeros. al menos utilizando esta ciclodextrina. Únicamente podemos ver en los electroferogramas de la figura 25 que al aumentar la concentración de HP β CD, se aumentó también el tiempo de migración de este analito, lo cual en gran parte es debido al aumento en la viscosidad del medio.

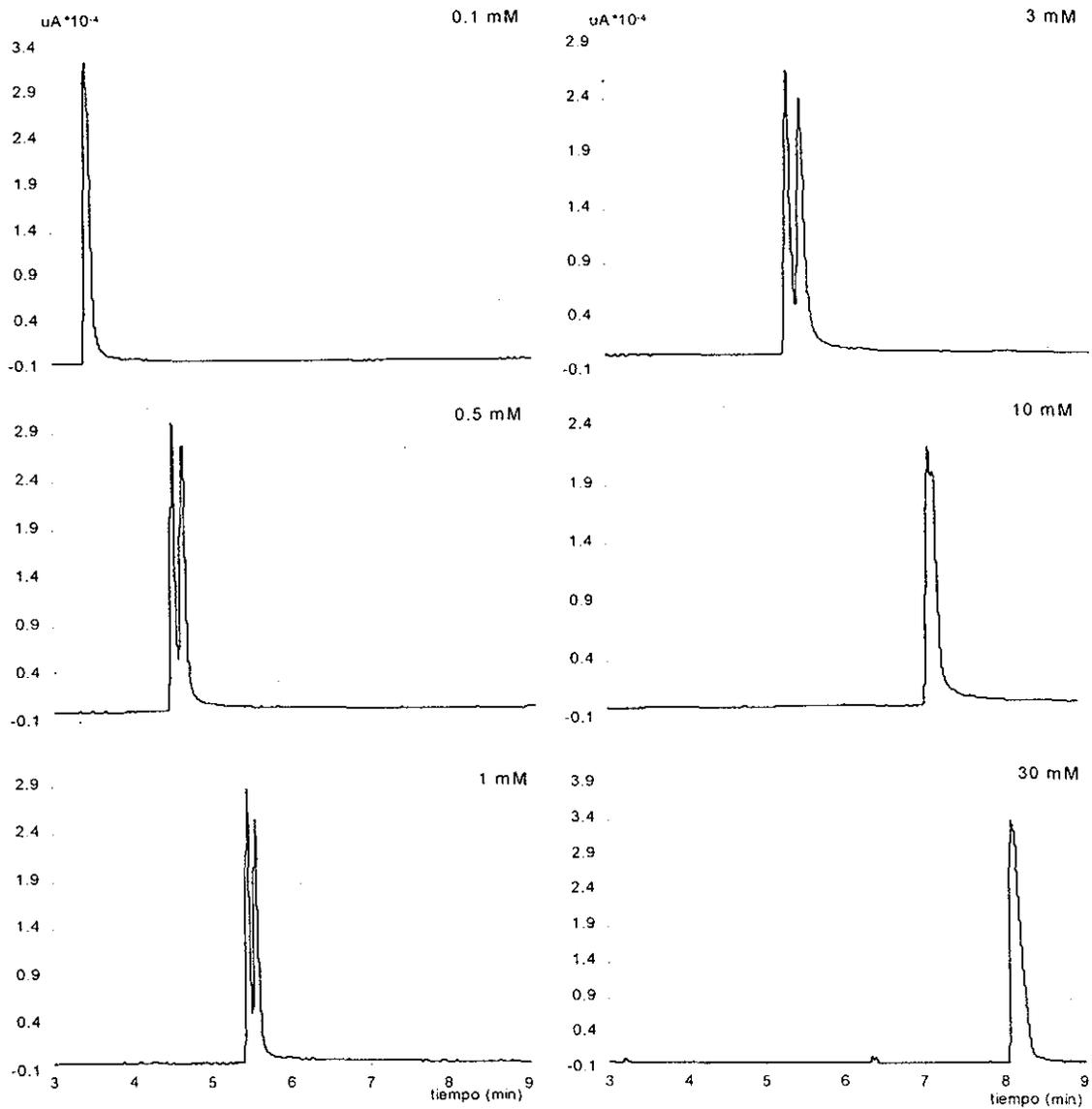


Figura 23. Efecto de la concentración de la HPβCD (0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 10 y 30 mM) en la resolución enantiomérica de miconazol. Condiciones: las mismas de la Fig. 18 excepto por el uso de diferentes concentraciones de CD.

Tabla 7. Resolución de los enantiómeros de miconazol en función de la concentración de HP β CD.

[HP β CD] mM	R _s
0.1	0.0
0.5	1.02
1.0	1.08
3.0	1.06
10.0	0.11
30.0	0.0

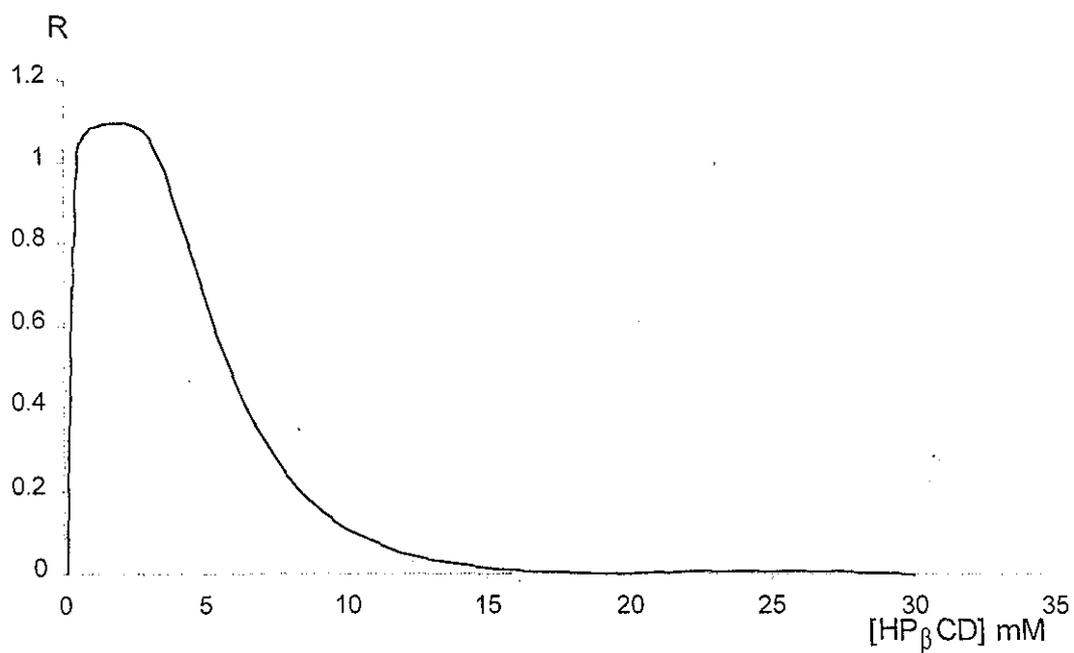


Figura 24. Influencia de la concentración de HP β CD en la resolución de los enantiómeros de miconazol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

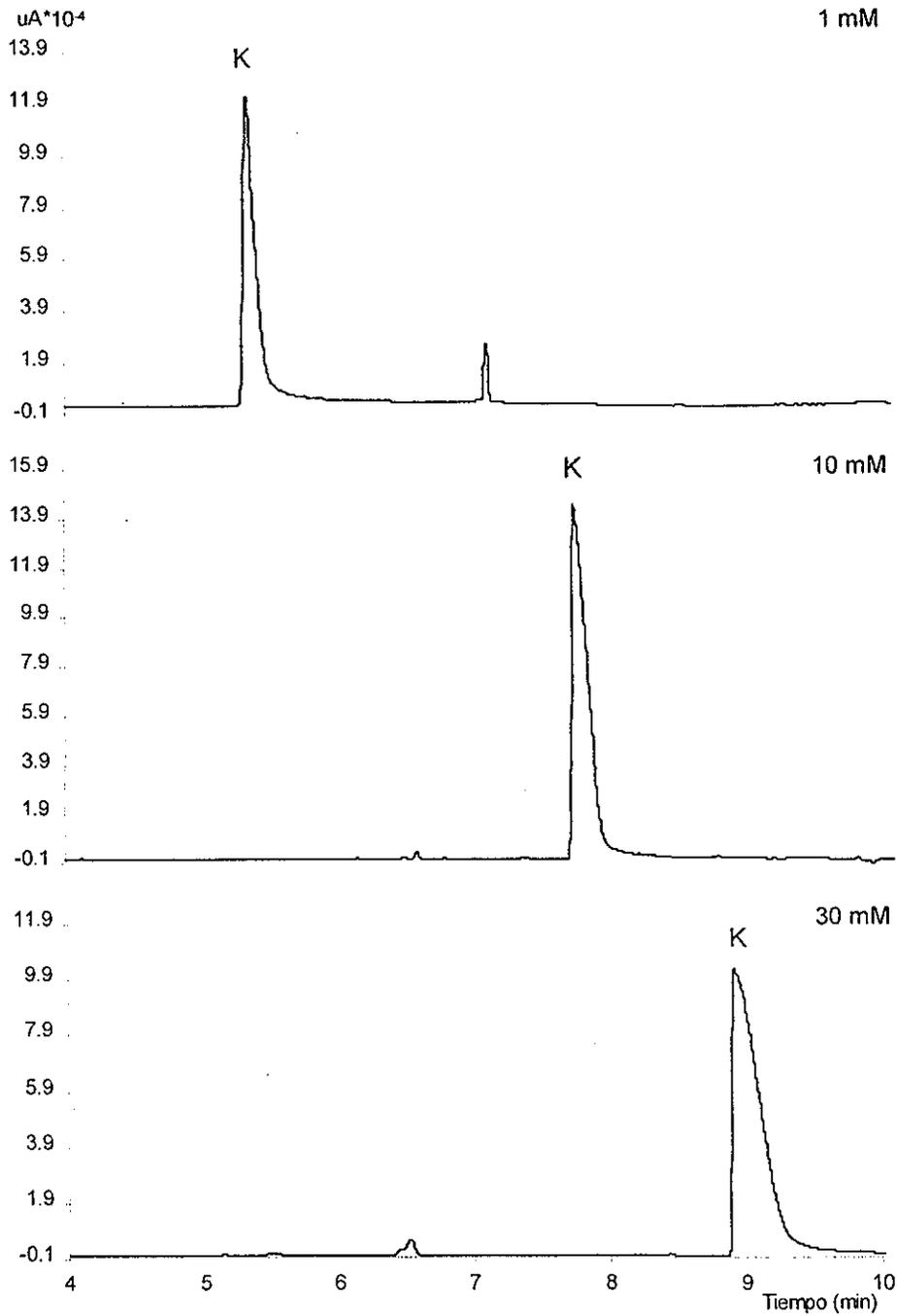


Figura 25. Efecto de la concentración de HP β CD (1.0, 10 y 30 mM) en la resolución enantiomérica de ketoconazol (K). N = desconocido. Condiciones: las mismas que las reportadas en la Fig.18.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10.3-Efecto del pH del medio en la separación enantiomérica de miconazol

Otro parámetro importante para la optimización de la separación de los antimicóticos en cuestión es el pH, de tal suerte que se realizaron experimentos variando los valores de este factor utilizando en todos los casos un buffer de fosfatos 30 mM como electrolito soporte adicionando HP β CD 1 mM. Los electroferogramas resultantes para la separación de los enantiómeros de miconazol se muestran en la figura 26.

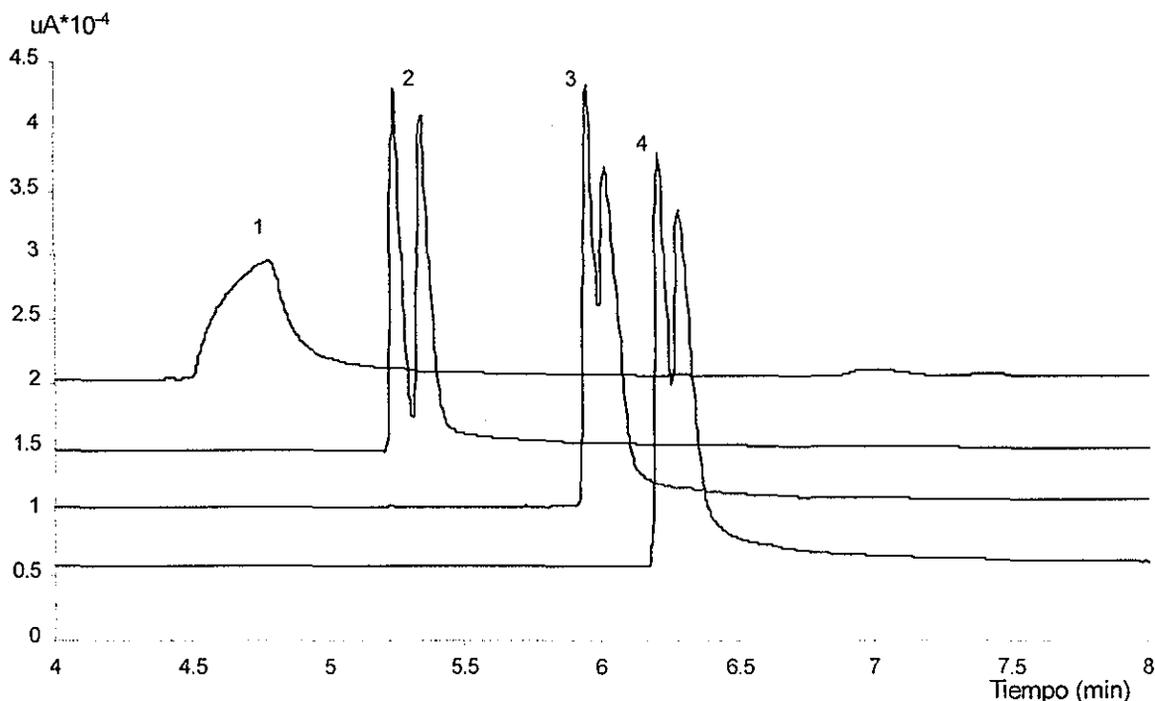


Figura 26. Efecto del pH en la separación de enantiómeros de miconazol. pH 5.7 (1), pH 4.7 (2), pH 3.7 (3) y pH 2.7(4) en presencia de HP β CD 1.0 mM como selector quiral. Condiciones: las mismas que las reportadas en la Fig.18.

Como en los casos anteriores, la separación y por tanto la resolución de los isómeros de miconazol tuvo un comportamiento diferencial frente a la variación del pH en este caso. Es importante observar cómo esta variable a la vez que modifica la selectividad (separación) de los isómeros, también lo hace con los tiempos de migración de estos. Consecuencia lógica pues se afecta la magnitud del vector del EOF que depende del valor del pH al que se lleve a cabo la separación, que a su vez afecta directamente a la μ_{ap} del analito, de tal suerte que al aumentar el pH se observa la disminución del tiempo de migración como una consecuencia del aumento en la movilidad del EOF (ver ecuación 7).

Para estos experimentos, el pH óptimo de separación fue de 4.7 (ver figura 26). La razón para evaluar sólo valores de pH menores a 6.0 fue con el objeto de tener protonado (cargado) al antimicótico para que posea una movilidad electroforética intrínseca.

Las mejores condiciones observadas para lograr hasta el momento la mejor separación de miconazol se usaron con otros tres antimicóticos de estructura semejante a la del primero (asumiendo que por esta razón podríamos encontrar respuestas parecidas), y también pertenecientes a la familia de los imidazoles, esto es, econazol, sulconazol y bifonazol (ver figura 12).

Las condiciones probadas fueron las siguientes:

- Buffer: Fosfatos 30 mM
- pH: 4.7
- Selector quiral: HP β CD 1 mM

Los electroferogramas de la figura 27 muestran que tanto los enantiómeros de econazol como los de sulconazol presentaron interacciones enantioselectivas con la HP β CD a las condiciones de estudio, pero no ocurrió lo mismo para el bifonazol. Los enantiómeros de econazol fueron separados con un valor de $R_s= 1.1642$, mientras que los de sulconazol lo fueron con $R_s= 0.9685$. Los resultados anteriores confirman en cierta forma la analogía estructural entre miconazol, econazol y sulconazol, de tal suerte que la suposición de que se comportarían de manera semejante bajo las condiciones obtenidas para el miconazol, fue correcta.

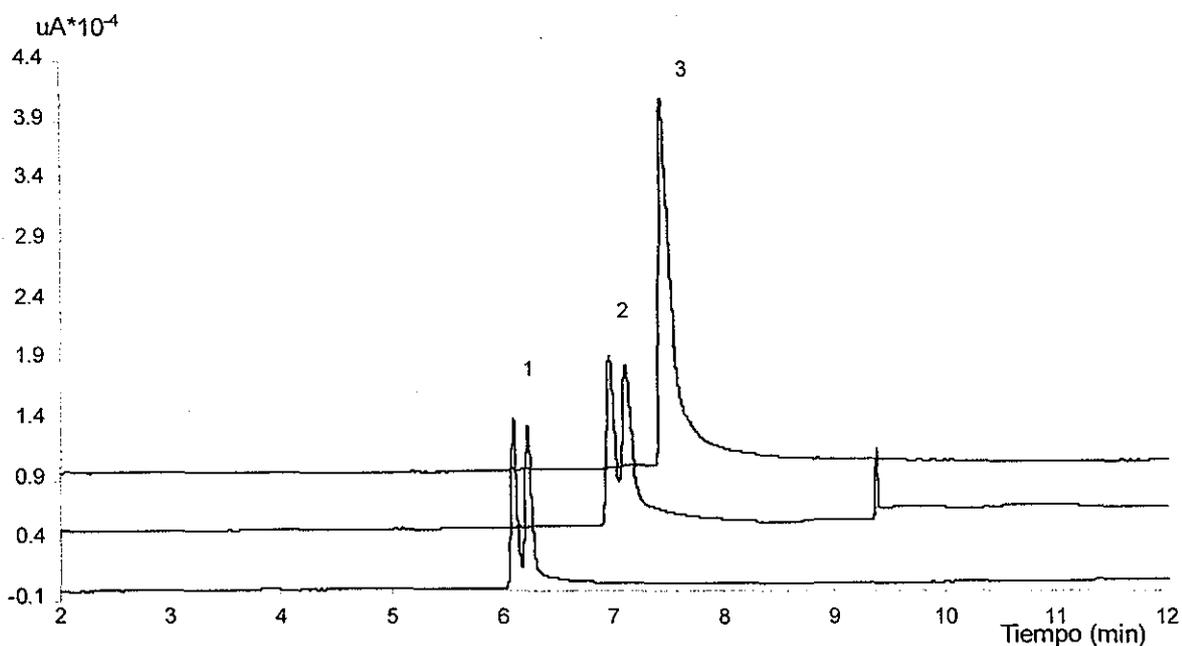


Figura 27. Separación de antimicóticos imidazólicos bajo las mismas condiciones experimentales optimizadas para la separación parcial de isómeros de miconazol. Econazol (1), Sulconazol (2) y Bifonazol (3). Ver condiciones óptimas en el texto.

10.4-Evaluación de las ciclodextrinas altamente sulfatadas como selectores quirales

Como es sabido, la introducción de ciertos grupos funcionales en las estructuras de las ciclodextrinas nativas aumenta su solubilidad así como las posibilidades de interacción de estos selectores quirales con diversos analitos [28, 94], tal es el caso de la beta ciclodextrina altamente sulfatada (HS β CD) cuyos grupos sulfato cargados negativamente, podrían favorecer una mayor interacción entre ésta y analitos cargados positivamente debido a la posible interacción par-iónico, como es el caso de los antimicóticos empleados en este estudio. Con base en lo anterior, la HS β CD fue probada como posible selector quiral para esto analitos.

Los electroferogramas de la figura 28 pertenecen a experimentos realizados empleando HS β CD 5 mM en la separación enantiomérica de miconazol, econazol, ketoconazol, sulconazol y bifonazol (aunque el electroferograma de bifonazol no se presenta debido a que no exhibió separación alguna con esta ciclodextrina).

Los enantiómeros de miconazol fueron separados con una resolución a nivel de línea base ($R_s = 6.5$). Por su parte, los enantiómeros de sulconazol, econazol y ketoconazol fueron separados con valores de resolución de 1.08, 3.54 y 0.38 respectivamente. Para el caso del ketoconazol este resultado se consideró como un buen comienzo, si se toma en cuenta que con ninguna de las anteriores ciclodextrinas se había logrado obtener selectividad para este compuesto.

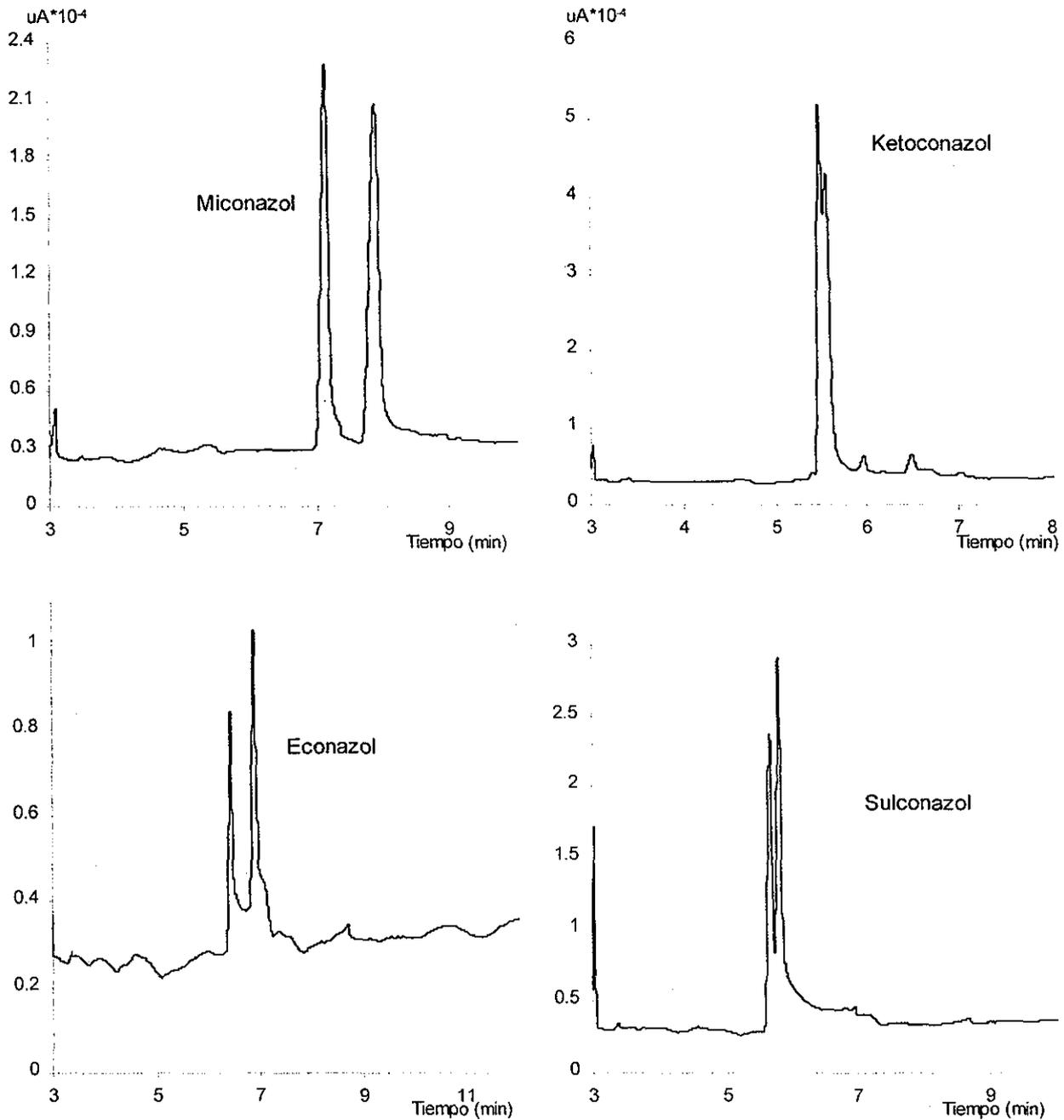


Figura 27. Separación de enantiómeros de miconazol, ketoconazol, econazol y sulconazol empleando HS β CD 5 mM como selector quiral. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 60.2 cm de longitud total (50 cm de longitud al detector), 50 μm de diámetro interno, introducción de muestra por inlet a 0.5 psi de presión durante 5 segundos, -30 kV de voltaje aplicado, polaridad inversa, 15°C, detección a 200 nm, Buffer de fosfatos 30 mM, pH 2.7.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los experimentos anteriores se realizaron a pH de 2.7 con la finalidad de tener totalmente protonados a todos los antimicóticos aparte de contar con un buen sistema amortiguador.

Si bien es cierto que de los tres tipos de ciclodextrinas, α , β , y γ , ya sea en su forma nativa o modificada, la más comúnmente empleada es la β , se decidió probar la gama ciclodextrina altamente sulfatada (HS γ CD) pensando en que el mayor tamaño de la cavidad hidrofóbica de ésta, incrementaría la probabilidad de interacciones con los antimicóticos que tuvieron una menor resolución (o ninguna) frente a los otras ciclodextrinas evaluadas, esto es: bifonazol, ketoconazol y, en menor grado, sulconazol. Naturalmente, el hecho de emplear la ciclodextrina más grande se hizo también pensando en el tamaño de la molécula de ketoconazol (la más grande de las cinco analizadas), así como en las diferencias estructurales del bifonazol respecto a las estructuras de miconazol, econazol e incluso sulconazol.

Los resultados de la figura 29 muestran que para bifonazol y sulconazol, la HS γ CD tuvo interacciones enantioselectivas de tal suerte que hubo cierto grado de separación. De hecho, para el bifonazol la separación se llevó a cabo con una resolución: $R= 3.415$ y para el sulconazol con $R= 1.246$. En cuanto a ketoconazol no se obtuvo separación para sus enantiómeros (electroferograma no mostrado).

Al menos para el bifonazol la HS γ CD ha sido la única ciclodextrina que ha podido interaccionar selectivamente con sus dos enantiómeros, mientras que para el caso del sulconazol, en este último experimento mejoró la resolución de los isómeros de este antimicótico con el uso de la HS γ CD.

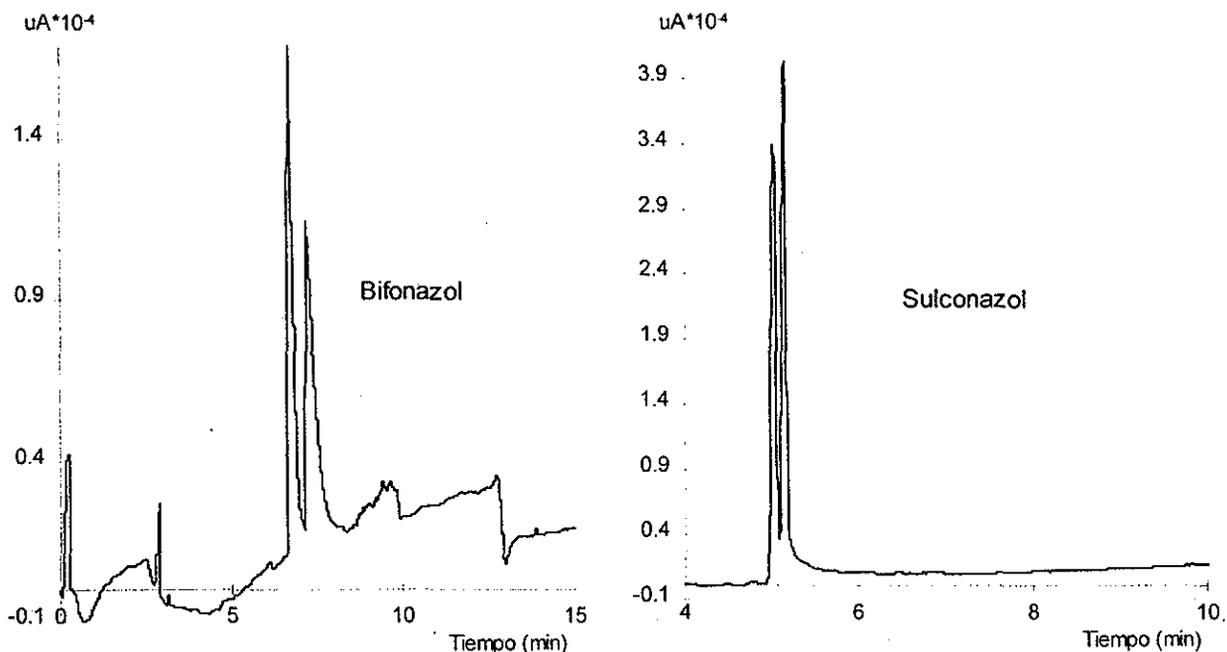


Figura 29. Separación de los enantiómeros de bifonazol y sulconazol, empleando una gama ciclodextrina altamente sulfatada ($\text{HS}_\gamma\text{CD}$) como selector quiral a concentración 5 mM. Condiciones: las mismas que las de la figura 28.

10.4.1-Desdoblamiento de los picos de los antimicóticos (*peak splitting*)

Durante los experimentos subsecuentes con las CD's sulfatadas se observó un hecho interesante, la presencia de desdoblamientos de los picos de los isómeros de los antimicóticos (*peak splitting*, en inglés) en los electroferogramas. La presencia de este tipo de alteraciones durante separaciones de esta naturaleza puede deberse a muchas razones, por ejemplo, se ha encontrado que ocurren reacciones de complejación entre β -naftol y polímeros polinucleares de borato (usado como electrolito soporte) cuando se emplean altas concentraciones de borato (superiores a 50 mM), mismas que pueden llegar a manifestarse como desdoblamientos de picos [95]. También se ha reportado que el uso de electrolitos

binarios con dos iones promueve, en algunos casos, el desdoblamiento de picos debido a que la presencia de estos iones dispersa a los analitos de tal forma que se definen zonas que pueden repercutir en el perfil de los electroferogramas como picos coleados, cabeceados así como dobleteados [96, 97]. La adsorción de analitos en la superficie interna del capilar, es otro factor que puede promover tanto desdoblamiento de picos como dispersión de estos. Esto puede ocurrir porque algunos compuestos como las proteínas, poseen regiones en su estructura molecular que pueden ser no polares, polares o bien ionizables, mismas que pueden potencialmente llevar a cabo interacciones hidrofóbicas, hidrofílicas o electrostáticas respectivamente con la pared interna del capilar [98].

En la figura 30 puede observarse un electroferograma en el que se aprecia la manera en que se modificaron las formas de los picos de los isómeros, en este caso de miconazol, provocando un desdoblamiento. Cabe hacer mención que en todos los casos, es decir, para todos los antimicóticos, se halló el mismo comportamiento.

A partir de este momento se tomaron diversas medidas con el fin de establecer la razón por la que había aparecido el desdoblamiento de los picos, tal como lavar durante varios minutos el capilar con NaOH 0.1M y H₂O, se prepararon de nuevo tanto el buffer de corrida como las soluciones de los antimicóticos, se cambió el agua con la que se prepararon soluciones y buffer, se limpiaron algunas partes específicas del equipo tales como electrodos y uniones en que se lleva a cabo el sellado para hacer vacío en los viales (asumiendo que un mal sellado pudiera estar ocasionando una introducción anormal de muestra). Además, se realizaron introducciones de muestra por electromigración y se compararon con introducciones de tipo hidrodinámico (que hasta ese entonces eran las que

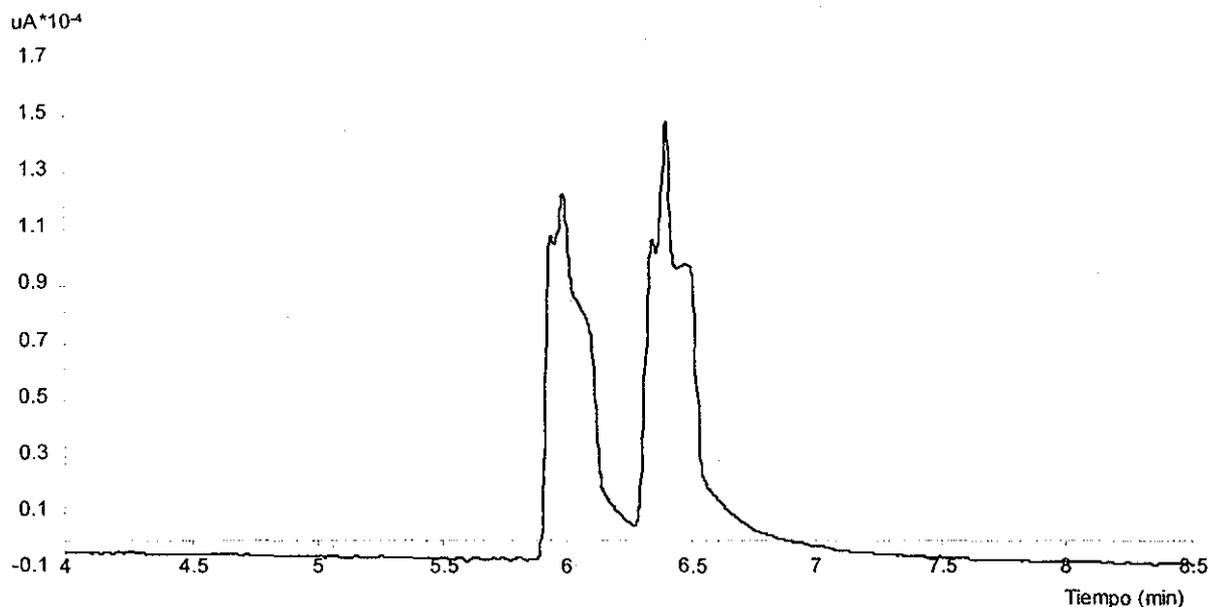


Figura 30. Desdoblamiento de picos durante la separación de enantiómeros de miconazol en presencia de HS β CD 5 mM como selector quiral. Condiciones: las mismas que las de la figura 28.

se habían realizado en todos los experimentos anteriores). Incluso se cambió el capilar por uno nuevo todo con la finalidad de eliminar el problema antes citado.

Por supuesto, después de cada acción realizada se corrieron muestras para saber si se eliminaba el problema, sin embargo, en ninguno de los casos se pudo suprimir el “peak splitting”.

Considerando la forma de los electroferogramas alterados se pensó que otra causa probable de las anomalías en los picos (una vez agotadas otras posibilidades), pudiese ser el acaecimiento de un fenómeno de adsorción en la superficie del capilar, por lo que se tomó la decisión de utilizar dos capilares neutros, es decir, dos capilares recubiertos, cuya principal característica consiste en eliminar las interacciones entre la superficie del capilar y aquellas especies presentes en el electrolito soporte o buffer de corrida que pudieran, en un momento, tener posibilidad de interactuar con la superficie del capilar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los capilares empleados para suprimir las probables adsorciones fueron con recubrimientos de poliacrilamida (PAA) y de alcohol polivinílico (PVA).

Los capilares neutros con recubrimientos de PVA [66, 69] y PAA [66, 99] son usados principalmente en la separación de proteínas por EC, debido a que pueden eliminar eficientemente cualquier interacción potencial de la molécula de proteína con la superficie interna del capilar.

Los resultados de los experimentos realizados con el capilar con recubrimiento de PAA mostraron que todos los antimicóticos excepto el ketoconazol (ver figura 31), se adsorbieron y mostraron electroferogramas semejantes al del miconazol mostrado en la figura 31.

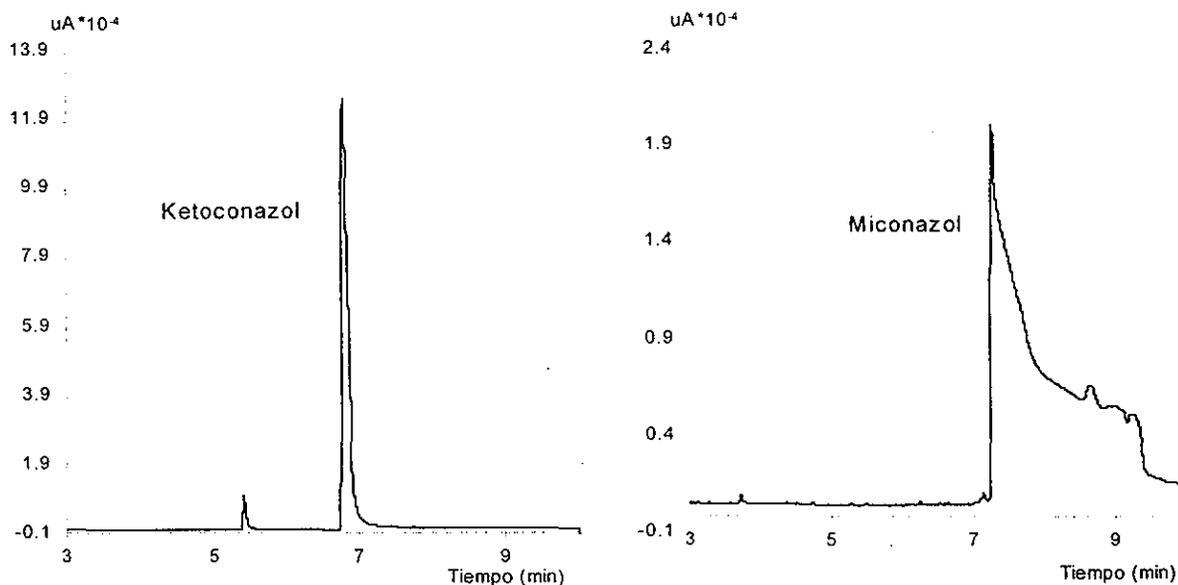


Figura 31. Electroferogramas de ketoconazol y miconazol obtenidos con un capilar con recubrimiento permanente de poliacrilamida (PAA). Condiciones: las mismas que las reportadas en la Fig. 28 con excepción del tipo de capilar y que en este caso no se añadió ningún tipo de selector quiral y que la polaridad aplicada fue normal + 30 kV.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Es decir, este tipo de capilar neutro tampoco fue efectivo con respecto a la eliminación de los fenómenos de dispersión y “peak splitting” para la mayoría de los compuestos. Las corridas se hicieron en ausencia de selector quiral ya que sólo se deseaba observar que la forma de los picos de los antimicóticos fuera normal para posteriormente intentar realizar la separación quiral en presencia de las CD's altamente sulfatadas.

Con respecto al empleo del capilar neutro con recubrimiento de PVA, tampoco se pudieron eliminar los problemas de adsorción y dispersión excesiva en ninguno de los cinco antimicóticos analizados, tal como puede observarse en los electroferogramas presentados en la figura 32 en la cual se muestran, a manera de ejemplo, los resultados para el miconazol y ketoconazol (cabe aclarar que el comportamiento fue similar para el resto de los antimicóticos).

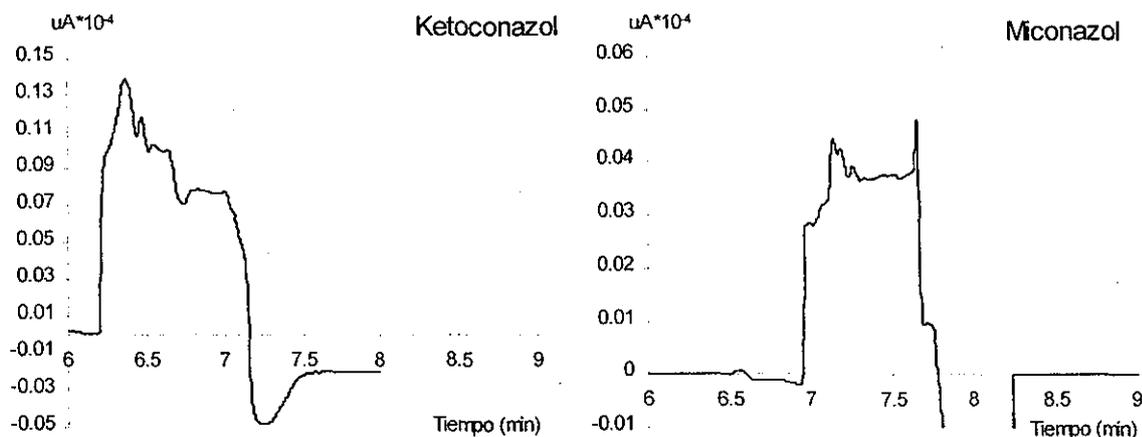


Figura 32. Electroferogramas de ketoconazol y miconazol obtenidos con un capilar con recubrimiento permanente de alcohol polivinílico (PVA). Condiciones: las mismas que las de la Fig. 31 con excepción del tipo de capilar, no se adicionó ningún selector quiral y la polaridad aplicada fue normal + 30 kV.

No quedó definido porqué incluso empleando los capilares recubiertos se presentaron fenómenos de adsorción. Una posible causa pudo haber sido la presencia de grupos silanol residuales en estos capilares debida a un recubrimiento neutro no homogéneo sobre la superficie interna del capilar propiciando con ello las adsorciones. Otra probable causa pudo ser la ocurrencia de interacciones de naturaleza hidrofóbica de las porciones no polares de los analitos con ambos tipos de recubrimiento, de PAA y de PVA, dando origen así a las adsorciones observadas con estos dos tipos de capilar.

Debido a que con ninguno de los dos capilares neutros utilizados se suprimieron las adsorciones de los analitos, el siguiente paso consistió en emplear recubrimientos dinámicos (ver sección 6.4) para saber si este tipo de recubrimiento era más efectivo. Para el presente trabajo se decidió probar dos tipos, uno que consistió en la formación de una capa de moléculas de trietanolamina (TEA) por medio de la interacción de éstas con la superficie interna del capilar de sílice fundida. El otro recubrimiento fue creado mediante la adición de un surfactante catiónico conocido como bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) que al igual que en el caso de la TEA formó una capa molecular sobre la superficie interna del capilar mediante la interacción electrostática de las cargas positivas de estas moléculas con las cargas negativas de los grupos silanol del capilar.

Primeramente se probó trietanolamina (TEA), la cual se sabe por trabajos reportados que puede disminuir significativamente los fenómenos de adsorción en separaciones de este tipo [63]. La forma en que se incorporó este aditivo al buffer de separación fue la siguiente: A una solución de ácido fosfórico se le añadió TEA hasta ajustar el buffer al valor de pH deseado.

Los resultados de estos experimentos son los que aparecen en la figura 33. En estos electroferogramas puede verse que la presencia de TEA eliminó el problema de dobleteo de los picos en todos los antimicóticos, lo cual de alguna manera apoya la suposición de que las anomalías exhibidas en las formas de los picos son debidas a fenómenos de adsorción en la superficie interna del capilar.

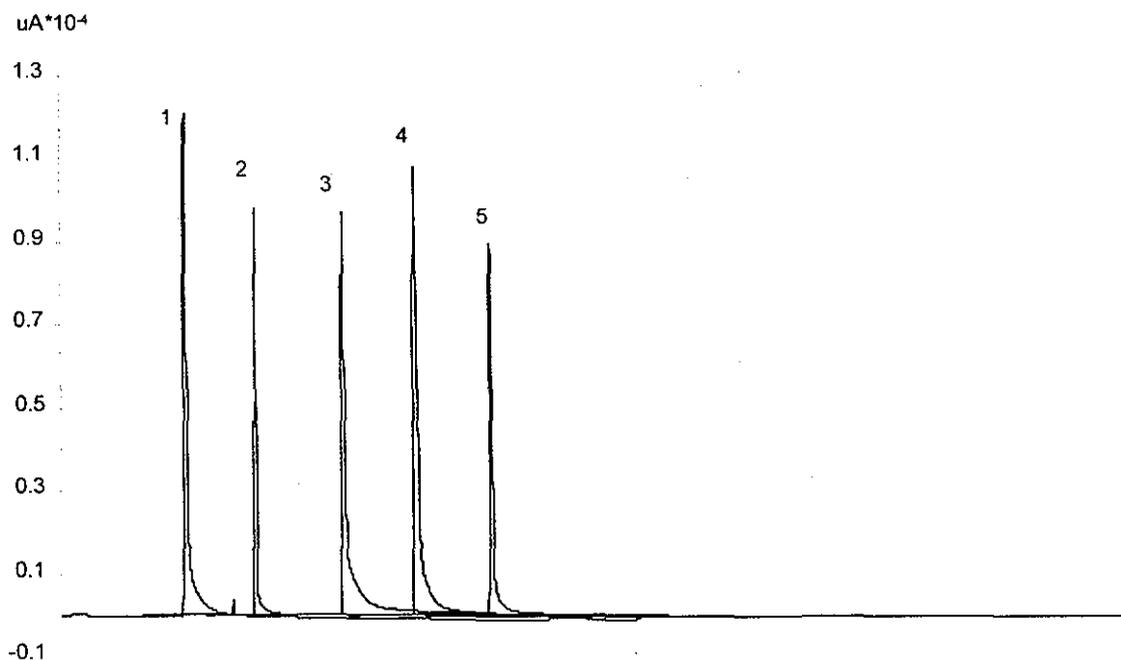


Figura 33. Electroferogramas de: Miconazol (1), Ketoconazol (2), Sulconazol (3), Bifonazol (4) y Econazol (5). Condiciones: buffer de fosfatos 30 mM con adición de TEA hasta ajustar el pH a 2.7, capilar de sílice fundida de 60.2 cm de longitud total (50 cm de longitud al detector), 50 μ m de diámetro interno, con introducción de la muestra por el inlet a 0.5 psi de presión durante 5 segundos a polaridad normal, con voltaje aplicado de 30 kV, 15°C, detección a 200 nm.

Una vez hallada esta alternativa para solucionar nuestro problema experimental, se procedió a realizar los análisis posteriores en presencia de TEA, en los cuales se añadió también HS β CD 5.0 mM. Estos resultados se exhiben en la figura 34-A.

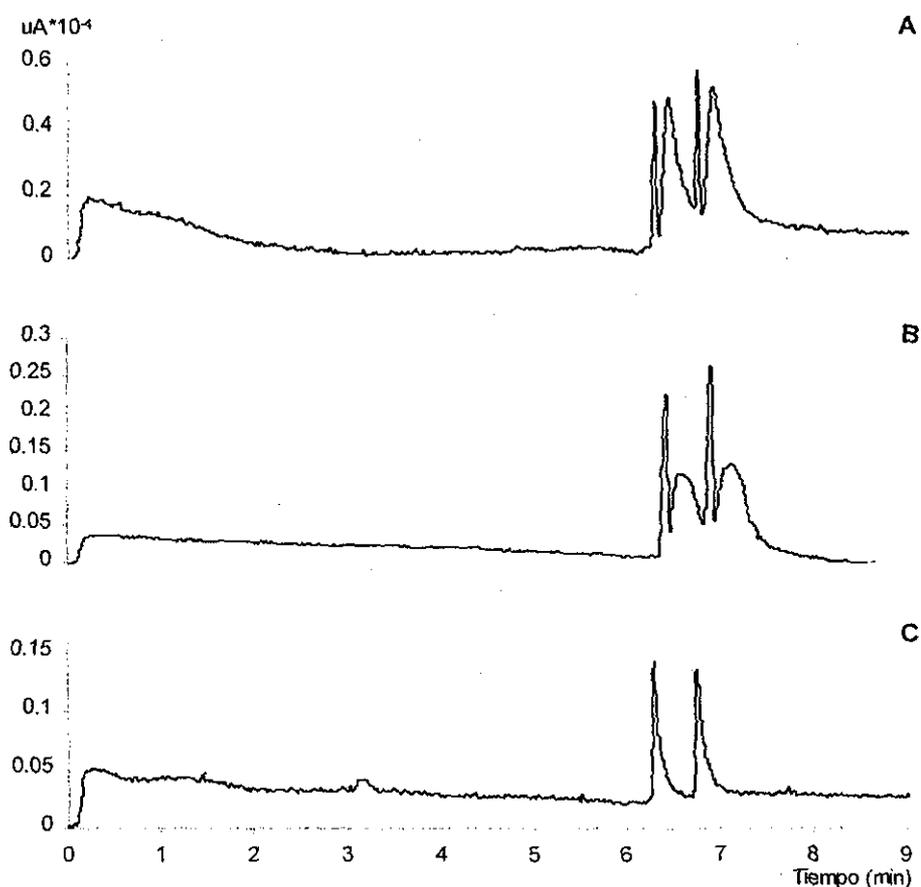


Figura 34. Electroferogramas de la separación de enantiómeros de miconazol a diferentes concentraciones de este antimicótico con HS β CD 5 mM como selector quiral en presencia de TEA. A: miconazol 8×10^{-4} M, B: miconazol 4×10^{-4} M y C: miconazol 8×10^{-5} M. Condiciones: Las mismas que las de la figura 33.

Esta figura muestra que cuando la solución estándar de miconazol (8×10^{-4} M) fue utilizada con buffer con TEA y en presencia de la HS β CD 5.0 mM, se obtuvo un electroferograma en donde, aparte de los dos enantiómeros de miconazol, se pudieron apreciar sendos picos muy dispersos al lado de cada uno de los isómeros. El perfil de este electroferograma difiere notablemente de aquél en que se presume ocurrieron procesos de adsorción, ya que en el primero los picos más anchos y dispersos que migraron próximos a los picos de los de los isómeros, parecen manifestar la presencia de otras especies (figura 34-A).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se realizaron otros experimentos en que se probaron concentraciones menores del analito (miconazol), para ver si la concentración de éste influía en la aparición o formación de los picos dispersos. La figura 34-B muestra el electroferograma resultante del análisis de una solución 4×10^{-4} M de miconazol a las mismas condiciones en que se obtuvo el electroferograma de la figura 34-A. El resultado obtenido con la solución 4×10^{-4} M muestra que la formación de los picos adyacentes disminuyó con respecto a la solución más concentrada del antimicótico. Por tanto, para corroborar este comportamiento, se hizo otro experimento con una solución 10 veces más diluída (8×10^{-5} M) que la solución estándar original, y los resultados de este experimento se presentan en la figura 34-C. Este electroferograma muestra como con una solución lo suficientemente diluída se lograron eliminar los picos dispersos vistos anteriormente, hecho que sugiere que la aparición del dobleteo de los picos está en función de la concentración del analito cuando en la composición del electrolito soporte están presentes la TEA y la HS β CD.

Debido a que el empleo de la TEA no fue del todo satisfactorio, no al menos para dos de las tres concentraciones de miconazol analizadas, respecto a la supresión de los fenómenos de adsorción y desdoblamiento de picos, se realizaron entonces los experimentos con CTAB. Esta molécula es capaz de interaccionar con los grupos silanol del capilar mediante su región ionizada (nitrógeno cuaternario). Para tal efecto, se empleó una concentración 0.1

mM de este surfactante ya que se sabe que a esta concentración el equilibrio entre el CTAB y la superficie del capilar propicia la formación de una capa monomolecular del primero sobre la segunda (ver Fig. 9), con la orientación de la parte hidrofóbica de las moléculas de CTAB hacia el buffer y su porción cargada hacia los grupos silanol del capilar, con la concomitante reducción (casi supresión) del flujo electroosmótico (ver Fig. 35).

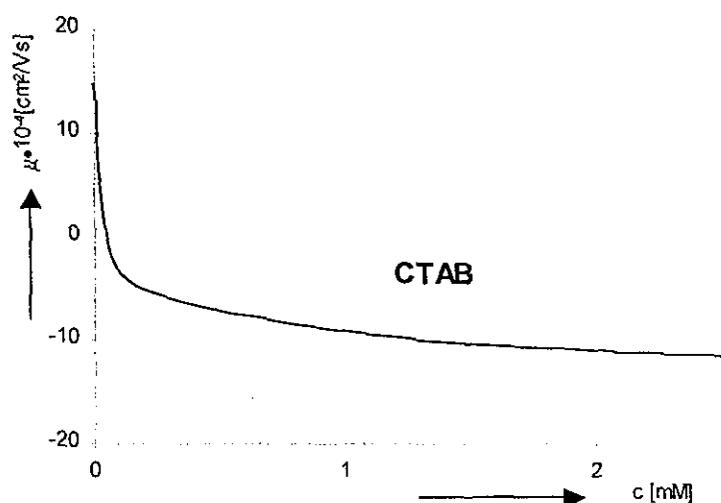


Figura 35. Efecto de la concentración de CTAB en la movilidad del EOF. Condiciones experimentales: capilar de sílice fundida, 100 cm x 75 μm i.d. 30 kV de voltaje aplicado.

Tomado de:

[R. Khun and Hoffstetter-Kuhn, "Capillary electrophoresis: Principles and Practice", Springer Verlag, Berlin 1993].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Antes de intentar separar los enantiómeros de los antimicóticos en presencia de selector quiral, se realizaron corridas para cerciorarnos de que la presencia *per se* de CTAB 0.1 mM no generaba problemas de adsorción o de cualquier otro tipo durante la migración de los analitos en el capilar. Los electroferogramas resultantes no presentaron ninguna evidencia de adsorción o cualquier otro tipo de anomalía para ninguno de los antimicóticos probados (resultados no mostrados).

Posteriormente se llevó a cabo un experimento para determinar la concentración óptima de CTAB. Se emplearon 4 concentraciones de este surfactante (0.025, 0.05, 0.3 y 0.5 mM), para determinar su efecto en la resolución enantiomérica de miconazol utilizando HP β CD como selector quiral. Los resultados de estos análisis son mostrados en las figuras 36 y 37. Los electroferogramas de la figura 36 no exhiben prácticamente diferencias lo cual significa que el efecto del CTAB, al menos en los tiempos de migración y la resolución de los picos de los isómeros de miconazol, es mínimo. Cuantitativamente, esto puede apreciarse mejor en las gráficas de la figura 37 en las cuales puede notarse que tanto las resoluciones (figura 37-A) como los tiempos de migración (figura 37-B) de los isómeros permanecen prácticamente constantes cuando se varía la concentración de CTAB. Considerando lo anterior, en vez de utilizar una concentración 1 mM de este surfactante para los subsecuentes experimentos, se decidió usar una concentración menor (0.05 mM), con la idea de disminuir los efectos de la fuerza iónica del medio que pudieran en un momento dado afectar la calidad de la separación (ya que debe recordarse que el CTAB es un surfactante catiónico).

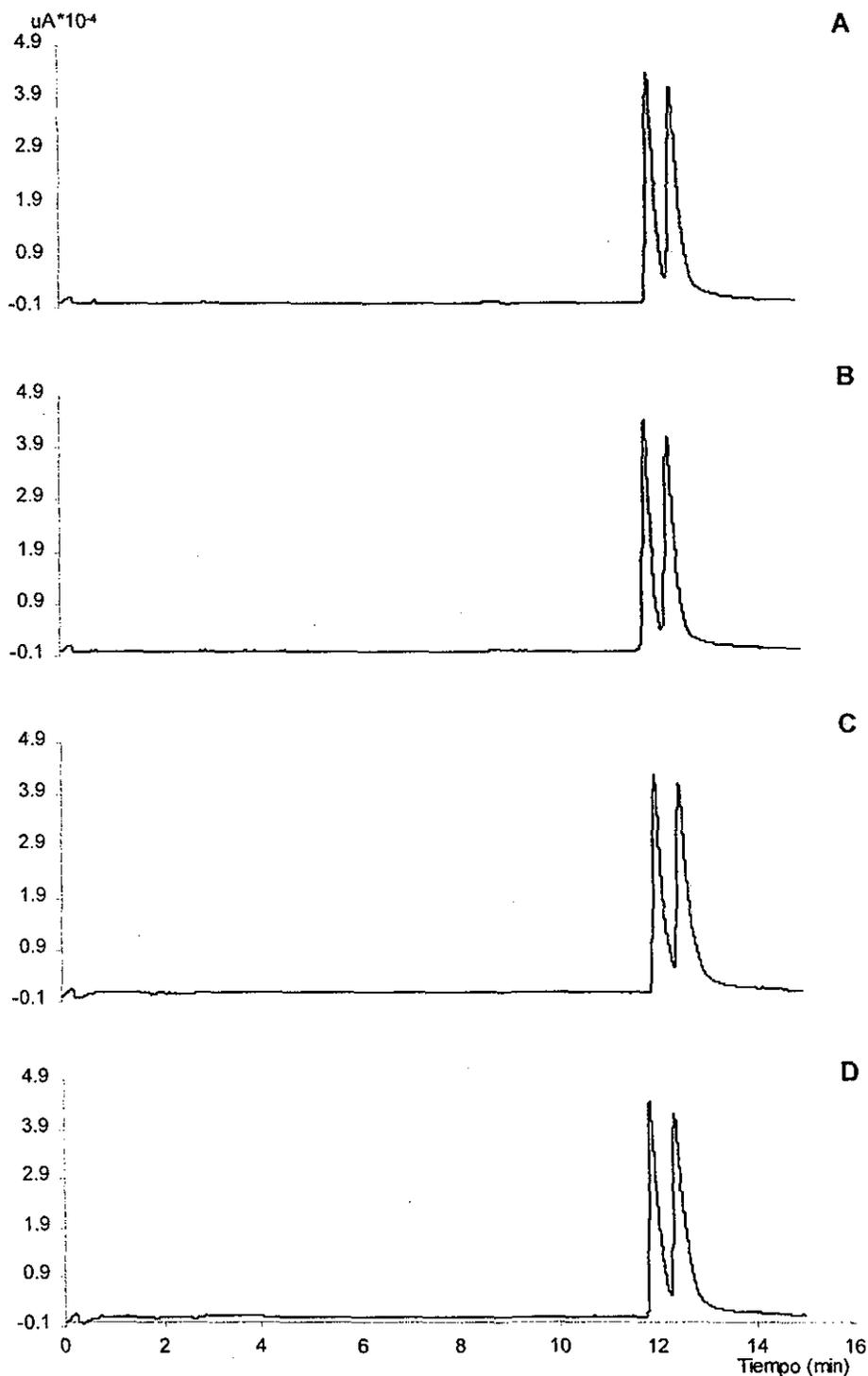


Figura 36. Separación de los enantiómeros de miconazol a diferentes concentraciones de CTAB. A: 0.025; B: 0.05, C: 0.3 y D: 0.5 mM de surfactante. Condiciones: 1 mM de HP β CD; buffer de fosfatos 30 mM pH a 2.7, capilar normal de sílice fundida 60.2 cm de longitud total (50 cm de longitud al detector), 50 μm de diámetro interno, introducción de muestra por inlet a 0.5 psi de presión durante 5 segundos; V = 30 kv; T = 15 $^{\circ}\text{C}$, polaridad normal, detección a 200 nm.

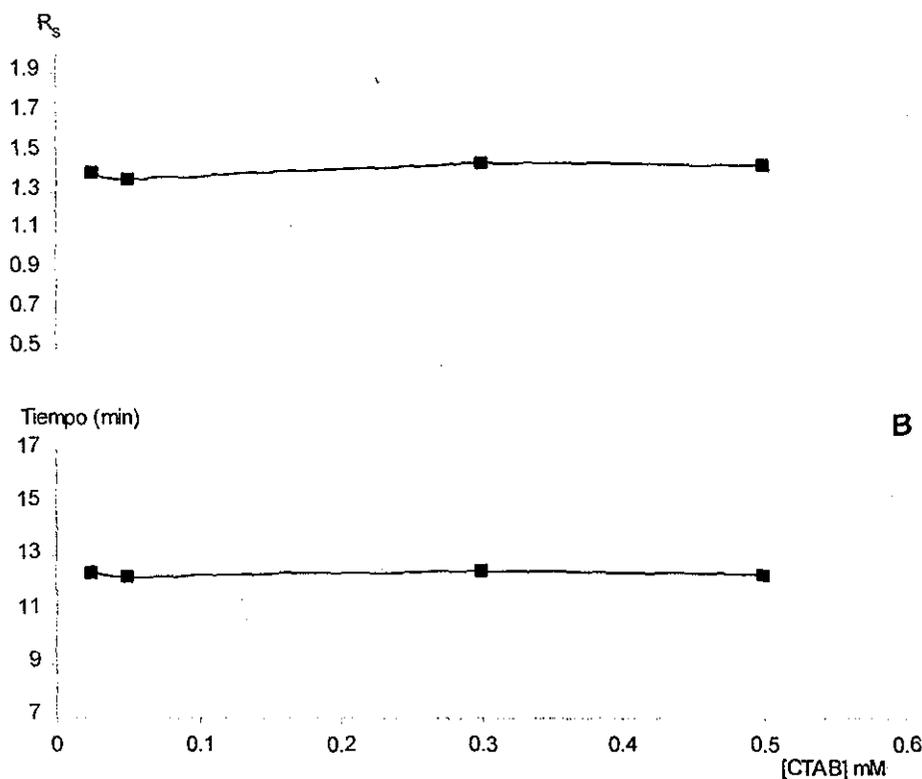


Figura 37. Influencia de la concentración de CTAB en la resolución y tiempos de migración de enantiómeros de miconazol empleando HP β CD como selector quiral.

Cabe mencionar que los anteriores experimentos se llevaron a cabo con la solución más concentrada de miconazol (8×10^{-4} M) y aún en estas condiciones no se apreciaron anomalías en los picos. Es importante comentar que el empleo de la HP β CD en experimentos anteriores nunca proporcionó resultados en donde se apreciaran fenómenos dispersivos o de desdoblamiento de picos, sin embargo, como se estaba introduciendo un nuevo componente al electrolito soporte, se consideró prudente evaluar su influencia también en presencia de esta ciclodextrina.

Una vez establecido el tipo y concentración de recubrimiento dinámico necesario para eliminar los problemas antes mencionados, se procedió a evaluar el efecto de la concentración de HP β CD en la separación enantiomérica de todos los antimicóticos.

Los resultados obtenidos de estos experimentos son mostrados en las figuras 38, 39, 40 y 41 para miconazol, ketoconazol, econazol y sulconazol respectivamente (los enantiómeros de bifonazol no fueron resueltos bajo estas condiciones).

Los electroferogramas de estas figuras muestran cómo en menor o mayor grado las interacciones del selector quiral con los diferentes imidazoles proporcionaron diferentes grados de selectividad, lo cual puede juzgarse a partir de los diferentes grados de resolución obtenidos, sin embargo, pese a estas diferencias, un comportamiento común en todos ellos consistió en los incrementos en los tiempos de migración de los analitos conforme se fue aumentando la concentración de HP β CD, lo cual puede explicarse tomando en cuenta que al estar incrementando la concentración del selector quiral se aumenta simultáneamente la viscosidad del electrolito soporte, lo cual demora el viaje (tiempo) de este último desde su sitio de introducción al de detección.

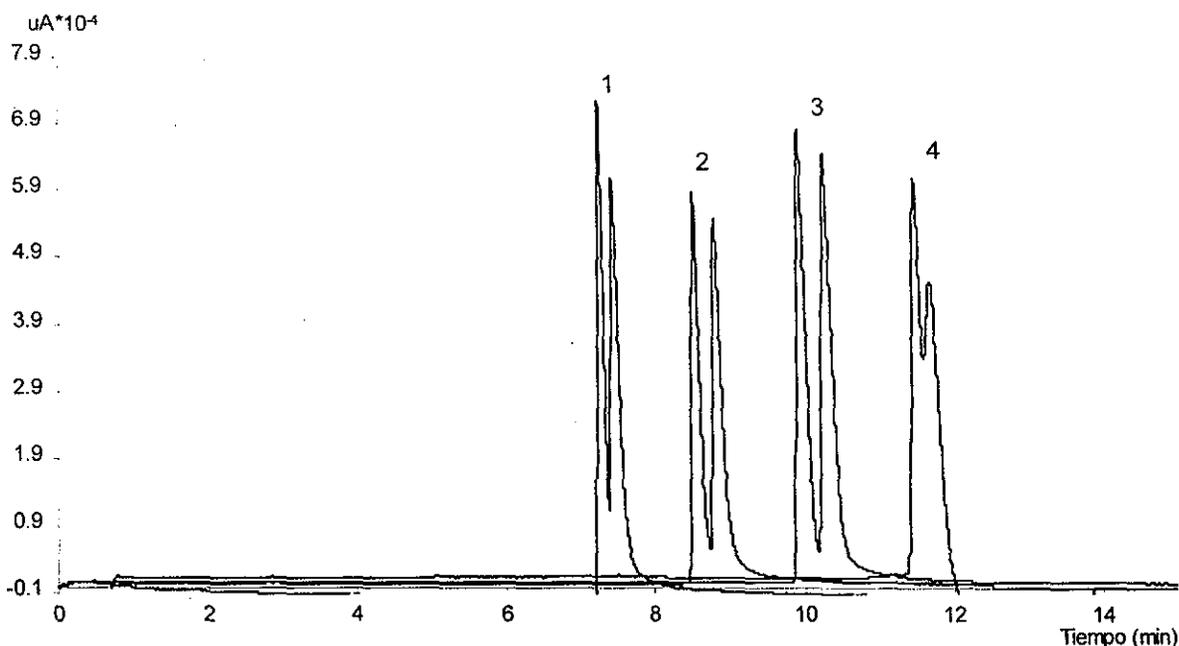


Figura 38. Influencia de la concentración de HP β CD en la resolución enantiomérica de miconazol. 0.5 mM(1), 1 mM(2), 2 mM(3) y 8 mM(4). Condiciones: las mismas que en la figura 36.

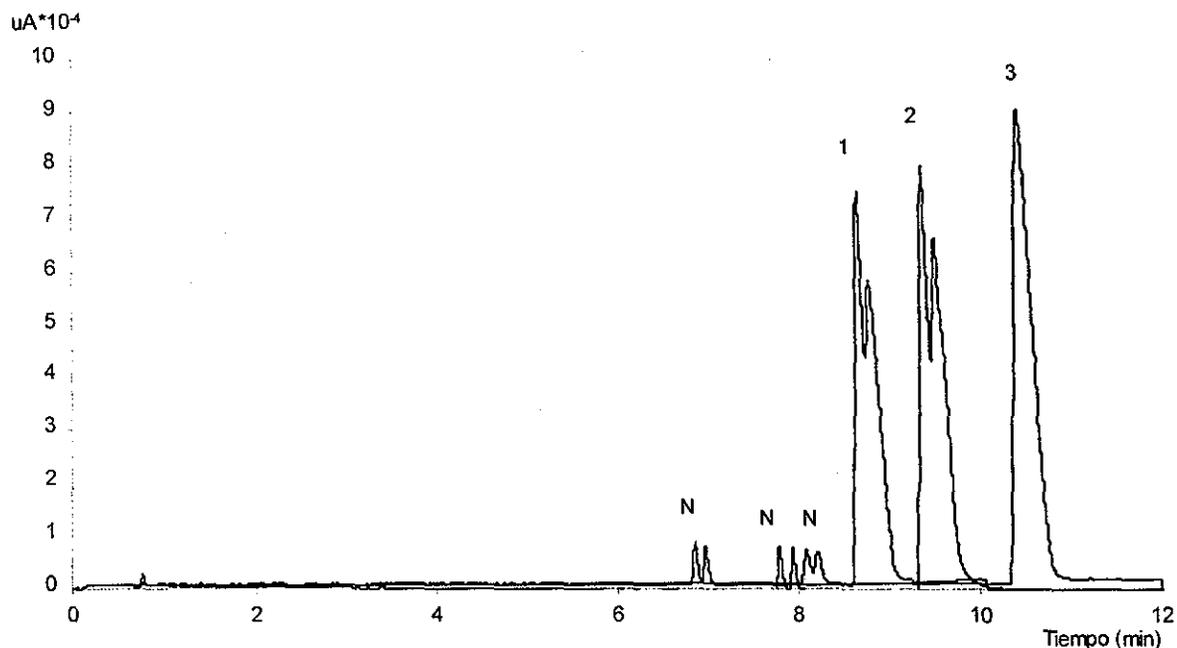


Figura 39. Influencia de la concentración de HP β CD en la resolución enantiomérica de ketoconazol. 0.5 mM(1), 2 mM(2), 3 mM(3). N= desconocido. Condiciones: las mismas que las de la Fig. 36.

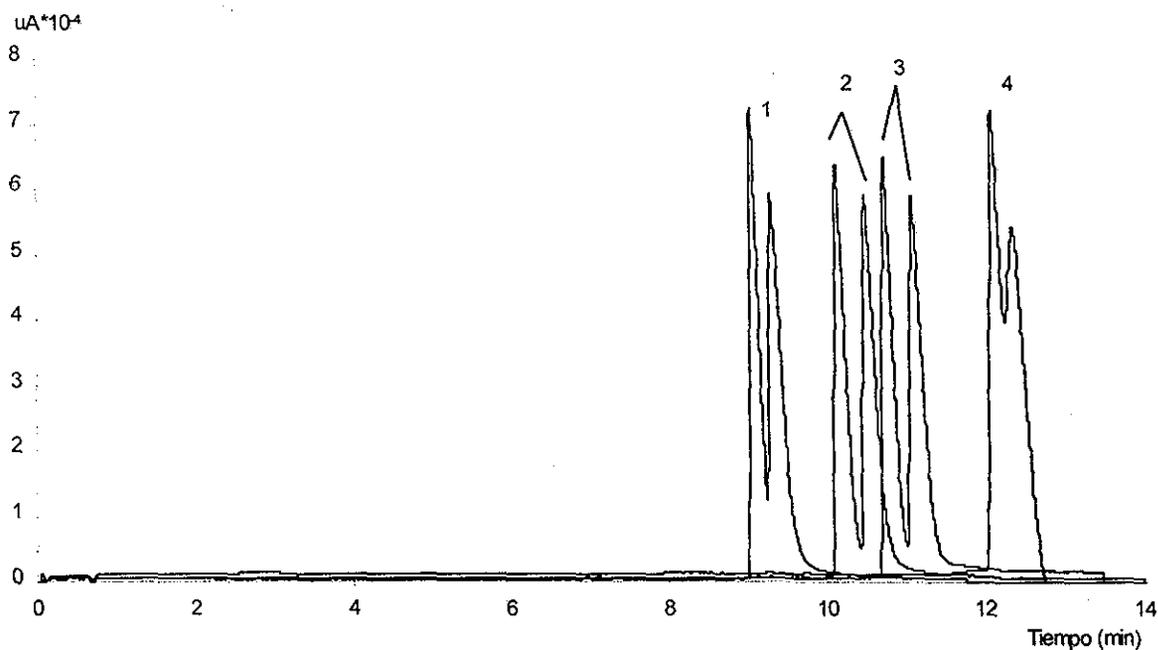


Figura 40. Influencia de la concentración de HP β CD en la resolución enantiomérica de econazol 0.5 mM(1); 2 mM(2); 3 mM(3) y 8mM(4). Condiciones: ídem a las de la Fig.36.

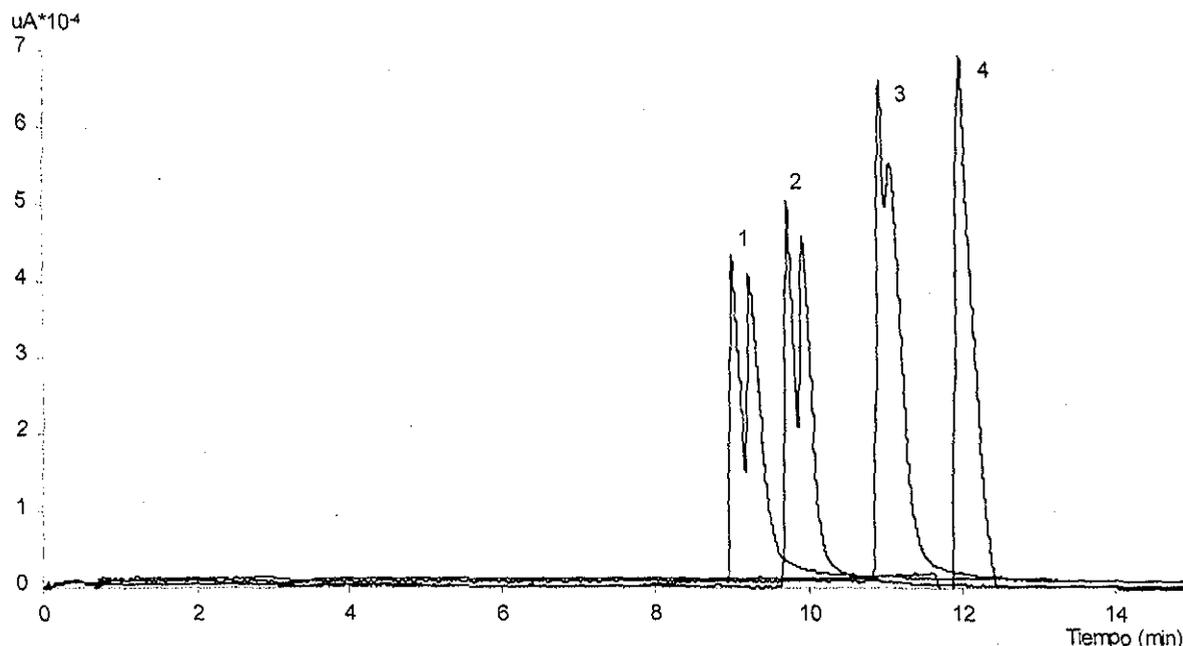


Figura 41. Influencia de la concentración de HPβCD en la resolución enantiomérica de sulconazol. 0.5 mM(1); 1 mM(2); 2 mM(3) y 3mM(4). Condiciones: las mismas que las de la Fig. 36.

La tabla 8 contiene los valores obtenidos de resolución entre los picos de los dos isómeros para cada antimicótico así como el tiempo de análisis (tiempo de migración del segundo pico) de los experimentos descritos.

Tabla 8. Influencia de la concentración de HPβCD en la separación enantiomérica de antimicóticos derivados del imidazol.

[HPβCD] mM	<i>Econazol</i>		<i>Ketoconazol</i>		<i>Miconazol</i>		<i>Sulconazol</i>	
	t_r	R_s	t_r	R_s	t_r	R_s	t_r	R_s
0.5	9.30	0.85	8.80	0.43	7.43	0.90	9.20	0.94
1.0	9.55	1.22	9.31	0.47	8.80	1.59	9.90	0.69
2.0	10.50	1.78	9.37	0.78	10.26	1.24	11.05	0.30
3.0	11.10	1.18	10.5	0.00	10.57	0.97	11.14	0.00
8.0	12.37	0.56	11.42	0.00	11.68	0.55	11.94	0.00

t_r *= tiempo de retención del segundo pico

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Puede apreciarse en **negritas** en esta tabla, que el valor máximo de resolución para el miconazol fue de $R_s = 1.59$ para una concentración 1 mM de HP β CD. En los casos del ketoconazol y econazol se obtuvieron resoluciones máximas de 0.78 y 1.78 respectivamente con HP β CD 2 mM. Finalmente, los isómeros de sulconazol fueron separados con $R_s = 0.94$ en presencia de HP β CD 0.5 mM.

Un hecho interesante ocurrido durante estos experimentos consistió en que, en presencia de CTAB, los isómeros de ketoconazol sí fueron en cierto grado separados cuando se usó la HP β CD, tal como puede apreciarse en la figura 39. Como se recordará, el empleo de esta CD sin surfactante no separó en ningún grado a los enantiómeros de este antimicótico, no al menos a las concentraciones probadas (ver figura 25). Esto podría ser explicado considerando que la presencia de CTAB en el buffer modificó la velocidad del EOF.

El efecto neto del CTAB a la concentración empleada es el de una disminución del EOF debido a que la formación de una capa monomolecular de éste sobre la superficie del capilar actúa como una especie de recubrimiento neutro. Considerando que tanto el EOF como la movilidad electroforética efectiva del antimicótico actúan en la misma dirección, entonces una disminución del primero necesariamente tiene que disminuir la movilidad electroforética aparente (la suma de ambas) del analito. Esto a su vez repercute en el tiempo que el analito permanece en el interior del capilar y, por ende, en el tiempo que el analito y el selector quiral permanecen interaccionando. Por tanto, es muy probable que la ausencia y presencia de separación enantiomérica en los experimentos sin y con CTAB, respectivamente, se deba principalmente a las citadas diferencias en los tiempos de interacción entre el ketoconazol y la HP β CD. Este efecto puede apreciarse mejor en la

figura 42 en que se graficaron los tiempos de migración del ketoconazol en función de la concentración de HP β CD en presencia y en ausencia de CTAB. En esta figura, puede notarse que el CTAB aumentó el tiempo de migración de este analito.

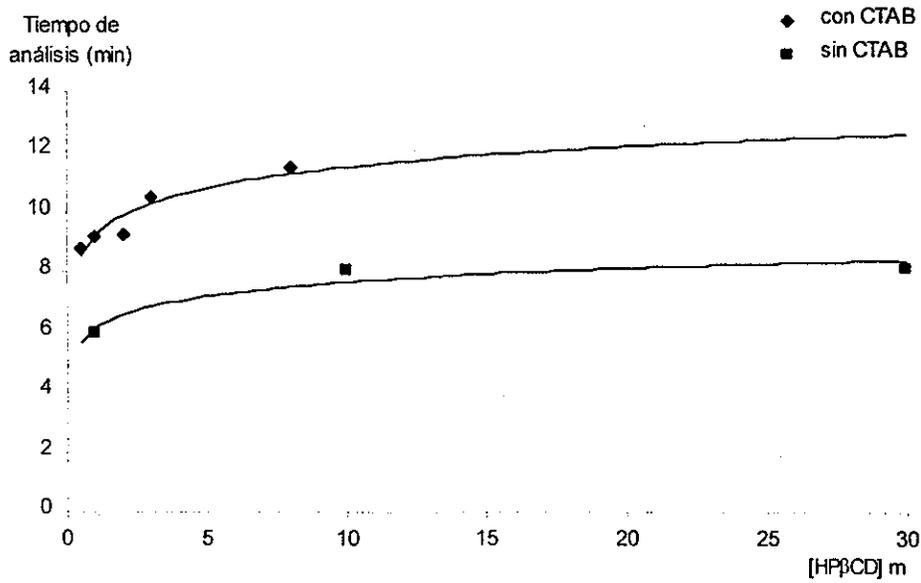


Figura 42. Gráfica de la influencia de la presencia y ausencia de CTAB en los tiempos de análisis de la separación de los isómeros de ketoconazol.

Posterior a estos experimentos se llevó a cabo un análisis de la influencia del pH en la resolución de los enantiómeros de los cuatro antimicóticos que fueron, al menos; parcialmente resueltos. Para ello, se probaron cuatro diferentes valores de pH, a saber: 2.21, 2.7, 3.67 y 4.23. En estos análisis cada antimicótico fue probado a su concentración óptima hallada de HP β CD. Estos resultados son presentados en las figuras 43, 44, 45 y 46.

Como puede observarse en estas figuras, la resolución enantiomérica de todos los analitos dependió, en mayor o menor grado, del pH. Puede notarse que en todos los casos al ir aumentando el valor de pH del electrolito soporte, el tiempo de migración de los

antimicóticos fue disminuyendo, éste es un efecto esperado tomando en cuenta que a medida que se incrementa el pH, el EOF aumenta (incluso en presencia del CTAB) y como el EOF y la migración de los analitos viajan en el mismo sentido el efecto neto es un aumento en las movilidades electroforéticas de los antimicóticos con su concomitante decremento en los tiempos de migración.

Es importante hacer notar que la separación enantiomérica llevada a cabo en presencia de CTAB, mejora al disminuir el pH, es decir cuando el vector del EOF es materialmente nulo. Esto hace que los analitos tengan mucho mas tiempo de residencia dentro del capilar y por lo tanto mucho mas tiempo para interactuar con la HP β CD, por lo tanto los tiempos de análisis son mayores.

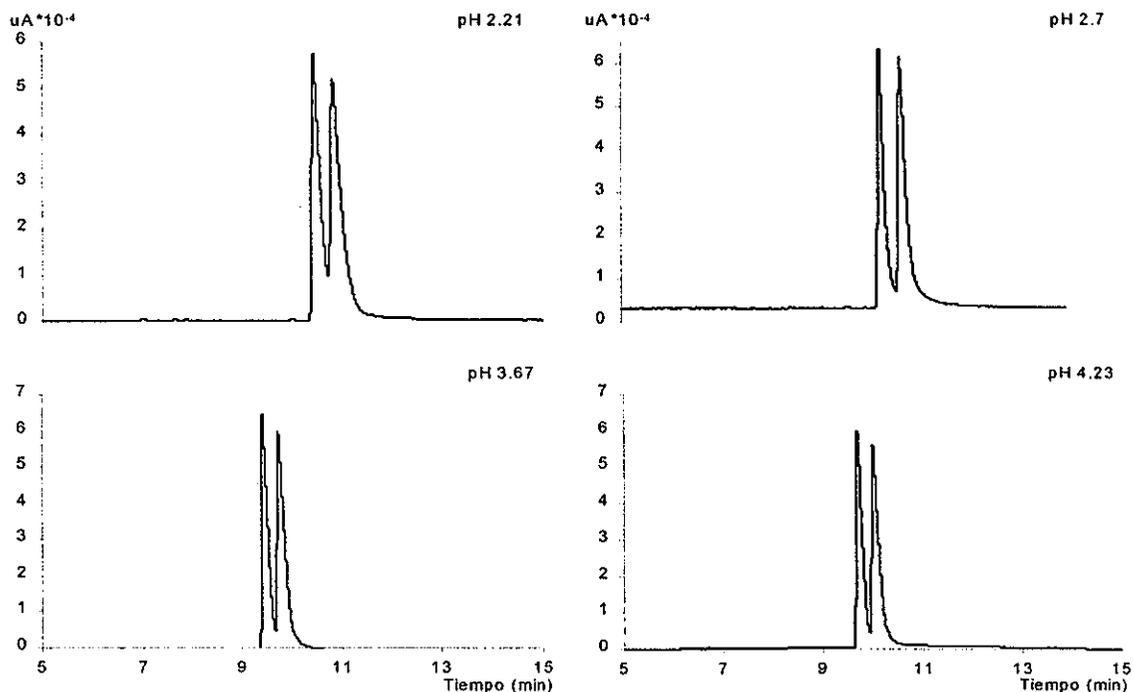


Figura 43. Influencia del pH en la separación enantiomérica de econazol. Condiciones: CTAB 0.05 mM, HP β CD 2.0 mM, el resto de las condiciones iguales que en la figura 36.

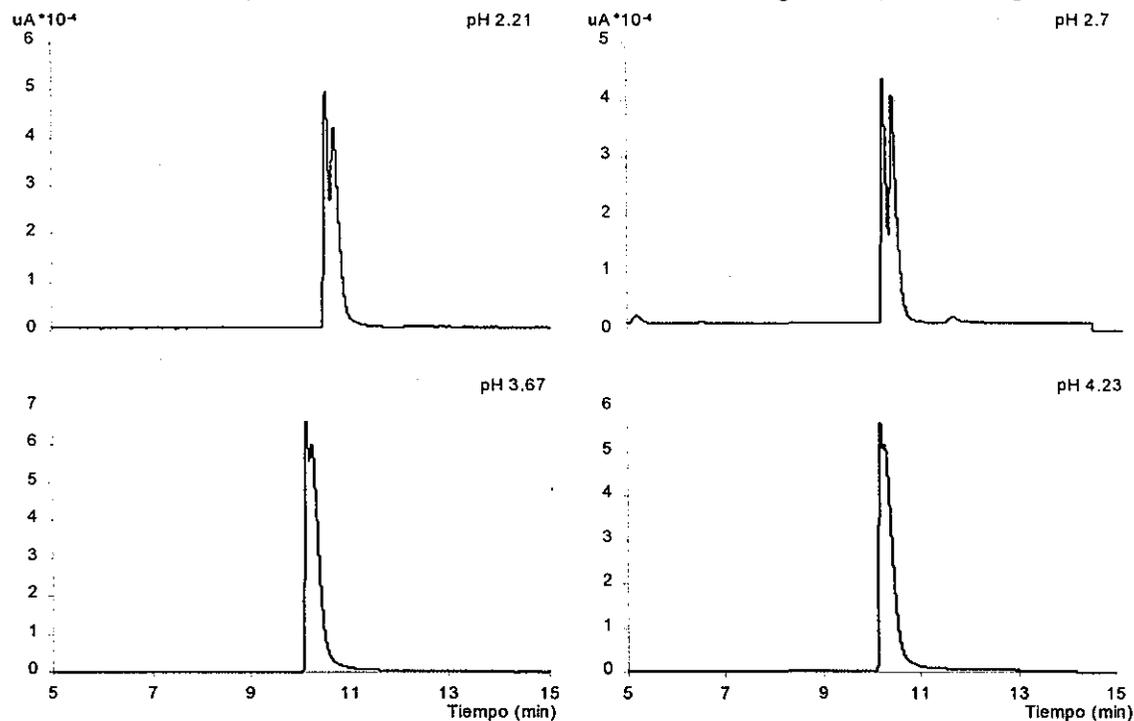


Figura 44. Influencia del pH en la separación enantiomérica de ketoconazol. Condiciones: las mismas que las de la figura 43.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

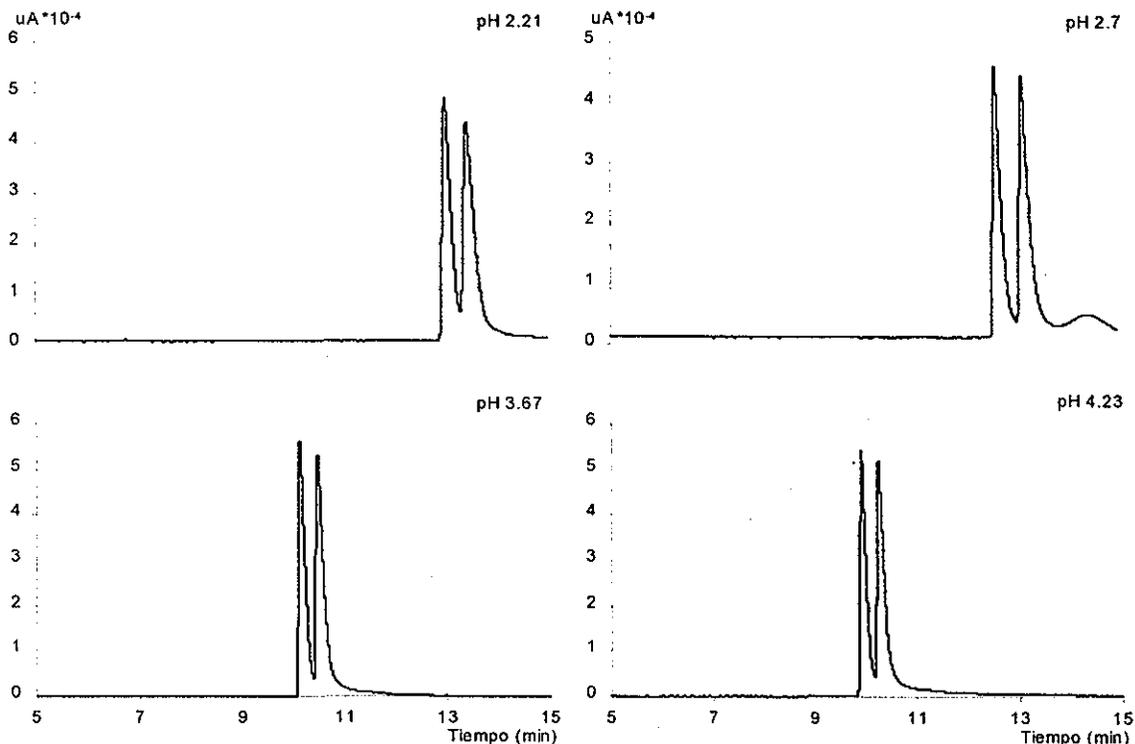


Figura 45. Influencia del pH en la separación enantiomérica de miconazol. Condiciones: HP β CD 1.0 mM, el resto de las condiciones fueron las mismas que las de la figura 43.

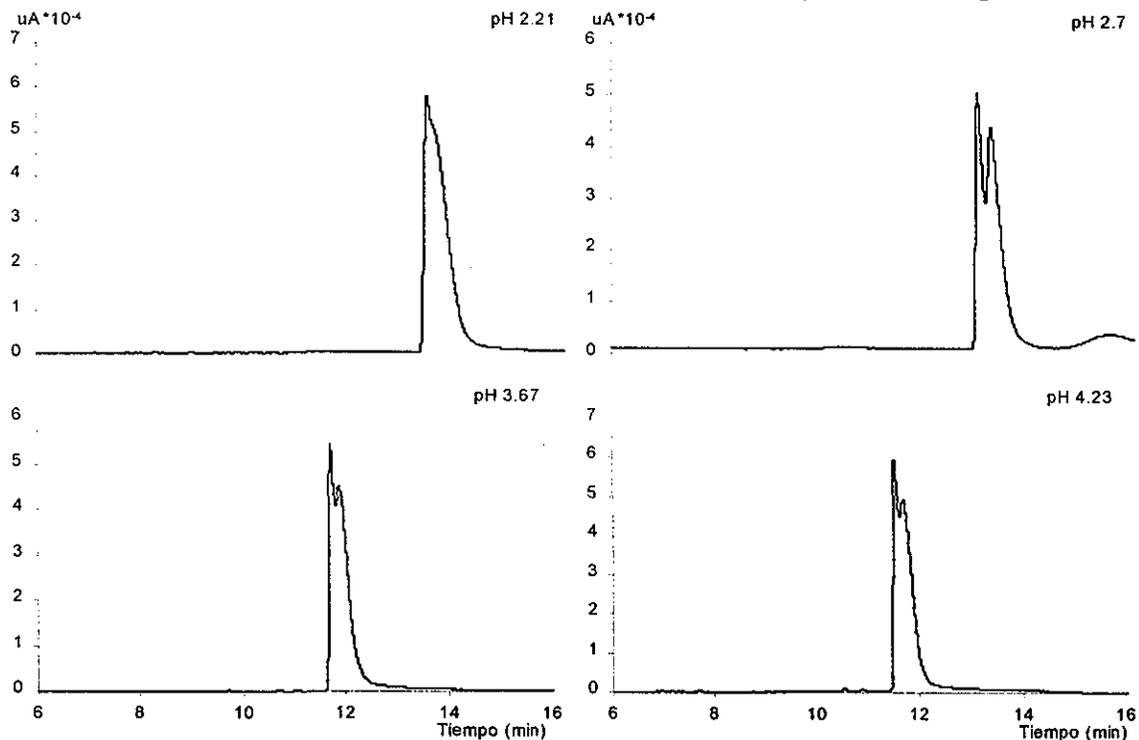


Figura 46. Influencia del pH en la separación enantiomérica de sulconazol. Condiciones: HP β CD 0.5 mM, el resto de las condiciones fueron las mismas que las de la figura 43.

Las mejores separaciones (resoluciones más altas) para los isómeros de econazol, ketoconazol, miconazol y sulconazol, en presencia de CTAB 0.05 mM, se lograron bajo las condiciones de pH y concentración de HPβCD que en la tabla 9 se presentan.

Tabla 9. Condiciones óptimas de separación quiral para derivados del imidazol empleando HPβCD como selector quiral en presencia de CTAB.

<i>Antimicótico</i>	<i>t_r[*]</i> (min)	<i>R_s</i>	<i>pH</i>	<i>[HPβCD]</i> mM
Econazol	10.70	1.78	2.7	2.0
Ketoconazol	10.55	0.78	2.7	2.0
Miconazol	13.12	1.59	2.7	1.0
Sulconazol	13.50	0.94	2.7	0.5

t_r^{}*= tiempo de retención del segundo pico

10.5-Evaluación de las ciclodextrinas altamente sulfatadas como selectores quirales en presencia de CTAB (influencia de la concentración de selector quiral y del pH en la resolución enantiomérica de derivados del imidazol)

Después de haber probado la HPβCD en presencia de CTAB, se procedió a evaluar a las CD's altamente sulfatadas como selectores quirales para la separación enantiomérica de todos los antimicóticos.

Al igual que en los experimentos anteriores, también se evaluaron tanto la concentración de selector quiral como el pH además del tipo de CD (α, β y γ HSCD) con el resto de las condiciones mantenidas constantes, excepto la polaridad que en este caso fue inversa,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

considerando que la presencia de gran una cantidad de grupos sulfato en este tipo de CD's le imparte al complejo formado entre ésta y el analito una carga neta negativa, razón por la cual la detección de los analitos, pese a estar cargados positivamente, ocurre en el ánodo.

Los resultados de los experimentos hechos con la HS α CD no mostraron ninguna separación con ninguno de los antimicóticos a ninguna de las concentraciones probadas (resultados no mostrados). Posteriormente se evaluó la influencia de la concentración de la HS β CD en la separación quiral de todos los antimicóticos (cuyas gráficas de resolución vs. concentración de HS β CD son mostradas en la figura 47). Los EFG's de estos resultados son exhibidos en las figuras 48, 49, 50 y 51 para econazol, ketoconazol, miconazol y sulconazol respectivamente. No fue posible separar los isómeros de bifonazol empleando esta CD. A diferencia de los resultados obtenidos para la separación de los enantiómeros de miconazol usando HP β CD como selector quiral (ver figura 45), la concentración óptima de la HS β CD no parece haber alcanzado su máximo tal como puede apreciarse en la figura 46. De acuerdo con las tendencias de las gráficas de esta figura, es probable que se hubiesen obtenido resoluciones superiores de haberse probado concentraciones mayores a 20 mM de HS β CD. Sin embargo, la razón para no haberlo hecho se debió a que, empleando concentraciones de 25 mM en adelante, los niveles de la corriente generada superaban los 300 mV lo cual puede afectar notablemente la línea base de los electroferogramas y en general a la calidad de la separación, amén de que no es recomendable operar el equipo de electroforesis bajo estas condiciones.

Resultados semejantes respecto a la influencia de la concentración de selector quiral en la separación de enantiómeros han sido reportados en diversos estudios [100-102].

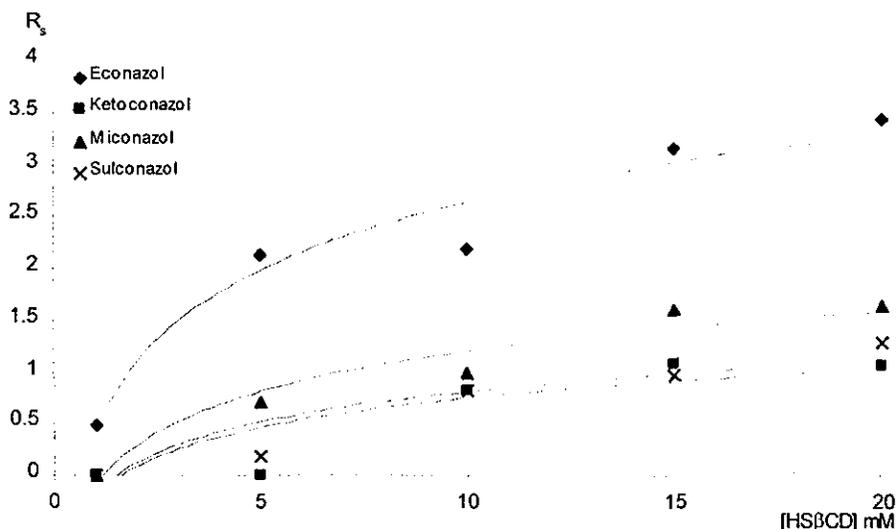


Figura 47. Efecto de la concentración de $HS\beta CD$ en la separación de enantiómeros de diversos antimicóticos derivados del imidazol.

Tomando en cuenta que con ninguna de las CD's hasta ese momento probadas se había logrado separación alguna de los isómeros del bifonazol, se decidió utilizar la $HS\gamma CD$ a diferentes concentraciones principalmente para determinar si podría interactuar de manera enantioselectiva con los enantiómeros de este antimicótico. Si se considera que de las cinco moléculas estudiadas, la de bifonazol es la más grande (ver figura 12) y que los estereoisómeros del resto de ellas fueron separados en mayor o menor grado con beta ciclodextrinas ($HP\beta CD$ y $HS\beta CD$) entonces una CD más grande, como lo es la $HS\gamma CD$, podría teóricamente interactuar más eficientemente con los isómeros de bifonazol y así lograr su enantioresolución, debido a que esta CD posee una cavidad hidrofóbica mayor que la de la $HS\beta CD$ (ver sección 7.1). Adicionalmente, se evaluó también al resto de los antimicóticos con la susodicha CD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

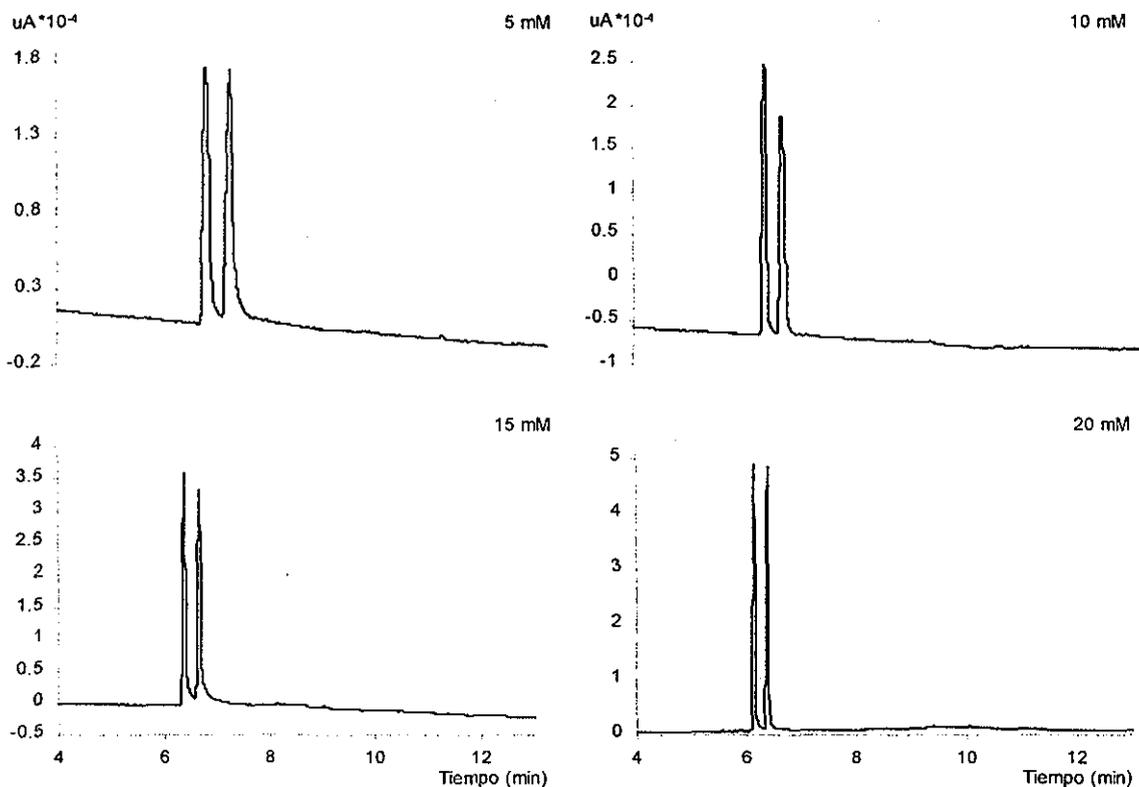


Figura 48. Influencia de la concentración de HSB̢CD en la separación quiral de econazol. Condiciones: buffer de fosfatos 30 mM pH 2.7, CTAB 0.05 mM polaridad Inversa, -30 kV de voltaje aplicado, el resto de las condiciones iguales a las de la figura 36.

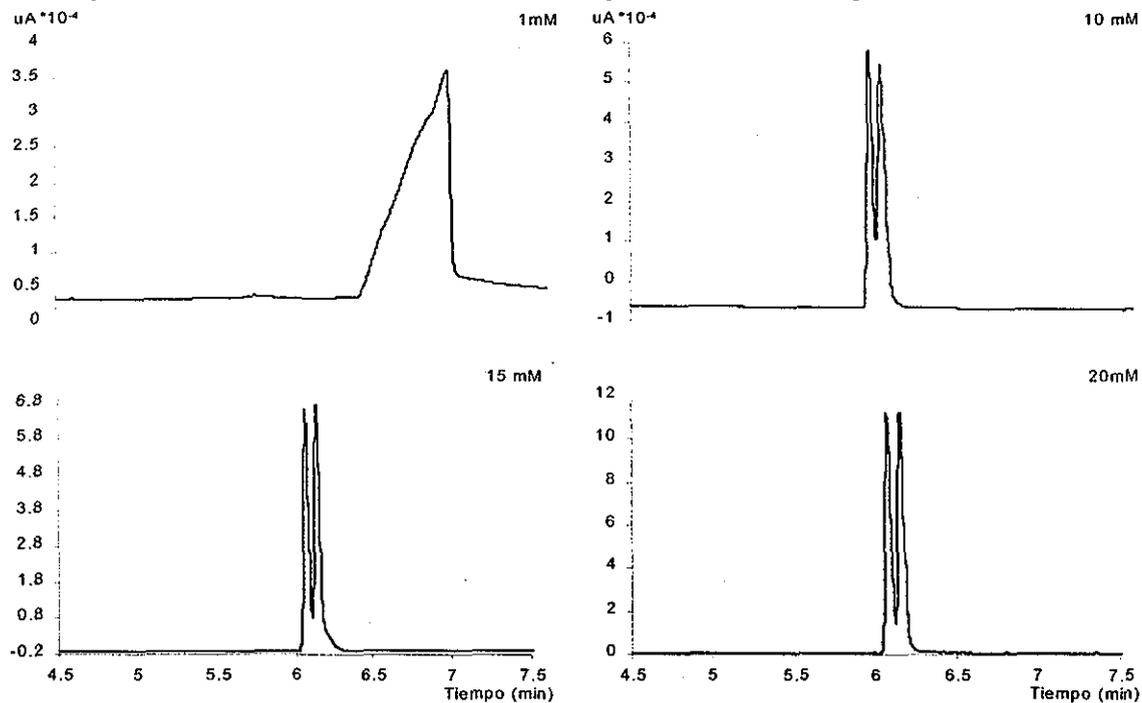


Figura 49. Influencia de la concentración de HSB̢CD en la separación quiral de ketoconazol. Condiciones: las mismas que las de la figura 48.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

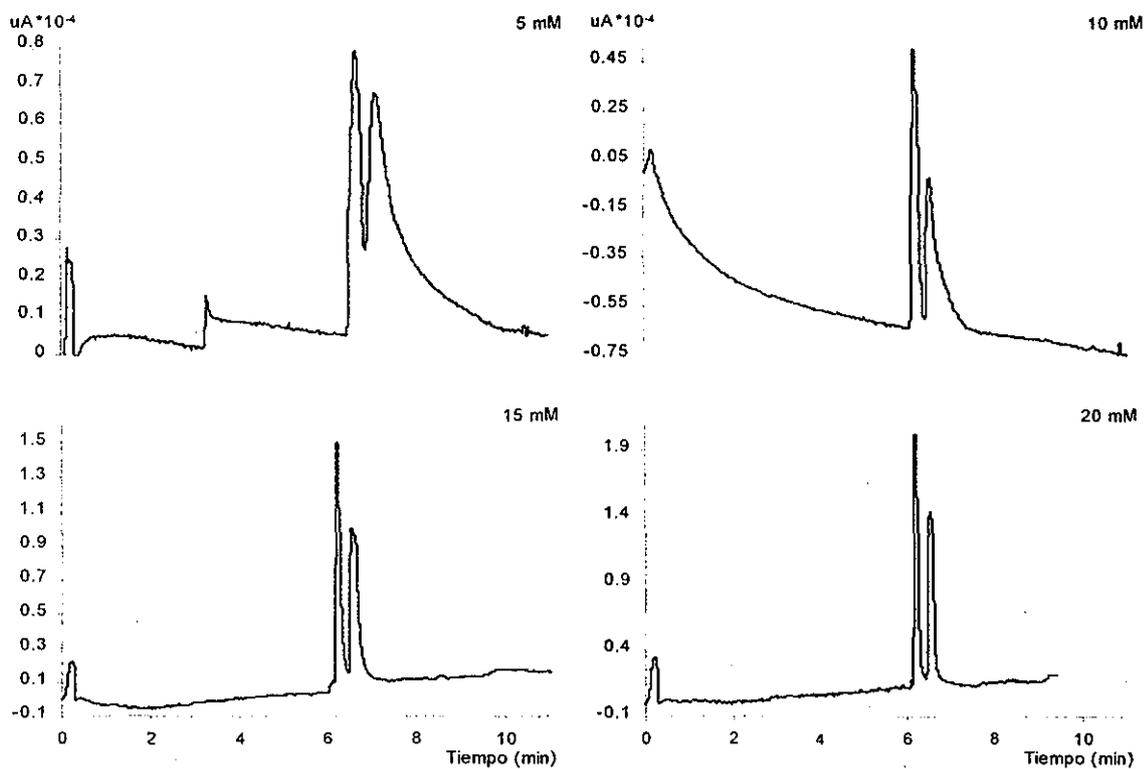


Figura 50. Influencia de la concentración de HSβCD en la separación quiral de miconazol. Condiciones: las mismas que las de la figura 48.

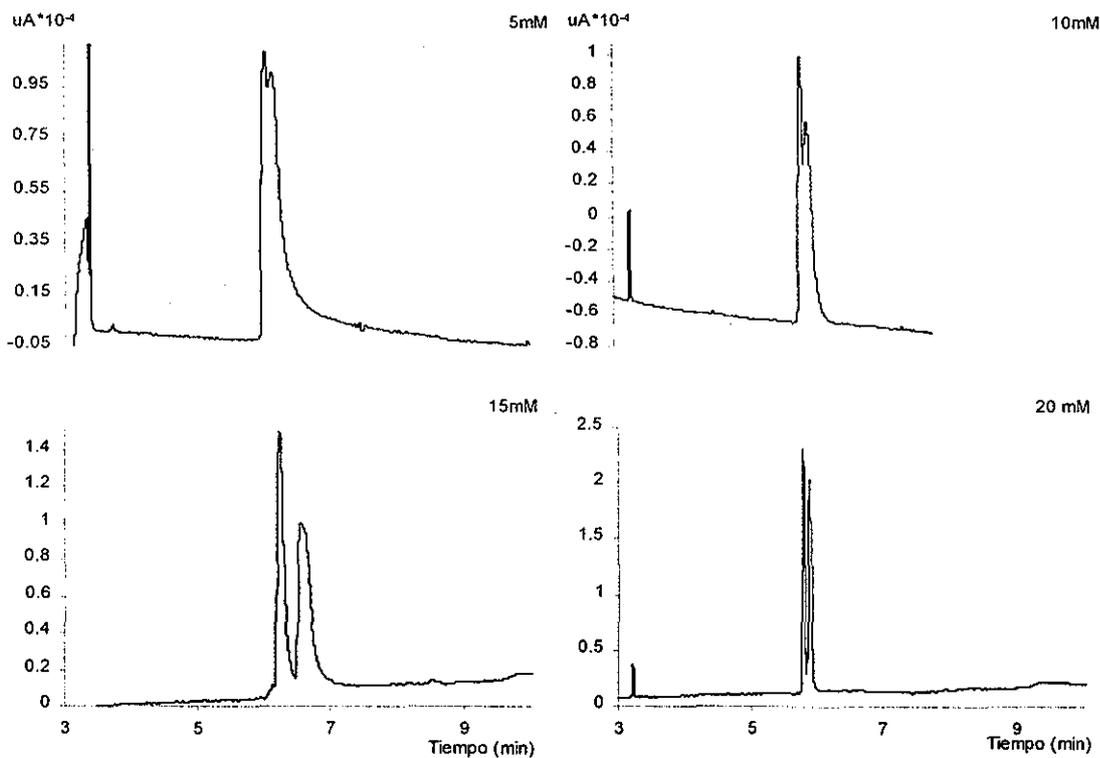


Figura 51. Influencia de la concentración de HSβCD en la separación quiral de sulconazol. Condiciones: las mismas que las de la figura 48.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De los 5 derivados del imidazol, tres de ellos, el bifonazol, el econazol y el ketoconazol fueron quiralmemente separados empleando la HS γ CD. La figura 52 muestra una gráfica de resolución contra concentración de HS γ CD para el bifonazol, econazol y ketoconazol en donde se aprecian tendencias muy parecidas a las acaecidas con la HS β CD (ver figura 47).

Los EFG's de las separaciones logradas en estos análisis son mostradas en las figuras 53, 54 y 55 para bifonazol, econazol y ketoconazol respectivamente. Cabe mencionar que, a diferencia con la HS β CD, con la HS γ CD se pudieron emplear concentraciones ligeramente superiores a 20 mM (e.g. 25 mM) ya que con este selector no se presentaron de manera tan intensa los problemas de corrientes elevadas antes mencionados.

No es de sorprender que el bifonazol y ketoconazol hayan presentado interacciones enantioselectivas con la HS γ CD ya que ambas moléculas son las que poseen las porciones hidrofóbicas de mayor tamaño (ver figura 12 pág. 58) que por tanto pueden ser más fácilmente embebidas en la cavidad de esta CD. Respecto a la separación de los isómeros de econazol por medio de este selector quiral, tal vez es menos fácil proponer una explicación si se toma en cuenta que esta molécula es sumamente parecida a las de miconazol y sulconazol, tal como puede apreciarse en la figura 12, y por ende uno esperaría un comportamiento similar, pero al parecer la presencia de un átomo más de cloro en uno de los anillos aromáticos del miconazol, y la substitución de un átomo de oxígeno por uno de azufre como uno de los substituyentes en el carbono quiral en la molécula de sulconazol, con respecto a la molécula de econazol, no favorecen la formación de interacciones enantioselectivas entre la HS γ CD y estos dos antimicóticos, a diferencia de lo que ocurre entre el econazol y esta CD.

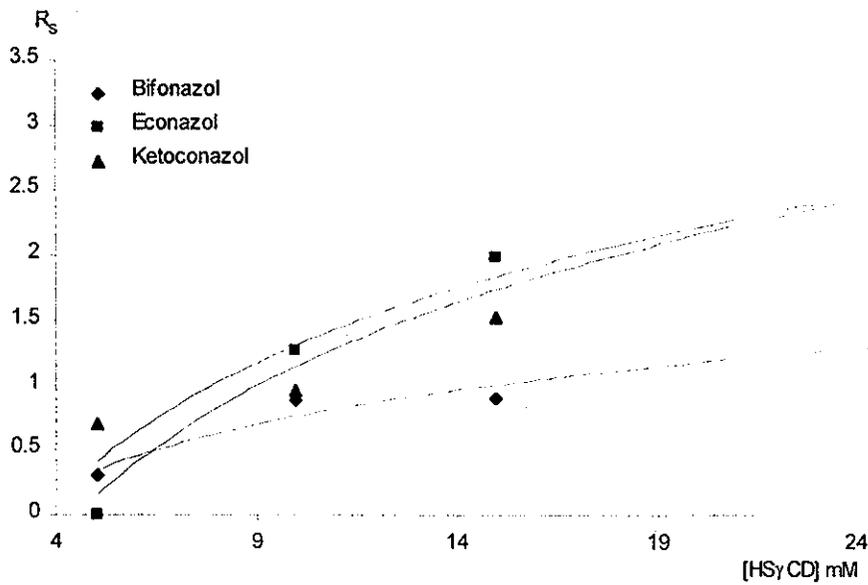


Figura 52. Efecto de la concentración de HSyCD en la resolución de enantiómeros de bifonazol, econazol y ketoconazol.

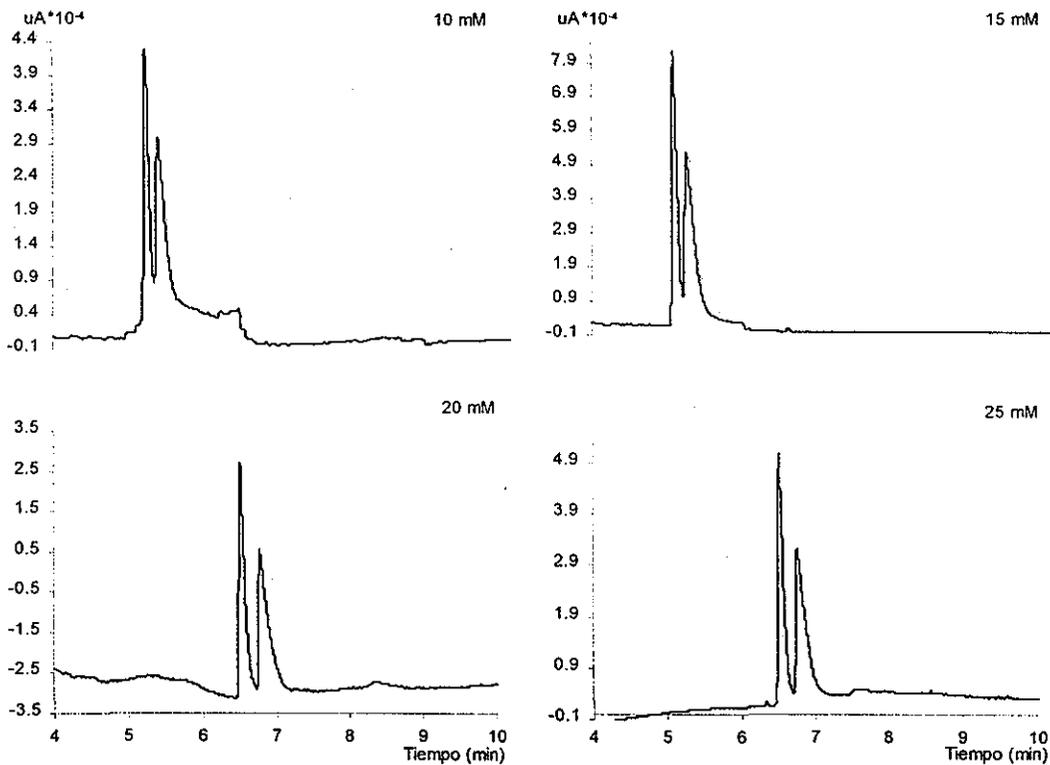


Figura 53. Influencia de la concentración de HSyCD en la separación quiral de bifonazol. Condiciones: las mismas que las de la figura 48.

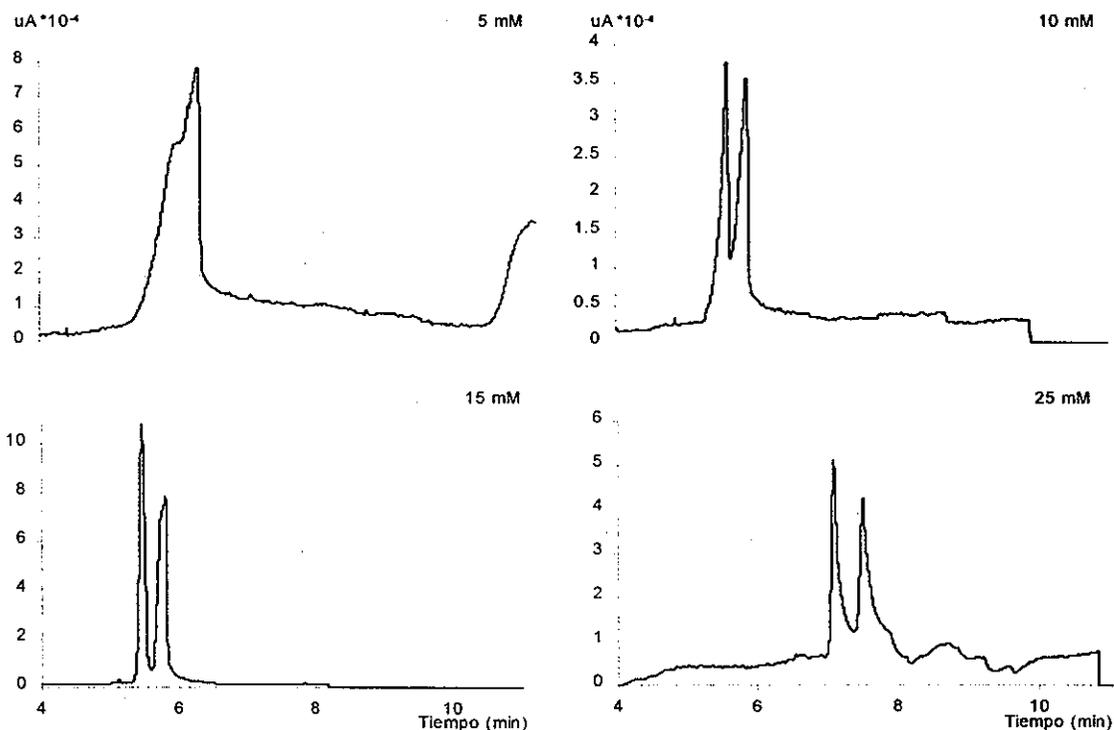


Figura 54. Influencia de la concentración de HSyCD en la separación quiral de econazol. Condiciones: las mismas que las de la figura 48.

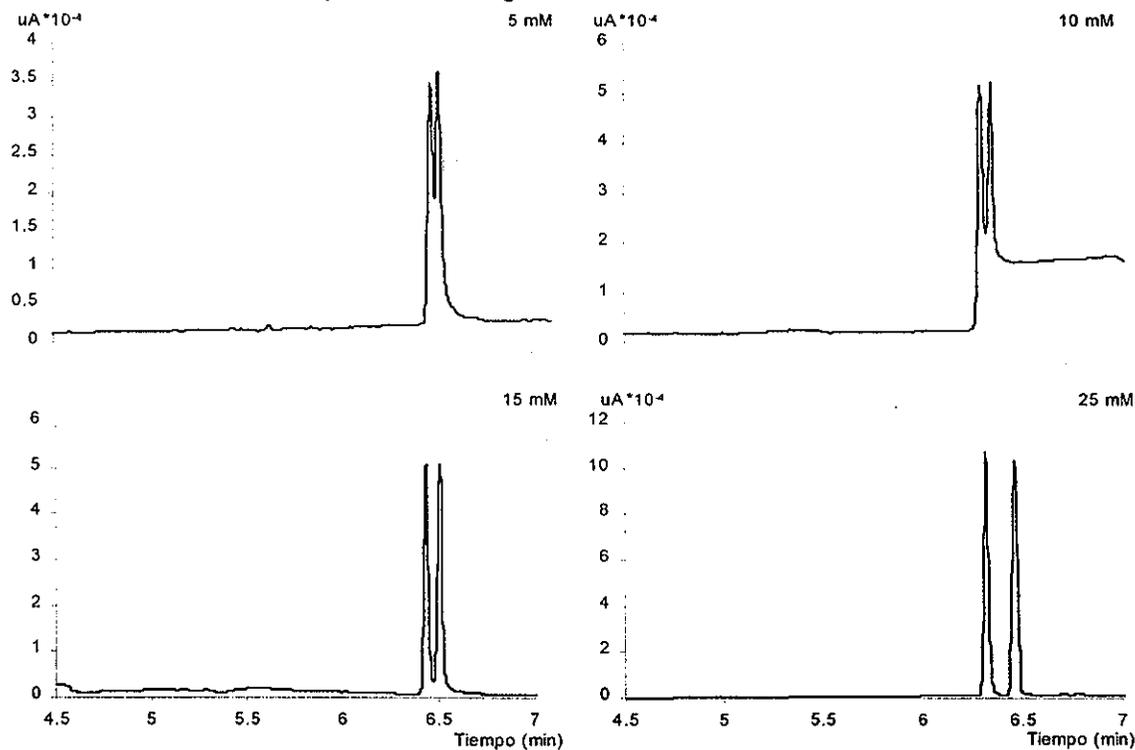


Figura 55. Influencia de la concentración de HSyCD en la separación quiral de ketoconazol. Condiciones: las mismas que las de la figura 48.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para completar el análisis de los cinco derivados del imidazol con las ciclodextrinas altamente sulfatadas, se realizaron experimentos para estudiar el efecto del pH en la separación enantiomérica de todos ellos. Los valores probados de este factor fueron los mismos que en el caso de la HP β CD: 2.21, 2.7, 3.67 y 4.23. Las tablas 10 a la 13 incluyen los resultados tanto de los análisis realizados a diferentes concentraciones de selector quiral (HS β CD y HS γ CD) así como aquellos hechos a diferentes valores de pH. En todas ellas los valores máximos de resolución obtenidos están resaltados en **negritas**.

En cuanto a los EFG's resultantes, estos son presentados en las figuras 56, 57 58 y 59 para los análisis con la HS β CD y 60, 61 y 62 para aquellos realizados con la HS γ CD. Cabe mencionar que los EFG's exhibidos en las figuras 60 y 61 presentan valores negativos en el eje de las abscisas (el eje de los valores de absorbancia), lo cual desde luego no significa que se hayan obtenido valores negativos de esta propiedad sino que en estos experimentos la línea base de los EFG's se cayó por debajo del cero de la escala debido a que no se logró estabilizar la señal del blanco que en este caso se trataba de la señal emitida por el buffer de corrida antes de que el equipo aplicara al inicio del EFG el autocero.

Aún cuando los valores de resolución obtenidos en todos los casos dependieron del pH, las diferencias no parecen haber sido muy grandes, salvo en el caso del econazol en que sus enantiómeros fueron separados con la HS γ CD (ver figura 61). Así mismo, tampoco los tiempos de migración parecieron modificarse sustancialmente cuando se varió el pH, por el contrario, estos permanecieron casi constantes. Estos efectos, tanto en la resolución como en los tiempos de migración, ocasionados al modificar el pH fueron más intensamente

notorios en algunos de los experimentos hechos con HP β CD (ver por ejemplo las figuras 44 y 46).

A partir de todos los resultados presentados hasta el momento, referidos a los experimentos sobre la influencia de la concentración de CD y sobre aquella que tiene el pH en la separación de los enantiómeros de todos los antimicóticos, podemos concluir que la concentración de selector quiral es uno de los factores más importante, o al menos se notan mayores cambios cuando se cambia su valor, en dichas separaciones en comparación con los experimentos en que se varió el pH.

Tabla 10. Efecto del pH en la resolución y tiempo de migración de los enantiómeros de econazol, ketoconazol, miconazol y sulconazol empleando HS β CD como selector quiral.

pH	<i>Econazol</i>		<i>Ketoconazol</i>		<i>Miconazol</i>		<i>Sulconazol</i>	
	t_r^*	R_s	t_r^*	R_s	t_r^*	R_s	t_r^*	R_s
2.21	6.06	3.73	5.77	1.54	6.23	3.09	5.51	1.26
2.70	6.05	3.44	5.70	1.07	6.19	2.13	5.87	1.29
3.67	6.07	3.30	5.88	1.22	6.20	2.59	5.59	1.17
4.23	6.10	3.67	5.92	1.39	6.25	2.03	5.55	1.06

t_r^* tiempo de análisis del segundo pico

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 11. Efecto del pH en la resolución y tiempo de migración de los enantiómeros de bifonazol, econazol y ketoconazol empleando HS γ CD como selector quiral.

<i>pH</i>	<i>Bifonazol</i>		<i>Econazol</i>		<i>Ketoconazol</i>	
	<i>t_r[*]</i>	<i>R_s</i>	<i>t_r[*]</i>	<i>R_s</i>	<i>t_r[*]</i>	<i>R_s</i>
2.21	9.854	0.29	7.83	1.86	7.76	1.76
2.70	6.87	1.53	7.52	2.26	6.75	2.87
3.67	9.95	0.42	7.82	0.69	6.55	1.76
4.23	11.13	0.40	8.04	0.59	6.74	1.59

t_r^{}* tiempo de análisis del segundo pico

Tabla 12. Efecto de la concentración de HS β CD en la resolución y tiempo de migración durante la separación enantiomérica de econazol, ketoconazol, miconazol y sulconazol.

<i>[HSβCD] mM</i>	<i>Econazol</i>		<i>Ketoconazol</i>		<i>Miconazol</i>		<i>Sulconazol</i>	
	<i>t_r[*]</i>	<i>R_s</i>	<i>t_r[*]</i>	<i>R_s</i>	<i>t_r[*]</i>	<i>R_s</i>	<i>t_r[*]</i>	<i>R_s</i>
1.0	10.28	0.48	6.91	0.0	8.38	0.0	7.50	0.0
5.0	7.18	2.19	5.87	0.37	7.12	0.71	6.13	0.18
10.0	6.65	2.14	6.00	0.82	6.54	0.99	5.89	0.82
15.0	6.67	3.15	6.13	1.07	6.56	1.60	5.88	0.97
20.0	6.39	3.44	6.15	1.08	6.55	1.65	5.87	1.29

t_r^{}* tiempo de análisis del segundo pico

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 13. Efecto de la concentración de HS γ CD en la resolución y tiempo de migración durante la separación enantiomérica de bifonazol, econazol y ketoconazol.

[HS γ CD] mM	<i>Bifonazol</i>		<i>Econazol</i>		<i>Ketoconazol</i>	
	t_r^*	R_s	t_r^*	R_s	t_r^*	R_s
5.0	5.62	0.31	6.22	0.0	4.95	0.71
10.0	5.37	0.89	5.90	1.27	4.85	0.96
15.0	5.24	0.90	5.79	1.99	4.82	1.53
20.0	6.77	1.57	--	--	--	--
25.0	6.76	1.33	7.50	2.26	6.46	2.87

t_r^* tiempo de análisis del segundo pico

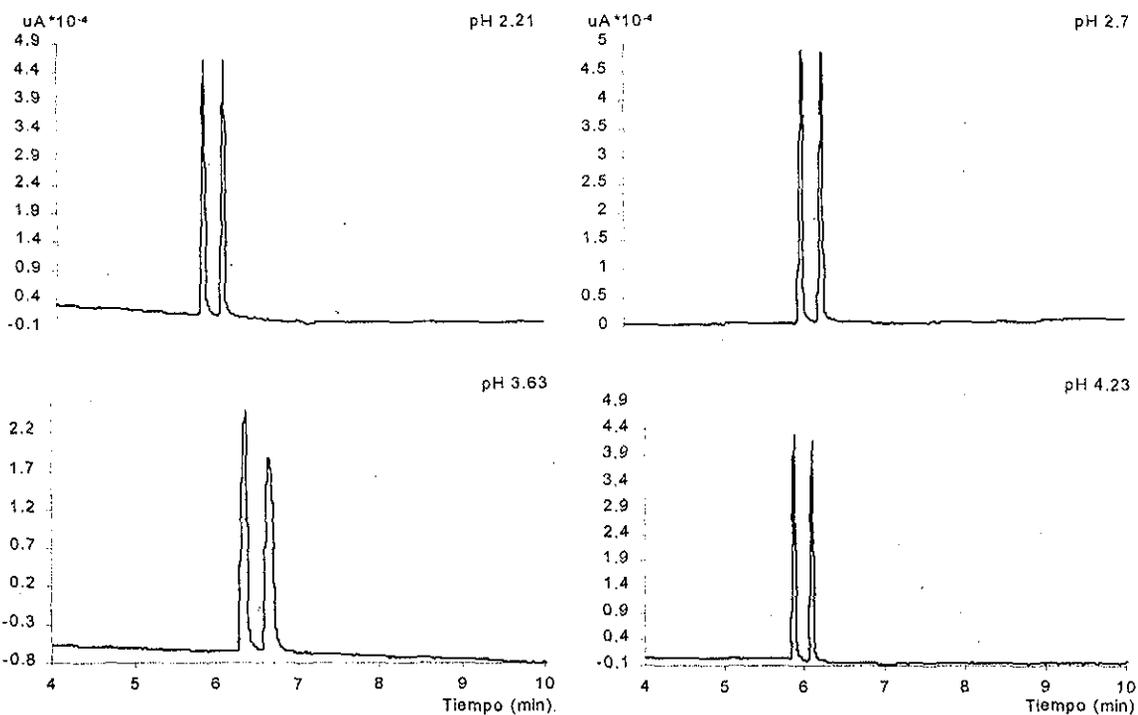


Figura 56. Influencia del pH en la separación quiral de econazol en presencia de HS β CD. Condiciones: las mismas que las de la figura 48.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

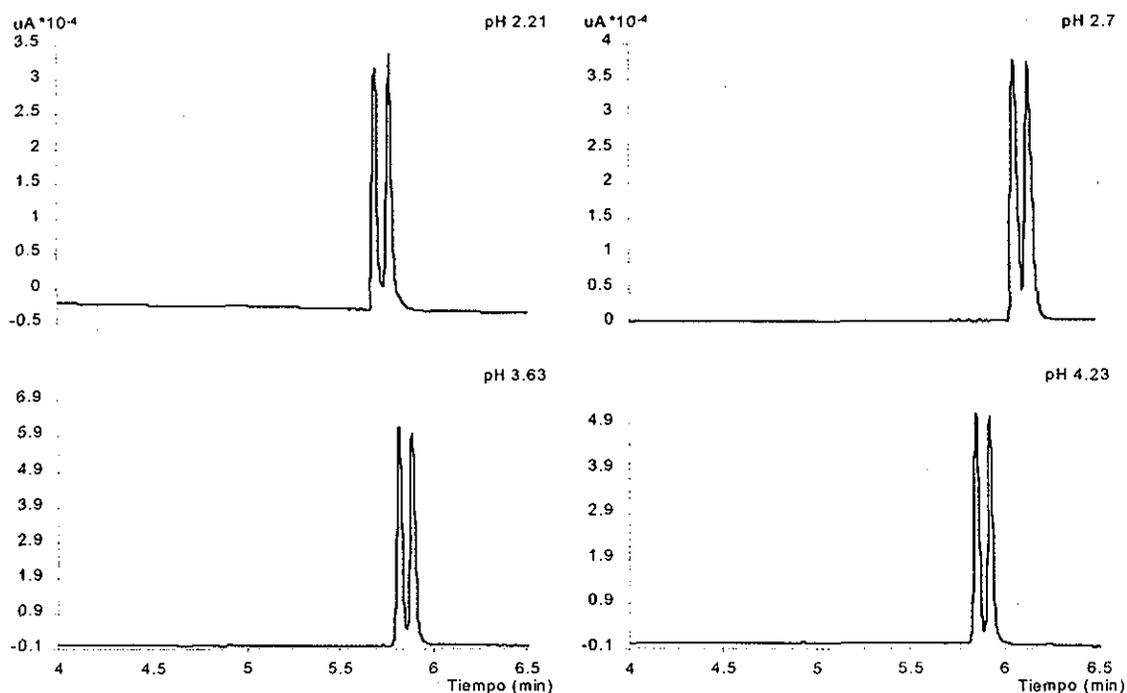


Figura 57. Influencia del pH en la separación quiral de ketoconazol en presencia de HSβCD 20 mM. Condiciones: las mismas que las de la figura 48.

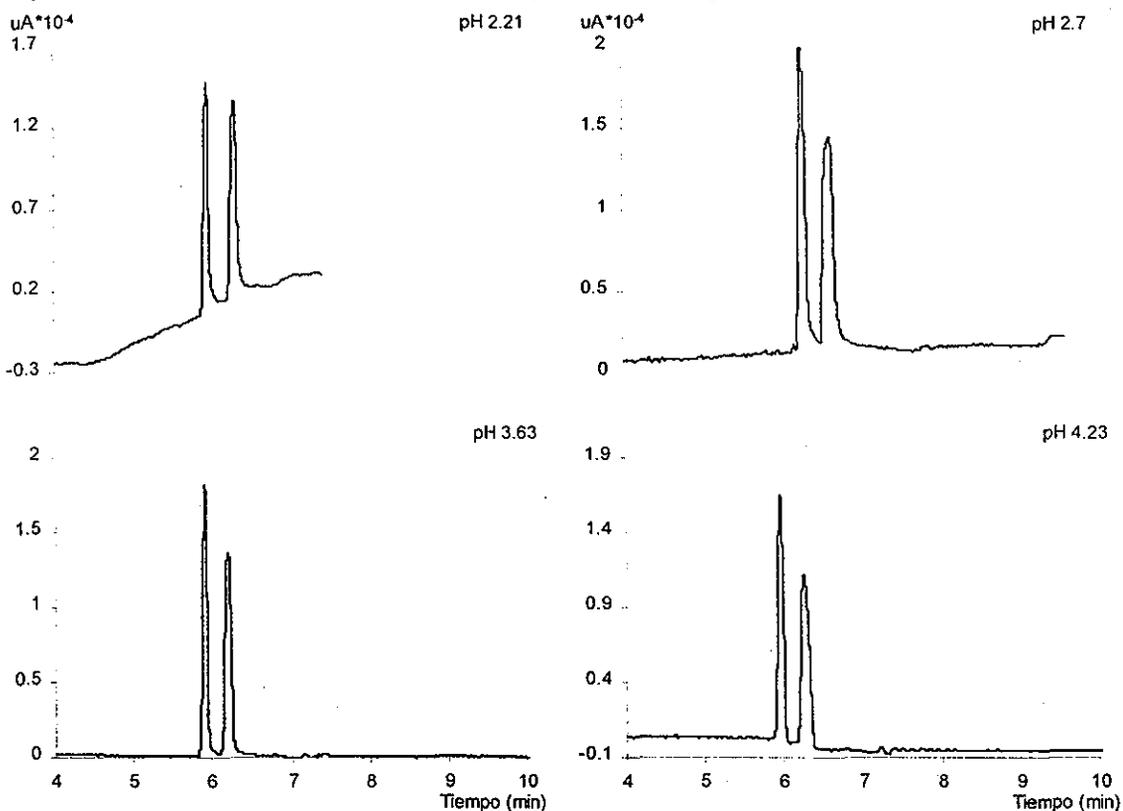


Figura 58. Influencia del pH en la separación quiral de miconazol en presencia de HSβCD 20 mM. Condiciones: las mismas que las de la figura 48.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

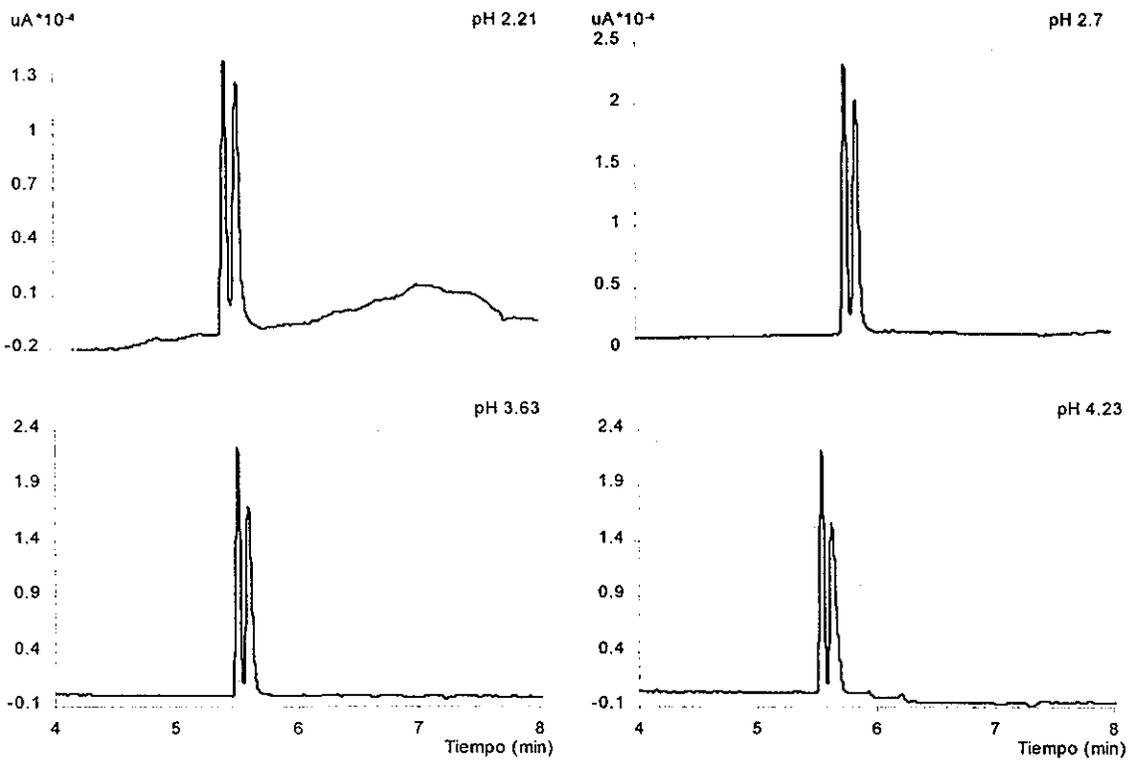


Figura 59. Influencia del pH en la separación quiral de sulconazol en presencia de HS β CD 20 mM. Condiciones: las mismas que las de la figura 48.

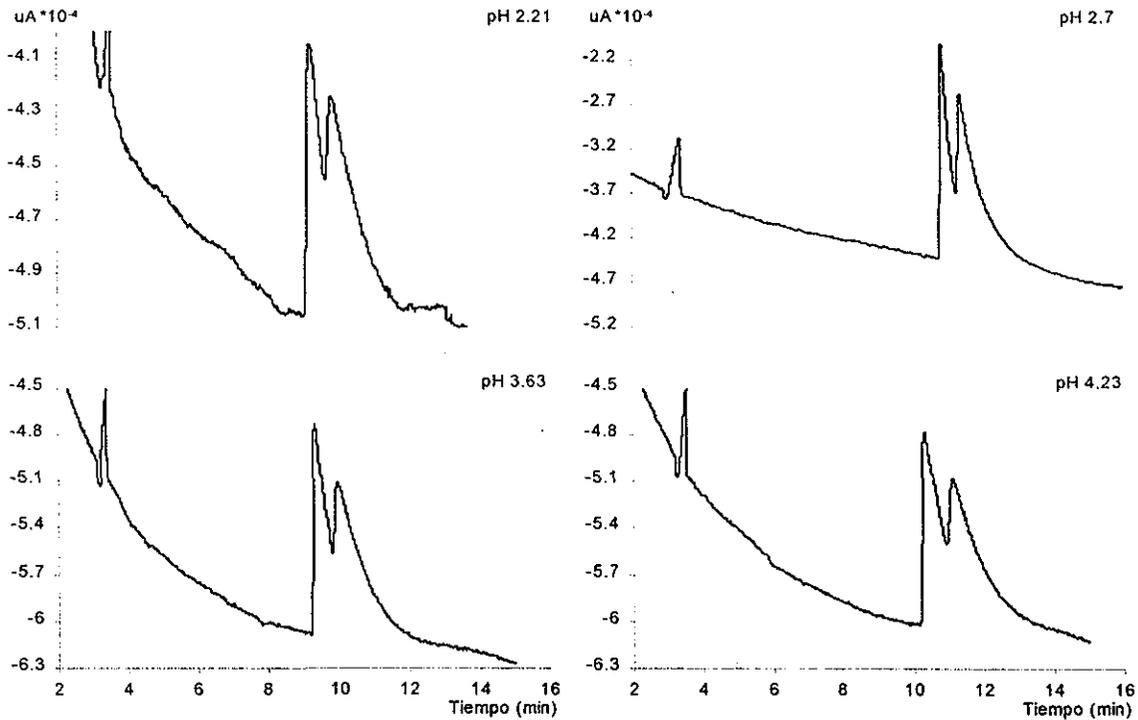


Figura 60. Influencia del pH en la separación quiral de bifonazol en presencia de HS γ CD 20 mM. Condiciones: las mismas que las de la figura 48.

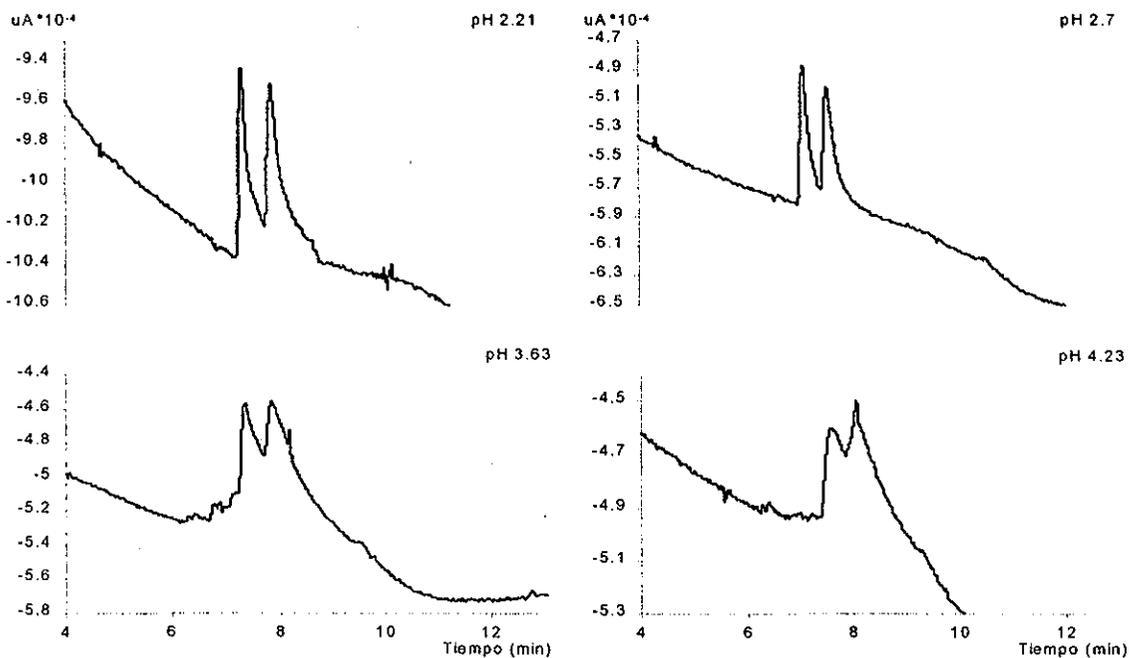


Figura 61. Influencia del pH en la separación quiral de econazol en presencia de HS γ CD 25 mM. Condiciones: las mismas que las de la figura 48.

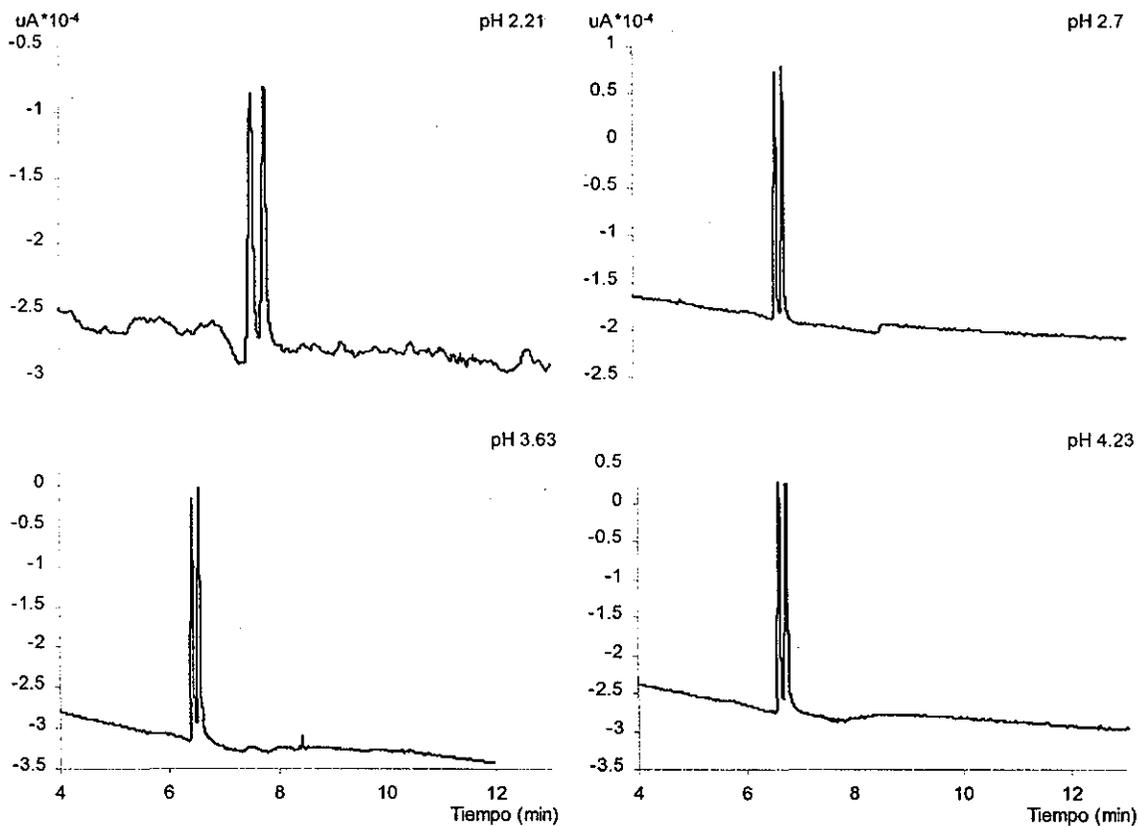


Figura 62. Influencia del pH en la separación quiral de ketoconazol en presencia de HS β CD 25 mM. Condiciones: las mismas que las de la figura 48.

Con todos los experimentos realizados hasta aquí se lograron establecer las condiciones óptimas para la separación quiral de cada uno de los antimicóticos derivados del imidazol por electroforesis capilar utilizando ciclodextrinas modificadas como selectores quirales. La tabla 14, elaborada a partir de todos los resultados obtenidos con la HP β CD, la HS β CD y la HS γ CD (empleando CTAB 0.05 mM para crear el recubrimiento dinámico) reúne las mejores condiciones de separación de acuerdo a todos los parámetros experimentales analizados, para lo cual se consideraron aquellos resultados en los que se hallaron las resoluciones máximas para cada antimicótico. Así mismo, la figura 62 muestra los electroferogramas de estas separaciones.

Tabla 14. Condiciones óptimas para la separación quiral de cinco derivados del imidazol.

Antimicótico	CD	[CD] mM	pH	R_s	t^* Análisis (min.)
Bifonazol	HS γ CD	20.0	2.7	1.53	6.77
Econazol	HS β CD	20.0	2.2	3.44	6.39
Ketoconazol	HS γ CD	25.0	2.7	2.86	6.46
Miconazol	HS β CD	20.0	2.2	2.19	6.56
Sulconazol	HS β CD	20.0	2.7	1.29	5.87

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

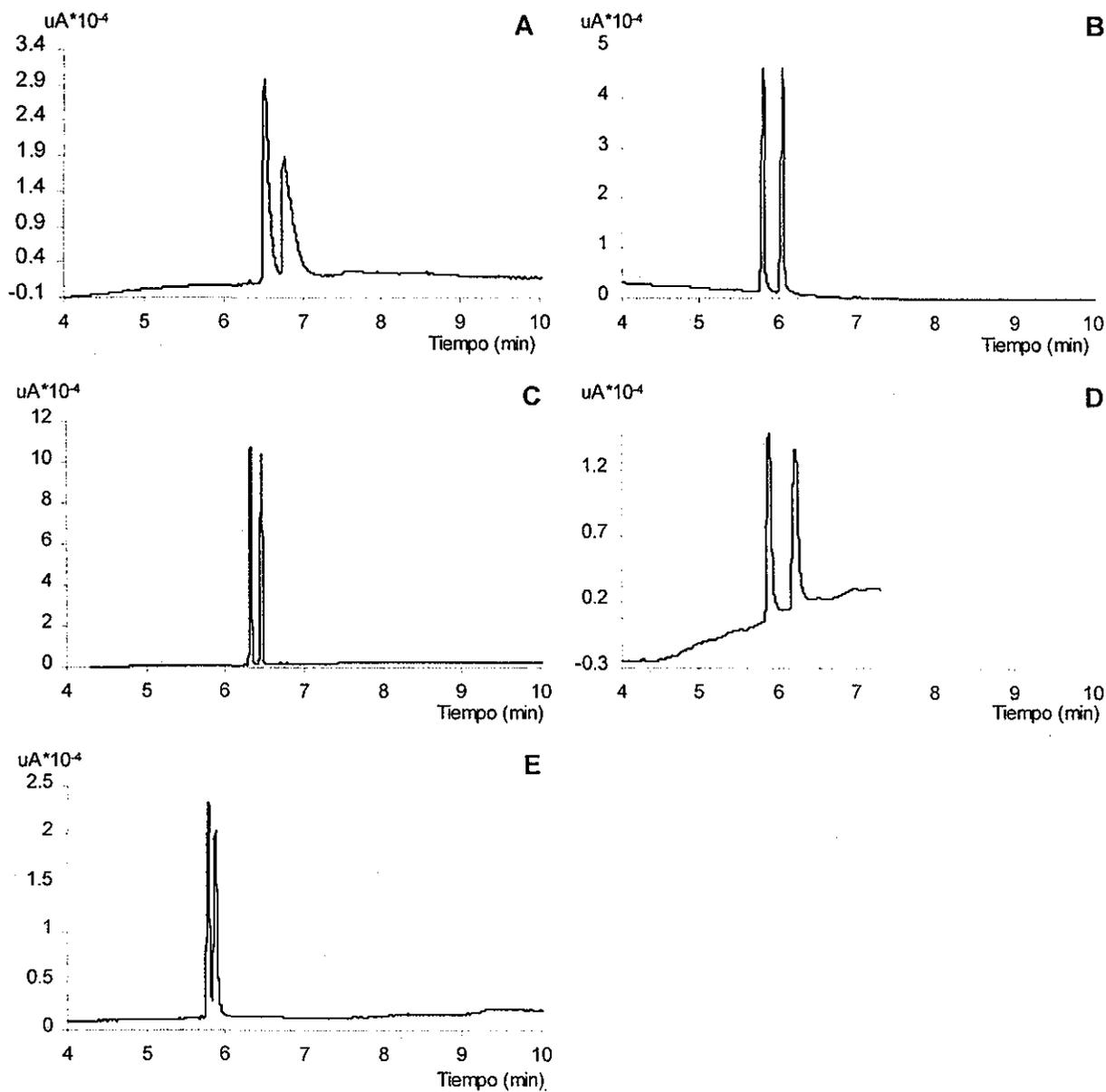


Figura 63. Electroferogramas de bifonazol (A), econazol (B), ketoconazol (C), miconazol (D) y sulconazol (E) obtenidos a las mejores condiciones encontradas. Condiciones: las que vienen reportadas en la tabla 14, el resto, las mismas que las de la figura 48.

10.6-Aplicación de los métodos desarrollados para el bifonazol y miconazol en la separación quiral de los principios activos de dos productos comerciales

Los métodos desarrollados para la separación quiral de isómeros de bifonazol y miconazol, cuyas condiciones vienen citadas en la tabla 14 y en la figura 63, fueron aplicados en la separación enantiomérica de dos productos comerciales (Mycospor polvo y Neomicol solución) que poseen como principios activos a estos dos antimicóticos respectivamente. Las tablas 15 y 16 resumen algunas características relevantes de los electroferogramas del estándar de bifonazol así como de la formulación comercial de este antimicótico (figura 64), mientras que la figura 65 exhibe los electroferogramas correspondientes al estándar de miconazol y a su presentación comercial. Puede apreciarse en las figuras (64 y 65) que los grados de resolución no fueron del todo semejantes cuando se comparan los resultados de las presentaciones comerciales de ambos antimicóticos con sus respectivos estándares al contrario de lo que ocurre con los tiempos de migración (ver tablas 15 y 16), los cuales fueron muy semejantes.

Tabla 15. Algunas características de los electroferogramas de bifonazol estándar y bifonazol comercial.

Antimicótico	R_s	$t_{Análisis}$	Área 1	Área 2
Bifonazol (estándar)	1.38	7.35	17756	11233
Bifonazol (comercial)	2.39	7.27	48538	27270

* $t_{Análisis}$ = tiempo de análisis del segundo pico.

Áreas 1 y 2 = áreas de los picos 1 y 2 de los enantiómeros.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 16. Algunas características de los electroferogramas de miconazol estándar y miconazol comercial.

Antimicótico	R_s	$t_{Análisis}$	Área 1	Área 2
Miconazol (estándar)	2.90	5.99	43602	45649
Miconazol (comercial)	1.15	5.92	75684	92963

* $t_{Análisis}$ = tiempo de análisis del segundo pico.
 Áreas 1 y 2 = áreas de los picos 1 y 2 de los enantiómeros.

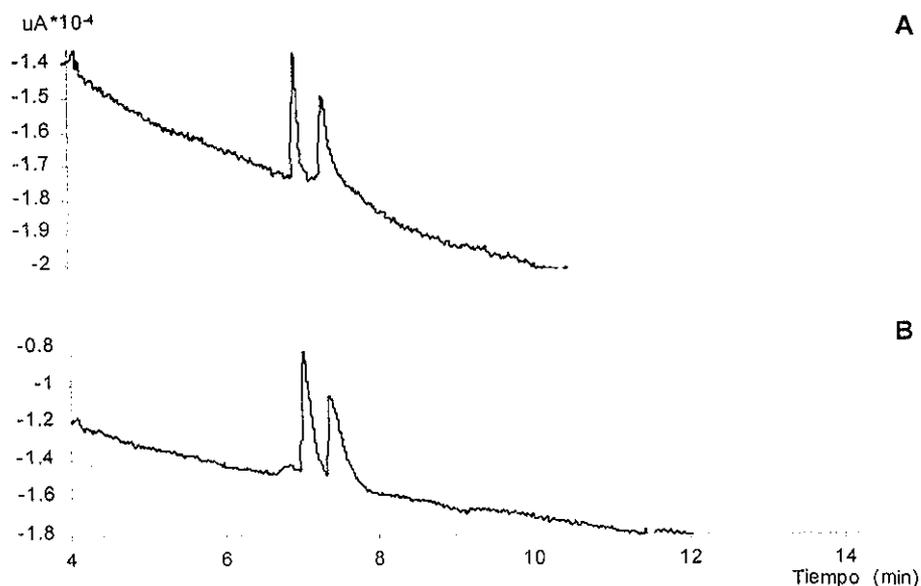


Figura 64. Electroferogramas de la separación de enantiómeros de bifonazol presente en una muestra comercial (A) y de estándar de bifonazol (B) 8×10^{-4} M.

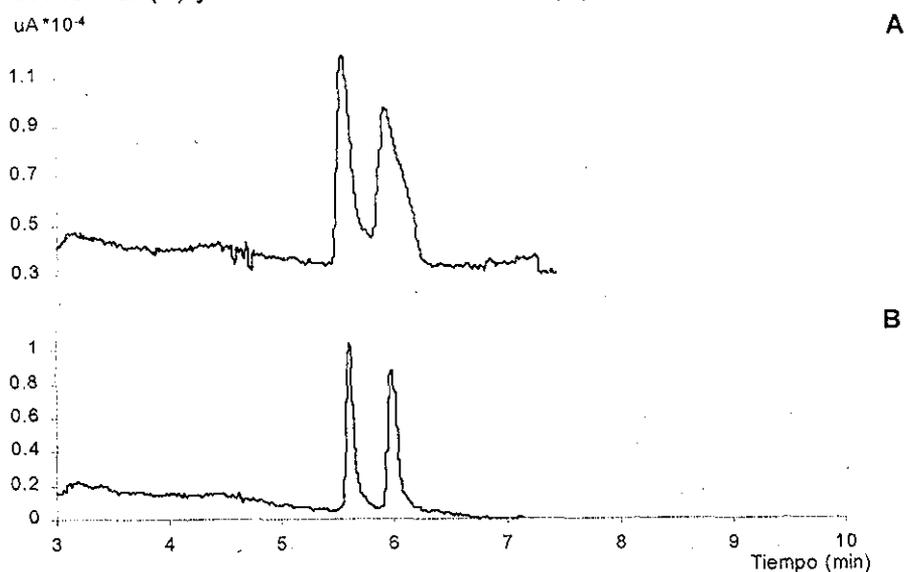


Figura 65. Electroferogramas de la separación de enantiómeros de miconazol presentes en una muestra comercial (A) y de estándar de miconazol (B) 8×10^{-4} M.

Las diferencias en las resoluciones podrían deberse a que tal vez las concentraciones reales de las muestras obtenidas a partir de las formulaciones comerciales eran distintas a aquéllas de los estándares de ambos antimicóticos, ya que como se demostró en los experimentos referidos a la influencia de la concentración de HS β CD y HS γ CD en la separación de los enantiómeros de miconazol y bifonazol (ver figuras 51 y 53, respectivamente) la resolución enantiomérica es un parámetro que depende de la concentración de CD. En el caso del miconazol, a juzgar por la resolución obtenida para la muestra comercial (ver tabla 16), parece ser que la concentración de esta muestra fue superior a la del estándar (8×10^{-4} M), lo cual equivale al caso en que se tuviera una concentración menor de HS β CD (para una concentración 8×10^{-4} M de miconazol comercial), lo cual se manifestaría como un decremento en la resolución de los enantiómeros de este antimicótico (ver figura 51). Caso contrario al de la muestra comercial de bifonazol ya que la resolución para ésta fue superior a la de la muestra estándar, situación que sería más compatible con el hecho de tener una concentración del antimicótico inferior a la del estándar, hecho que sería equivalente a tener un exceso en la concentración de HS γ CD (si la concentración de la muestra comercial hubiera sido 8×10^{-4} M), tomando en cuenta la tendencia de los resultados de la figura 53.

Un aspecto interesante de estos resultados consiste en las proporciones en las que se hallan los isómeros en las mezclas racémicas de los dos antimicóticos. Por ejemplo, de acuerdo con los valores de las áreas de los picos 1 y 2 de los enantiómeros de bifonazol en la muestra comercial, los cuales vienen reportados en la tabla 15, el área (2) del segundo pico representa aproximadamente el 56.2% del área (1) del pico 1 lo cual en términos de proporciones corresponde aproximadamente a una relación de 1:2, mientras que en el caso

de los isómeros del miconazol tabla 16, el área (1) del primer pico representa cerca del 82% de aquella correspondiente al segundo pico. Independientemente de cual de los dos isómeros se halle en exceso, parece ser que estos dos compuestos se comercializan en su forma racémica, aunque bien es cierto que la composición del racemato no es 50:50. Esto sugiere, de alguna forma, que no existe un control sobre la composición enantiomérica de estas substancias en dichas presentaciones comerciales y, que en cierto modo, se asume que la actividad antimicótica de ambos isómeros es la misma, o bien, que no existen hasta el momento estudios sobre la actividad por separado de cada uno de los enantiómeros, hechos ambos por demás importantes tomando en consideración lo que se expuso en el capítulo 4 de este trabajo con respecto a la actividad diferencial de muchos fármacos de naturaleza enantiomérica.

10.7-Aplicación del método desarrollado para el ketoconazol en la determinación enantiomérica de este compuesto en muestras biológicas

Como parte de la determinación de los isómeros de ketoconazol en muestras biológicas se realizaron experimentos en los cuales se administró oralmente *Nizoral* (ver metodología) a animales de laboratorio. El método empleado para llevar a cabo los análisis de las muestras biológicas, es el mismo que se describe en la figura 63 y la tabla 14.

De todas las muestras recabadas sólo en las de heces de rata del cuarto día se observó la presencia de ketoconazol. La figura 66 muestra los electroferogramas de la muestra biológica y del estándar de ketoconazol. La tabla 17 recaba información acerca de los electroferogramas de las separaciones quirales tanto de la solución estándar como de la muestra biológica de ketoconazol.

Puede observarse en estos resultados que el método empleado permitió obtener separaciones similares en cuanto a resolución y tiempos de análisis en la muestra biológica comparada con la separación del estándar. Por tanto, estos experimentos confirman la utilidad de este método también para el análisis de este tipo de muestras.

Los valores de las áreas de los isómeros reportados en la tabla 17 al parecer muestran que, al igual que en los casos del bifonazol y el miconazol, el ketoconazol es comercializado como racemato (recuérdese que se suministró ketoconazol comercial), ya que según la proporción en la que se hayan, la mezcla de isómeros es de casi 50:50. Con las implicaciones que esto tiene como ya se comentó en el capítulo 4.

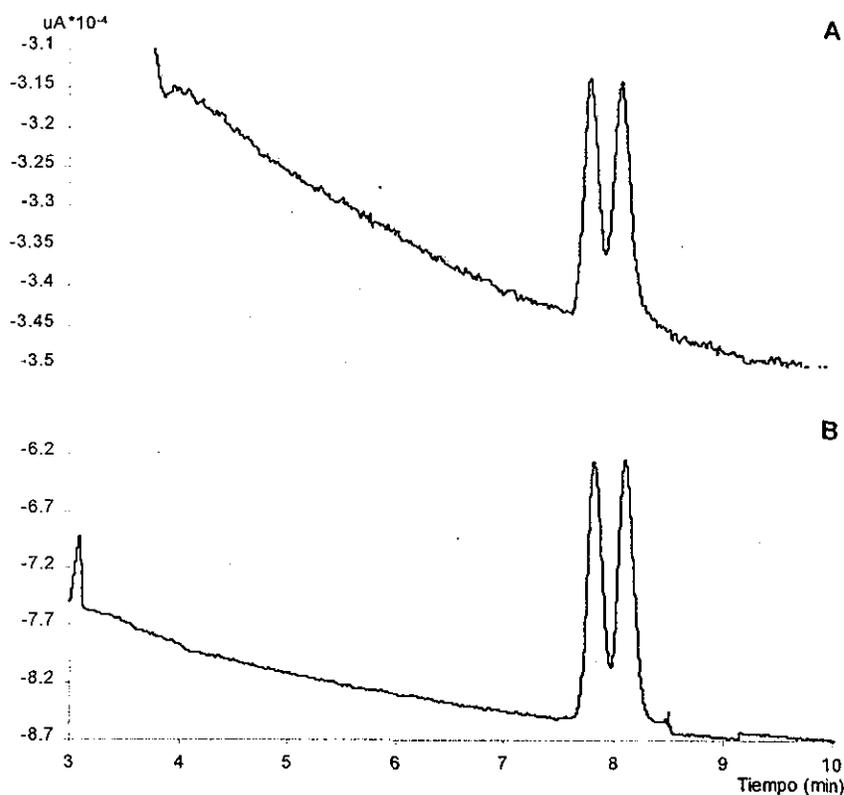


Figura 66. Electroferogramas de la separación de enantiómeros de ketoconazol en heces (A) y ketoconazol estándar (B) 8×10^{-4} M.

Tabla 17. Algunas características de los electroferogramas de ketoconazol estándar y bifonazol presente en heces.

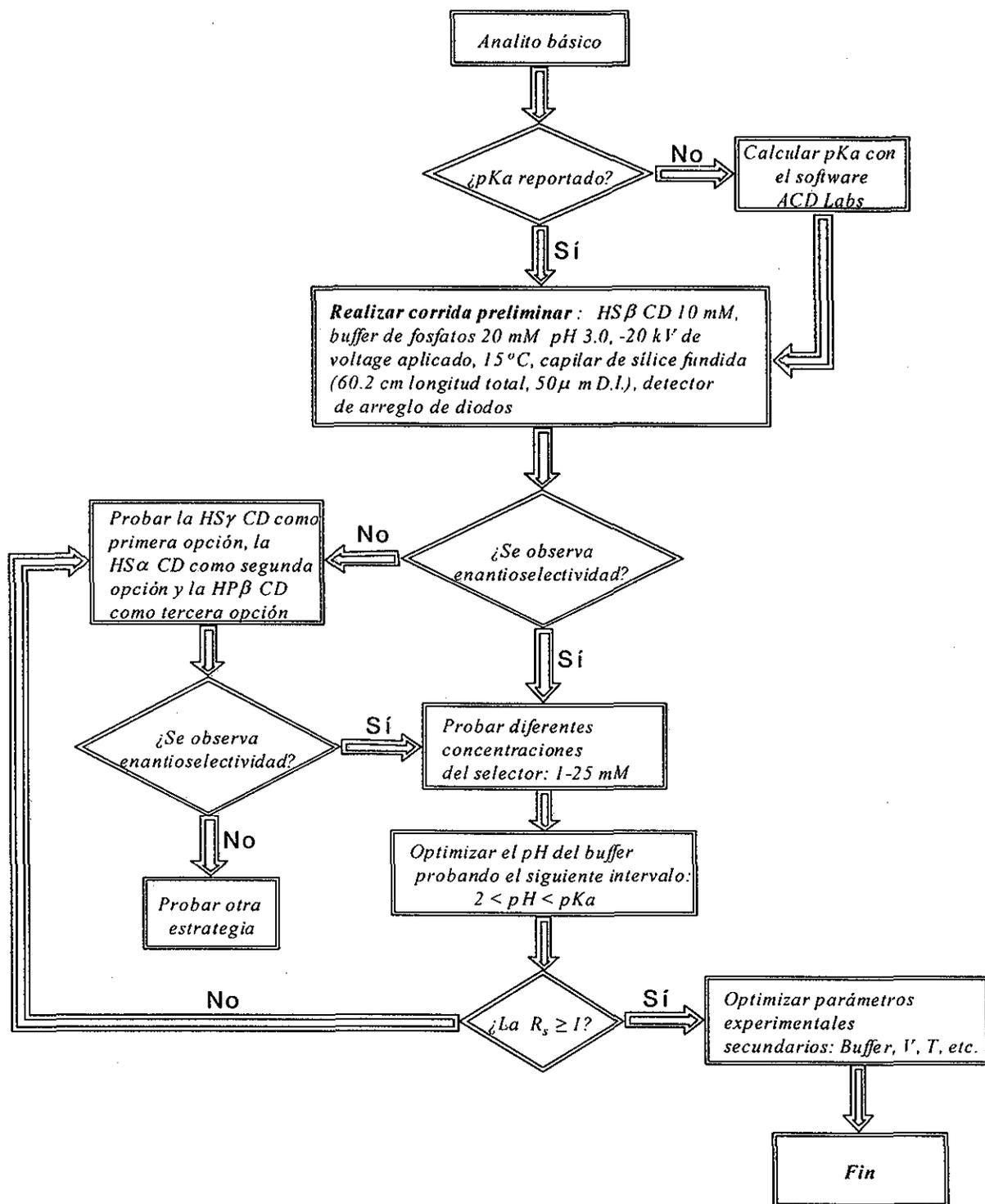
<i>Antimicótico</i>	<i>R_s</i>	<i>t_{Análisis}</i>	<i>Área 1</i>	<i>Área 2</i>
Ketoconazol (estándar)	1.07	8.11	214443	238078
Ketoconazol (heces)	1.06	8.09	42831	46531

**t_{Análisis}* = tiempo de análisis del segundo pico.

Áreas 1 y 2 = áreas de los picos 1 y 2 de los enantiómeros.

A manera de colofón para la parte del desarrollo de los métodos de separación quiral de los cinco antimicóticos se propone a continuación un diagrama de flujo de la estrategia empleada para realizar las separaciones quirales de compuestos básicos:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



10.8-Estudio y comparación de costos por análisis en separaciones quirales

Tabla 19. Comparación de los costos y características asociadas a los análisis realizados por los métodos de HPLC y EC para la separación de los enantiómeros de miconazol*.

<i>Análisis por HPLC</i>	
<u>Requerimientos para el análisis:</u>	<u>Costo:</u>
Columna: C ₁₈ (para 200 análisis en promedio)	\$55.54
Volumen de inyección: 10-100 µl	
Fase Móvil (FM): Buffer de fosfatos 30 mM con MeOH 15% HSβCD 20 mM y CTAB 0.05 mM (\$610.46 por cada 100 ml)	
Flujo de la FM: 1.0 ml/min	
Tiempo para equilibrar la columna (gasto de FM): 15 min	\$91.57
Tiempo total de análisis (gasto de FM): 10 min	\$61.05
TOTAL	<u>\$208.16</u>
<i>Análisis por EC</i>	
<u>Requerimientos para el análisis:</u>	<u>Costo:</u>
Columna: Capilar de sílice fundida (para 200 análisis en promedio)	\$0.80
Volumen de muestra introducida: 4.5 µl	
Buffer: De fosfatos 30 mM con HSβCD 20 mM y CTAB 0.05 mM (\$610.46 por cada 100 ml)	
Tiempo requerido para equilibrar el capilar: 5 min	
Volumen de buffer gastado para alcanzar el equilibrio: 12 µl	
Tiempo total del análisis: 10 min	
Consumo de buffer por análisis: 1.2 ml	\$7.32
TOTAL	<u>\$8.12</u>

*Se asume en esta tabla que algunos costos de operación (equipo, manipulación del equipo y aplicación del método por parte de un analista, consumo de energía, etc.) en ambos métodos son esencialmente los mismos de ahí que no se mencionen en la tabla.

‡ El volumen de muestra introducida se calculó considerando que la viscosidad del buffer o electrolito soporte empleado es cercana a la del H₂O (1.001 cp a 25 °C) debido a que el buffer se puede considerar como una solución acuosa diluída.

Una vez concluidos todos los experimentos relacionados con las separaciones quirales podemos hacer un listado de las conclusiones parciales más relevantes de esta parte del trabajo:

1-De todos los buffers empleados el de fosfatos fue el que mejor resultados proporcionó en cuanto a su grado de absorbancia, forma o perfil del electroferograma así como a la calidad de la línea base de los electroferogramas.

2-La presencia de estructuras como dobles enlaces, sistemas conjugados y aromáticos en las estructuras moleculares de los analitos estudiados hizo posible su detección la λ óptima de 200 nm.

3-Las eficiencias de las separaciones de los antimicóticos aumentaron a medida que se incrementó la concentración del electrolito soporte.

4-Tanto la resolución como los tiempos de migración de los antimicóticos, disminuyeron cuando se aumentó la temperatura de separación, mientras que la dispersión de los picos se incrementó al aumentar dicho factor, obteniendo como valor óptimo el de 15 °C en donde se observa una menor dispersión de los picos y por ende una mayor resolución.

5-Tanto la resolución como la eficiencia de los isómeros de los analitos aumentaron al incrementar el voltaje de separación mientras que los tiempos de migración disminuyeron, siendo de 30 kV el valor óptimo obtenido.

6-No se obtuvo enantioselectividad ni en los isómeros de miconazol ni en los de ketoconazol cuando se emplearon las CD's neutras (α y β CD, M β CD y DM β CD) a concentración 10 mM. Pero como los tiempos de migración de los antimicóticos se modificaron en presencia de estas CD's se deduce que sí ocurrió algún tipo de interacción (aunque no enantioselectiva) entre estas con los analitos.

7-De todas las CD's neutras empleadas, sólo la HP β CD presentó enantioselectividad con los isómeros del econazol, miconazol y sulconazol. En el caso del miconazol, la variación de su concentración tuvo influencia en los valores obtenidos de resolución de sus isómeros obteniéndose una resolución óptima de $R_s = 1.08$.

8-La variación del pH también influyó en la resolución de los isómeros del miconazol, y el pH óptimo del ES obtenido para este antimicótico fue de 4.7.

9-La utilización de capilares recubiertos covalentemente de PAA y PVA no elimina los fenómenos de adsorción o "peak splitting" de los analitos.

10-El empleo de CTAB 0.05 mM en el electrolito soporte (buffer de fosfatos 30 mM) permitió el uso de CD's altamente sulfatadas como selectores quirales sin problemas de adsorción o de "peak splitting".

11-La HP β CD usada como selector quiral tuvo interacciones enantioselectivas con los isómeros de econazol, ketoconazol, miconazol y sulconazol obteniéndose resoluciones

máximas de : 1.23, 0.49, 1.26 y 0.94 respectivamente a concentraciones óptimas de este selector de: 2.0, 2.0, 1.0 y 0.5 mM respectivamente.

12-La HS β CD usada como selector quiral en presencia de CTAB 0.05 mM presentó interacciones enantioselectivas con los isómeros de econazol, ketoconazol, miconazol y sulconazol obteniéndose resoluciones máximas de : 3.44, 1.08, 2.19 y 1.29 respectivamente a concentraciones óptimas de este selector de: 20, 15, 20 y 20 mM respectivamente.

13-La HS γ CD usada como selector quiral en presencia de CTAB 0.05 mM presentó interacciones enantioselectivas con los isómeros de bifonazol, econazol y ketoconazol, obteniéndose resoluciones máximas de: 1.53, 2.26, y 2.86 respectivamente a concentraciones óptimas de este selector de: 20, 25 y 25 mM respectivamente.

14-Los valores de concentración óptima de HP β CD fueron cerca de diez veces menores a aquellos obtenidos para la HS β CD y la HS γ CD y por tanto puede concluirse que, de acuerdo a estos resultados y a la ecuación de Wren y Rowe (1), la magnitud de las constantes de equilibrio de los complejos de inclusión fue más grande cuando se utilizó HP β CD que cuando se usaron las HS β CD y HS γ CD para la resolución de econazol, ketoconazol, miconazol y sulconazol.

15-La variación del pH en los análisis con las CD's altamente sulfatadas influyó en las resoluciones de los isómeros de todos los antimicóticos, de tal forma que los valores óptimos de este factor fueron los siguientes: bifonazol pH 2.7, econazol pH 2.2, ketoconazol pH 2.7, miconazol pH 2.2 y sulconazol pH 2.7.

16-Las ciclodextrinas altamente sulfatadas invirtieron e incrementaron la movilidad electroforética de los complejos de inclusión formados con los antimicóticos.

17-Las mejores resoluciones de los enantiómeros de los antimicóticos fueron obtenidas usando ciclodextrinas altamente sulfatadas como selectores quirales.

18-El tamaño de los grupos funcionales hidrofóbicos del bifonazol y el ketoconazol (principalmente bifonazol) resultó ser una factor importante para la obtención de mejores resoluciones, por eso en estos casos el selector quiral más apropiado fue la de cavidad mayor (HS γ CD).

19-Las condiciones óptimas encontradas en este estudio, pueden ser aplicadas a la separación quiral de compuestos que posean estructuras similares a las de los antimicóticos probados.

20-Los métodos desarrollados en este estudio, pueden ser aplicados a la separación quiral de compuestos presentes en formulaciones comerciales y en muestras biológicas.

21-A partir de todos los factores experimentales optimizados se puede concluir que se logró el desarrollo de los métodos de separación quiral de los cinco antimicóticos estudiados, empleando ciclodextrinas altamente sulfatadas como selectores quirales mediante la técnica de electroforesis capilar.

10.9-Separación quiral de una mezcla de los cinco antimicóticos derivados del imidazol

Como complemento al desarrollo y aplicación de los métodos analíticos para la separación quiral de los cinco antimicóticos estudiados por electroforesis capilar se planteó desarrollar un método adicional, también por electroforesis capilar, para la separación quiral de una mezcla de bifonazol, econazol, ketoconazol, miconazol y sulconazol. Para tal efecto, se aplicó un diseño factorial para analizar el impacto de dos factores (concentración de CTAB y pH) en la resolución, eficiencia y tiempos de análisis de dos picos seleccionados.

Cabe mencionar que las concentraciones probadas de CTAB para estos experimentos fueron superiores a la CMC de este surfactante (9.2×10^{-4} M [58]) con la finalidad de favorecer la formación de micelas y que mediante el reparto de los antimicóticos (los cuales se hallan como especies neutras a los valores de pH probados) entre éstas y el buffer se llevara a cabo la separación. Es decir, para realizar estos análisis se empleó una variante o modalidad de la electroforesis capilar en solución conocida como *cromatografía capilar micelar electrocinética*, (sección 6.5).

La tabla 18 muestra las condiciones a las cuales se planearon los experimentos requeridos para llevar a cabo el diseño experimental. La figura 67 presenta cuatro electroferogramas en

Tabla 18. Diseño experimental de monitoreo dos factores (CTAB y pH) a dos niveles, 2² para la separación aquiral de una mezcla de cinco derivados del imidazol.

*EFG	[CTAB] mM	pH	R _s	*t _{Análisis}	*H
A	3	9	0.21	11.66	338
B	6	11	1.32	9.4	14802
C	3	11	0.02	12.5	273
D	6	9	1.36	8.9	15228

*EFG: electroferograma; *t_{Análisis}: tiempo de análisis del segundo pico

*H: eficiencia

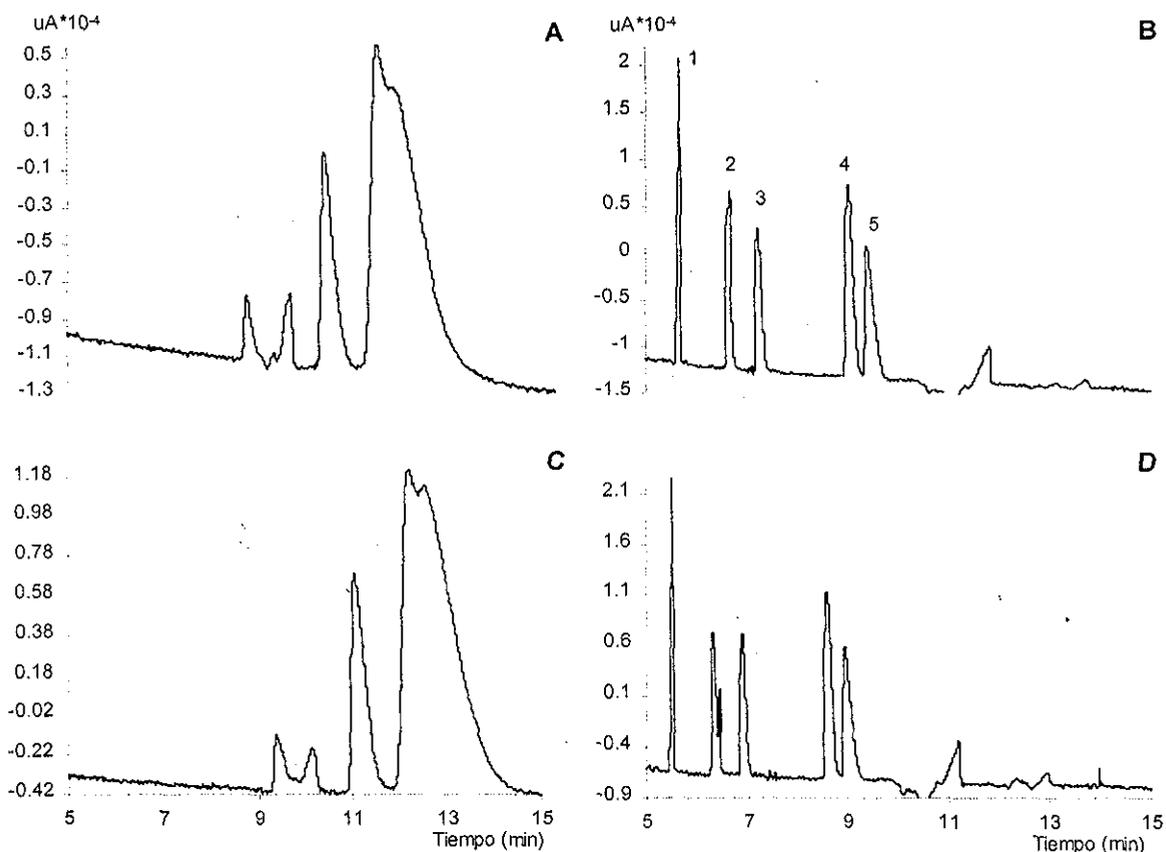


Figura 67. Electroferogramas de la separación aquiral de una mezcla de bifonazol (2), econazol (3), ketoconazol (1), miconazol (4) y sulconazol (5) a diferentes valores de concentración de CTAB y pH. Condiciones: buffer de fosfatos 30 mM a pH's 9 y 11, capilar normal de sílice fundida 60.2 cm de longitud total (50 cm de longitud al detector), 50 μm de diámetro interno, introducción de muestra por inlet a 0.5 psi de presión durante 5 segundos; 30 kV de voltaje aplicado; 15 °C, polaridad normal, detección a 200 nm, el resto vienen citadas en la tabla 18.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

los que pueden apreciarse los efectos de la variación del pH y de la concentración de CTAB en la resolución, tiempos de análisis y eficiencia de la separación de los cinco antimicóticos. Resulta evidente a partir de estos electroferogramas que el factor que influyó más en los parámetros experimentales evaluados fue la concentración del CTAB. Nótese que para dos concentraciones diferentes de este surfactante a un mismo valor de pH, por ejemplo 3 y 6 mM de CTAB a pH 9.0 (figura 67-A y 67-D respectivamente), las diferencias en los perfiles de los electroferogramas son muy notorias de tal suerte que mientras que a concentración 3 mM sólo logran resolverse el ketoconazol, bifonazol y el econazol, a concentración 6 mM del surfactante logran resolverse todos los antimicóticos, además de que debe considerarse que los tiempos de migración se disminuyen de manera evidente también a concentración 6 mM (ver tabla 18). Analizando los EFG's obtenidos a concentraciones 6 y 3 mM de CTAB a pH 11 (figura 67-B y 67-C respectivamente) puede apreciarse un efecto semejante al apenas descrito que confirma la importancia primordial de la concentración del surfactante en la separación acquiral de estos derivados del imidazol por encima del efecto del pH. Si se comparan, por el contrario, dos experimentos en que se mantuvo constante la concentración de CTAB y se modificó el pH, por ejemplo, la figura 67-A con la 67-C o bien la 67-B con la 67-D, podrá observarse que prácticamente no hay diferencias entre estos, lo cual pone de manifiesto el escaso efecto del pH en estas separaciones. El hecho de que la concentración de surfactante haya sido un factor más importante que el pH durante la separación acquiral de la mezcla de antimicóticos, podría deberse a que el número de micelas formadas en solución depende de la concentración de surfactante de tal forma que, al aumentar ésta, aumenta también la cantidad de micelas (fase

seudo estacionaria) con las cuales puede acaecer el equilibrio de reparto de los analitos. Lo anterior implica que se aumente la eficiencia de la separación además de disminuir los tiempos de migración ya que el transporte de estos analitos ocurre en virtud de las micelas cargadas positivamente las cuales viajan en dirección al cátodo mientras que el EOF viaja en la dirección contraria. A las condiciones experimentales seleccionadas (3 y 6 mM de CTAB) el EOF se encuentra invertido, lo cual puede verse en la gráfica de la figura 35 donde se aprecia que para concentraciones tales como 3 y 6 mM el valor y el sentido de la movilidad del EOF son negativos (contrarios) con respecto al valor y sentido que tendrían a valores inferiores de CTAB 0.1 mM o en ausencia de este surfactante. Esquemáticamente, esta situación se representa en la figura 68.

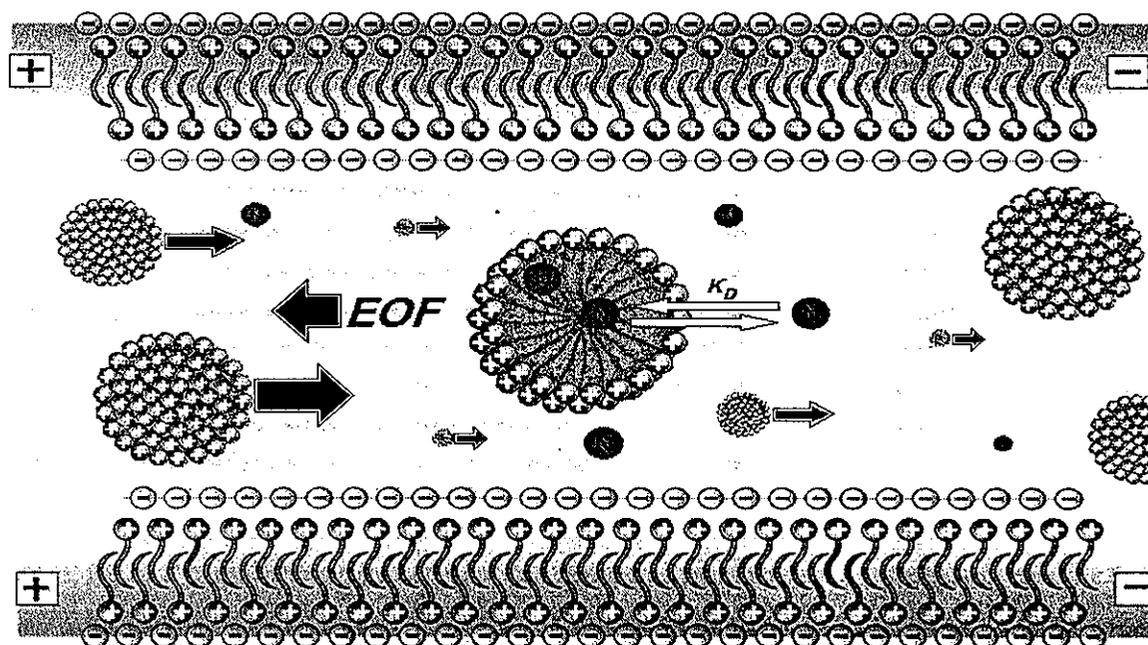


Figura 68. Diagrama esquemático representativo de las condiciones experimentales prevaecientes en los experimentos en que se emplearon micelas de CTAB para llevar a cabo la separación aquiral de los cinco antimicóticos en su forma neutra. N = analito neutro. Las flechas oscuras indican el sentido en que ocurre el desplazamiento de los diversos componentes del medio de separación.

El efecto nulo o mínimo del pH parece explicarse sobre la base de que ni las propiedades de los antimicóticos (los cuales son neutros a valores superiores a 7.7) ni las del surfactante (el cual es catiónico en todo momento), se ven afectadas a los pH's analizados (9 y 11) y, por ende, tampoco se ven afectadas sus características electroforéticas. Un aspecto que podría haberse afectado al variar el pH podría haber sido la velocidad del EOF. Sin embargo, no se ven diferencias importantes en los tiempos de análisis por efecto de la variación de este parámetro (ver figura 67 y tabla 18) lo cual puede explicarse si recurrimos nuevamente a la figura 35. Obsérvese en esta figura que, aproximadamente a valores superiores a 0.5 mM de CTAB, la curva de la movilidad del EOF tiende a hacerse constante, y es por ello que por muy alto que sea el pH (pH 11 en estos experimentos), el EOF no se altera por lo que las concentraciones de CTAB a 3 y 6 mM se convierten en el factor predominante en estas separaciones.

La figura 69 muestra los electroferogramas traslapados de todos los antimicóticos obtenidos separadamente con la intención de identificar cada uno de los picos presentes en los electroferogramas de la figura 67.

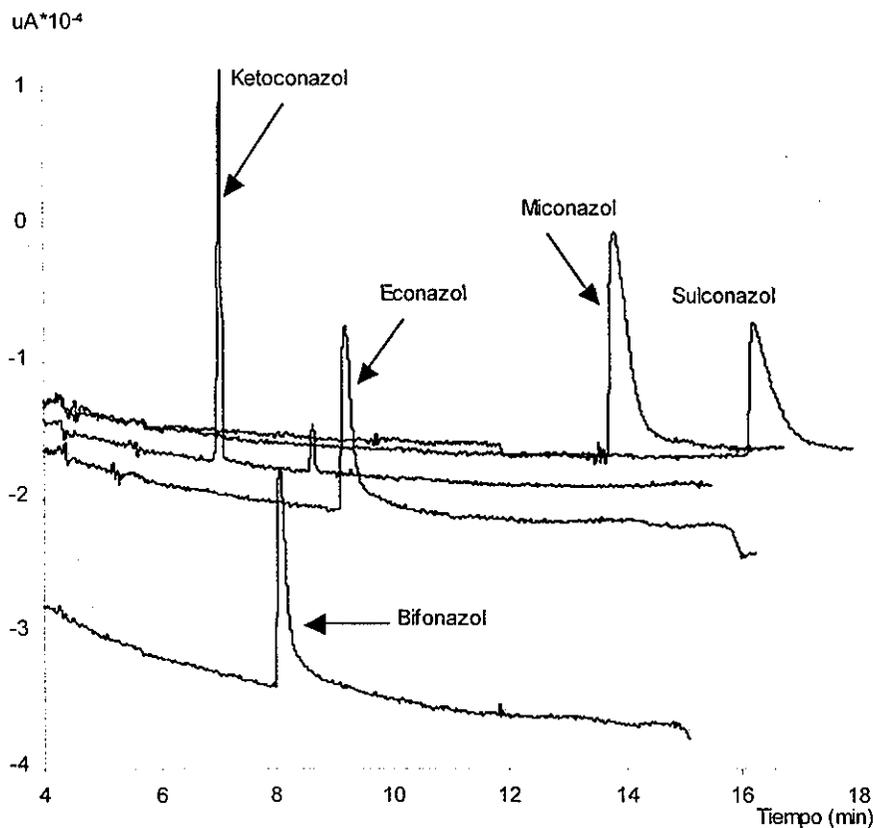


Figura 69. Electroferogramas traslapados de los cinco derivados del imidazol obtenidos separadamente. Condiciones: buffer de fosfatos pH 11, CTAB 6.0 mM, el resto de las condiciones iguales a las de la figura 67.

Finalmente, se plantea un comentario acerca de un aspecto importante derivado de los resultados de estos experimentos referido a la polaridad relativa de los cinco derivados del imidazol. Si pensamos en que la única forma de migración de los antimicóticos (los cuales se hallan en su forma neutra a pH 9 y 11) es mediante su interacción con las micelas de CTAB, entonces puede inferirse que aquel analito que llegue más rápido al detector (que tenga el tiempo de análisis más breve) será al mismo tiempo el que más haya interaccionado con las micelas (tendrá una constante de reparto mayor) y, por ende, será el menos polar.

Por el contrario, aquel analito que haya sido detectado a un mayor tiempo de análisis será el

que haya presentado menores interacciones con el ambiente hidrofóbico de las micelas (menor constante de reparto) y por lo tanto será el más polar. Esto implica que aquellos analitos cuyos tiempos de análisis estén entre los tiempos mayor e inferior antes mencionados, poseerán polaridades intermedias a estos. Por tanto, bajo estas consideraciones, y haciendo uso de los resultados de las figuras 67 y 69 se propone el siguiente orden de polaridad relativa de los cinco derivados del imidazol:

(+)POLAR *Sulconazol* > *Miconazol* > *Econazol* > *Bifonazol* > *Ketoconazol* **(-)POLAR**

De la misma forma que en el caso de las separaciones quirales, se enlistan a continuación las conclusiones más relevantes de la parte aquiral de este trabajo:

1-De los dos parámetros experimentales probados, pH y CTAB, el segundo fue el que tuvo mayor importancia en la separación aquiral de la mezcla de los cinco antimicóticos, siendo 6 mM la concentración a la que se obtuvieron los mejores resultados.

2-Las concentraciones empleadas de surfactante, invirtieron el sentido del EOF.

3-Independientemente del valor del pH, el EOF se mantuvo constante durante estas separaciones.

4-El pH fue un factor experimental que prácticamente no tuvo ninguna influencia en la separación aquiral de la mezcla de antimicóticos.

5- Con base en los tiempos de migración obtenidos para los analitos a partir de la separación de la mezcla se puede concluir que las polaridades relativas de estos, son las siguientes comenzando con el más polar de izquierda a derecha:

Sulconazol > Miconazol > Econazol > Bifonazol > Ketoconazol

-El uso del diseño experimental de monitoreo resultó apropiado para encontrar las condiciones adecuadas aunque no óptimas de separación aquiral de los antimicóticos de una manera rápida, economizando así el consumo de reactivos y tiempo invertidos en el desarrollo del método.

-El uso de diseños experimentales del tipo del que se realizó en este trabajo resulta muy importante sobre todo a nivel industrial cuando no se tiene mucho tiempo disponible para la optimización de los métodos de separación, ya que deben monitorearse un gran número de muestras.

11- CONCLUSIONES

-Fue posible evaluar la influencia de las variables más importantes involucradas en la separación de los enantiómeros de los antimicóticos. En el caso del tipo de ciclodextrina, las β y γ altamente sulfatadas presentaron una mayor enantioselectividad, teniendo que ser utilizadas a concentraciones entre 20 y 25 mM (dependiendo del analito) para obtener las mejores resoluciones. El electrolito soporte con el cual se obtuvieron tanto mejores eficiencias, como mayores alturas de picos a sí como menor perturbación de la línea base, fue el buffer de fosfatos a concentración 30 mM, mismo que favoreció la resolución de los antimicóticos a pH's bajos (entre 2.2 y 2.7). Se requirió del uso de un modificador dinámico, como lo es el CTAB, a baja concentración (0.05 mM) para evitar los fenómenos de adsorción y desdoblamiento de los analitos en las paredes del capilar, siendo óptimas las separaciones cuando se realizaron a la menor temperatura evaluada (15°C) y al mayor voltaje aplicado (30 kV). De esta forma se encontraron las condiciones óptimas de separación quiral para cada uno de los antimicóticos estudiados.

-Se desarrollaron de manera satisfactoria los métodos de separación de los antimicóticos de bifonazol, econazol, ketoconazol, miconazol y sulconazol mediante la técnica de electroforesis capilar obteniéndose una mayor enantioselectividad con las β y γ ciclodextrinas altamente sulfatadas.

-Los métodos de separación quiral desarrollados para el caso del bifonazol y el miconazol fueron aplicados satisfactoriamente en productos farmacéuticos comerciales, el del ketoconazol lo fue en muestras biológicas.

-El diseño experimental de monitoreo (2²) aplicado para lograr la separación aquiral de la mezcla de los cinco antimicóticos resultó una estrategia eficiente para lograr el objetivo de una forma rápida. Esto resulta particularmente importante sobre todo a nivel industrial en donde no se dispone de mucho tiempo para la optimización de los métodos, sobre todo cuando debe analizarse una gran cantidad de sustancias.

Por otra parte, se hace evidente la importancia de contar con un método con el que puedan analizarse hasta cinco sustancias al mismo tiempo, tal como puede ser el caso de pacientes cuyas terapias consisten en la administración de varios antimicóticos de manera prolongada los cuales deben de ser sometidos a un monitoreo sanguíneo de los niveles de estos fármacos con la finalidad de evitar daños tanto de naturaleza renal como hepática.

-Con la técnica de cromatografía capilar micelar electrocinética fue posible desarrollar un método para la separación simultánea (aquiral) de una mezcla de los cinco antimicóticos de estudio, resultando el bromuro de cetil trimetil amonio un surfactante apropiado para interaccionar (solubilizar), selectivamente con cada uno de los cinco compuestos en su forma neutra.

12-ANEXOS

Anexo 1.

KUNGL.
VETENSKAPSAKADEMIEN
THE ROYAL SWEDISH ACADEMY OF SCIENCES

The 2001 Nobel Prize in Chemistry

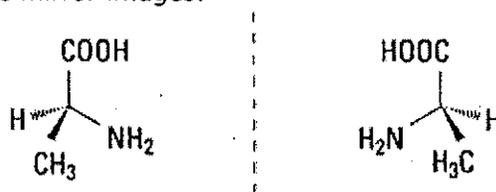
10 October 2001

Three scientists share this year's Nobel Prize in Chemistry: **William S. Knowles**, previously at Monsanto Company, St. Louis, Missouri, USA; **Ryoji Noyori**, Nagoya University, Chikusa, Nagoya, Japan and **K. Barry Sharpless**, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA. The Royal Swedish Academy of Sciences has awarded the Prize for their development of catalytic asymmetric synthesis. The achievements of these three chemists are of great importance for academic research, for the development of new drugs and materials, and are being used in many industrial syntheses of pharmaceutical products and other biologically active substances. This is a description and background information about the scientists' award-winning discoveries.

Mirror Image Catalysis

Chiral molecules

This year's Nobel Prize in Chemistry concerns the way in which certain chiral molecules can be used to speed up and control important chemical reactions. The word *chiral* comes from the Greek word *cheir*, which means hand. Our hands are chiral – our right hand is a mirror image of our left hand – as are most of life's molecules. If, for example, we study the common amino acid alanine (figure 1), we see that it can occur in two forms: (*S*)-alanine and (*R*)-alanine, which are mirror images.



(*S*)-alanine mirror plane (*R*)-alanine

Figure 1. Chirality in the amino acid alanine is illustrated with models of its two forms, which are mirror images of each other. They are designated (*S*) and (*R*).

However we twist or turn these forms, we cannot get them to overlap each other. Apparently, they do not have the same three-dimensional structure. The reason is that the carbon atom in the centre binds the four different groups H, CH₃, NH₂ and COOH, which are

located at the corners of a tetrahedron. The unbroken bonds to NH_2 and COOH indicate that these bonds are in the plane of the paper, whereas the black wedge shaped bond and the broken wedge shaped bond show that they are directed upwards and downwards respectively in relation to the plane of the paper.

It was the Dutch chemist J. H. van 't Hoff and the French chemist J. A. Le Bel who, independently of each other in 1874, discovered this tetrahedral arrangement of the groups around the central carbon atom. (van 't Hoff received the first Nobel Prize in Chemistry 1901, but for other discoveries.)

Thus the amino acid alanine occurs in two forms, called *enantiomers*. When alanine is produced in a laboratory under normal conditions, a mixture is obtained, half of which is (*S*)-alanine and the other (*R*)-alanine. The synthesis is symmetrical in the sense that it produces equal amounts of both enantiomers.

Asymmetric synthesis, on the other hand, deals with the production of an excess of one of the forms. Why is this so important? Let us go back to nature to find the answer.

Nature is chiral

One may well think that both forms of chiral molecules ought to be equally common in nature, the reactions should be symmetrical. But when we study the molecules of the cells in close-up, it is evident that nature mainly uses one of the two enantiomers. That is why we have – and this applies to all living material, both vegetable and animal – amino acids, and therefore peptides, enzymes and other proteins, only of one of the mirror image forms. Carbohydrates and nucleic acids like DNA and RNA are other examples.

Thus the enzymes in our cells are chiral, as are other receptors that play an important part in cell machinery. This means that they prefer to bind to one of the enantiomers. In other words, the receptors are extremely selective; only one of the enantiomers fits the receptor's site like a key that fits a lock. (This metaphor comes from another Nobel Laureate in Chemistry, Emil Fischer, who was awarded the Prize in 1902.)

Since the two enantiomers of a chiral molecule often have totally different effects on cells, it is important to be able to produce each of the two forms pure.

Drugs and the smell of lemons

Most drugs consist of chiral molecules. And since a drug must match the molecules it should bind to itself in the cells, it is often only one of the enantiomers that is of interest. In certain cases the other form may even be harmful. This was the case, for example, with the drug thalidomide, which was sold in the 1960s to pregnant women. One of the enantiomers of thalidomide helped against nausea, while the other one could cause fetal damage.

There are other, less dramatic examples of how differently the two enantiomers can affect our cells. *Limonene*, for example, is chiral, but the two enantiomers can be difficult to distinguish at first glance (figure 2). The receptors in our nose are more sensitive. One form certainly smells of lemons but the other of oranges.

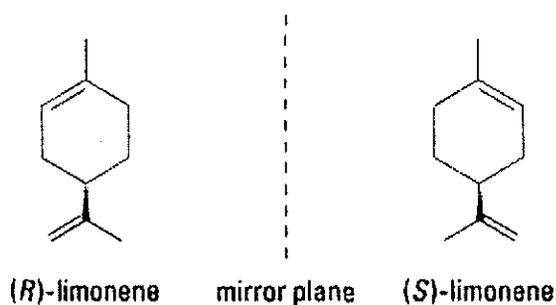


Figure 2. (*R*)-limonene smells of oranges while its enantiomer (*S*)-limonene smells of lemons

Catalytic asymmetric synthesis - What is it?

It is very important for industry to be able to produce products as pure as possible. It is also important to be able to manufacture large quantities of a product. For this reason the use of catalysts is very important. A catalyst is a substance that increases the rate of the reaction without being consumed itself.

During the past few decades there has been intensive research into developing methods for producing - synthesising - one of the enantiomers rather than the other. In a synthesis starting molecules (substrate molecules) are used to build new molecules (products) by means of various chemical reactions. It is to researchers in this field that this year's Nobel Prize in Chemistry has been awarded. The Laureates have developed chiral catalysts for two important classes of reactions in organic chemistry: hydrogenations and oxidations.

Knowles' pioneer work

In the early sixties it was not known whether catalytic asymmetric hydrogenation was feasible, i.e. would it be possible to catalyse an asymmetric reaction to produce an excess of one of the enantiomers? The breakthrough came in 1968 when William S. Knowles was working at the Monsanto Company, St Louis, USA. He discovered that it was possible to use a transition metal to produce a chiral catalyst that could transfer chirality to a non-chiral substrate and get a chiral product. The reaction was a *hydrogenation* in which the hydrogen atoms in H_2 are added to the carbons in a double bond. A single catalyst molecule can produce millions of molecules of the desired enantiomer.

Knowles' experiments were based on two discoveries that had been made a few years previously. In 1966 Osborn and Wilkinson had published their pioneering synthesis of a soluble transition metal complex, (A in figure 3), that made it possible to catalyse a hydrogenation in solution. Their metal complex was not chiral. At the centre of the complex was the transition metal rhodium which bound four groups, ligands: three triphenylphosphine molecules and one chlorine.

The second discovery on which Knowles' pioneering work is based on, is Horner's and Mislow's syntheses of chiral phosphines, for example the enantiomer B shown in figure 3. Knowles' hypothesis was that it might be possible to produce a catalyst for *asymmetric* hydrogenation if the triphenylphosphine groups in Osborn and Wilkinson's metal complex (A) was replaced by one of the enantiomers of a chiral phosphine.

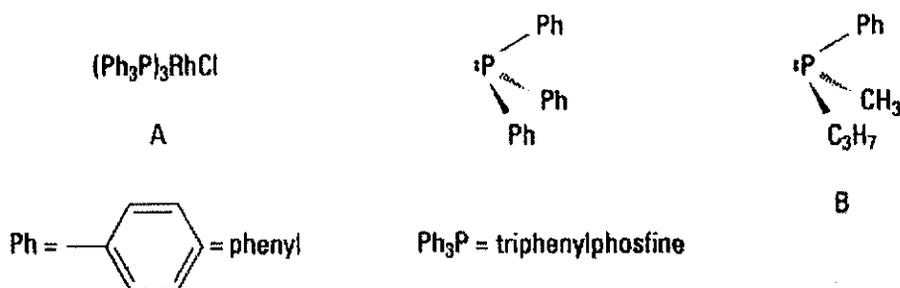


Figure 3. Knowles exchanged the non-chiral phosphine triphenylphosphine in A to the chiral phosphine B and obtained a catalyst for asymmetric hydrogenation.

The phosphine first used by Knowles was not enantiomerally pure, yet it produced a mixture in which there was 15% more of one enantiomer than the other. In other words the enantiomeric excess was 15%.

Although this excess was modest and hardly of any practical use, the result proved that it was in fact possible to achieve catalytic asymmetric hydrogenation. Other scientists (Horner, Kagan, Morrison and Bosnich) reached similar results shortly afterwards and they

have all contributed to open the door to a new, exciting and important field for both academic and industrial research.

The first industrial catalytic asymmetric synthesis

Knowles' aim was to develop an industrial synthesis of the amino acid L-DOPA, which had proved useful in the treatment of Parkinson's disease – a discovery for which A. Carlsson was awarded last year's Nobel Prize in Physiology or Medicine. By testing enantiomers of phosphines with a varied structure Knowles and his colleagues quickly succeeded in producing usable catalysts that provided a high enantiomeric excess, that is, principally L-DOPA.

The ligand later used in Monsanto's industrial synthesis of L-DOPA was the diphosphine ligand DiPAMP. A rhodium complex with this ligand (figure 4) gave a mixture of the enantiomers of DOPA in 100% yield. The product contained of 97.5% L-DOPA. Thus Knowles had in a short time succeeded in applying his own basic research and that of others to create an industrial synthesis of a drug. This was the first catalytic asymmetric synthesis. It has been succeeded by many others.

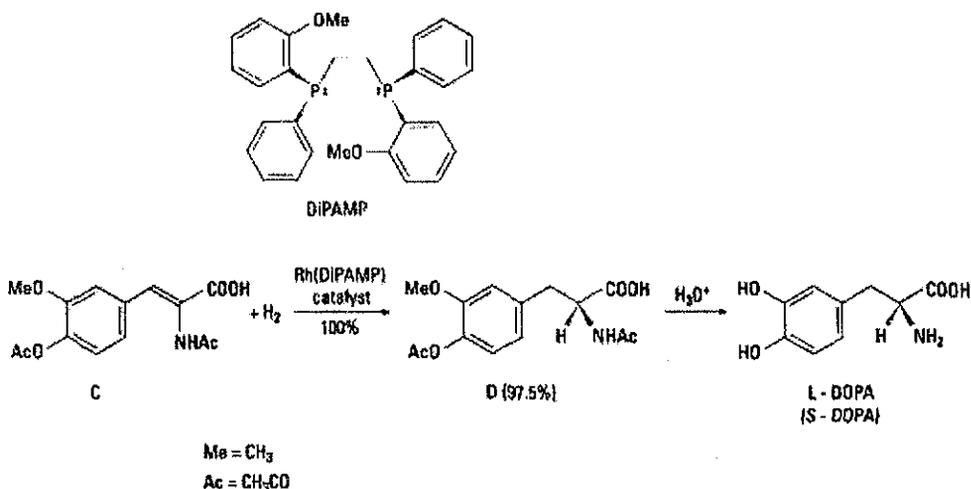


Figure 4. In this industrial synthesis of L-DOPA developed by Knowles and co-workers the compound C was used as the starting material. In the chiral hydrogenation one of the enantiomers of DiPAMP was used. The enantiomer D was 97.5% of the product and after acid hydrolysis of D, L-DOPA was obtained.

How does a chiral catalyst molecule work?

What part does the catalyst molecule itself actually play in asymmetric hydrogenation? Studies by the inorganic chemist J. Halpern and others have clarified the reaction mechanism. The transition metal, rhodium for example, in figure 4, which binds the chiral diphosphine, has the ability to simultaneously bind both H_2 and the substrate. The complex obtained then reacts and H_2 is added to the double bond in the substrate. This is the vital hydrogenation stage, when a new chiral complex is formed from which the chiral product is released. Thus from a substrate that is *not* chiral, chirality has been transferred from the chiral catalyst to the product. This product contains more of one enantiomer than of the other, that is, the synthesis is asymmetric.

The reason for the enantiomeric excess is to be found in the hydrogenation stage, as the hydrogen can be added in two ways that give the different enantiomers at different rates. These two pathways utilise different transition complexes, which are not mirror images and therefore have different energy. Hydrogenation takes place more rapidly via the complex with the lowest energy, thus producing an excess of one of the enantiomers. This can be

compared with the hands in a handshake (figure 5). The hands in a handshake between two right hands match better than a handshake between a right and a left hand.

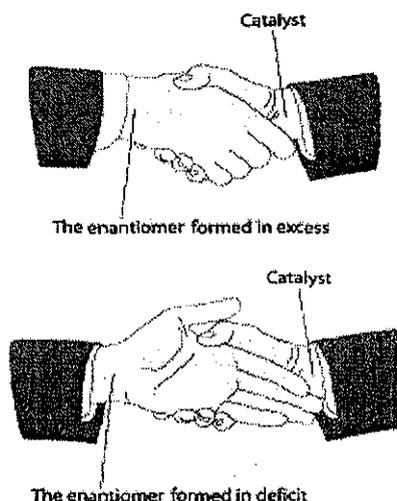


Figure 5. The hands on the right symbolise the catalyst and the hands on the left the products. They match better in the upper picture (the energy is lower) than in the lower picture.

In the development of better asymmetric hydrogenation catalysts it is important to increase the energy difference between the transition complexes in order to obtain, as a consequence, larger enantiomeric excess. This is of vital interest in industrial applications in which the aim is to achieve economy in the process and environmentally acceptable methods, that is, as few waste products as possible. This development has been led by another of this year's Laureates in chemistry, Ryoji Noyori.

Noyori's general hydrogenation catalysts

The Japanese scientist Ryoji Noyori has carried out extensive and intensive research and developed better and more general catalysts for hydrogenation. The consequences of his research are of great importance.

In 1980 Noyori and co-workers published an article on the synthesis of both enantiomers of the diphosphine ligand BINAP (figure 6). These catalyse, in complexes with rhodium, the synthesis of certain amino acids with an enantiomeric excess of up to 100%. The company Takasago International uses BINAP in the industrial synthesis of the chiral aroma substance menthol, since the early 1980s.

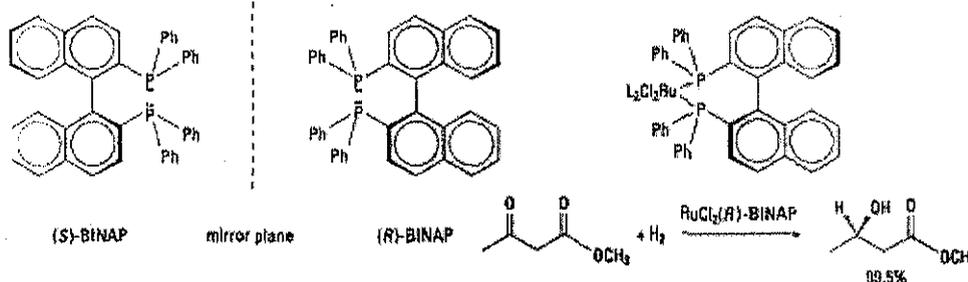


Figure 6. The two enantiomers of Noyori's useful BINAP is shown together with an example of a stereoselective ketone reduction where the ester function is left intact.

But Noyori also saw the need for more general catalysts with broader applications. Exchanging rhodium, Rh(I), for another transition metal, ruthenium, Ru(II), proved, for

example, to be successful. The ruthenium(II)-BINAP complex hydrogenates many types of molecules with other functional groups. These reactions give a high enantiomeric excess and high yields and can be scaled up for industrial use. Noyori's Ru-BINAP is used as a catalyst in the production of (*R*)-1,2-propanediol for the industrial synthesis of an antibiotic, levofloxacin. Similar reactions are used for the synthesis of other antibiotics. Figure 6 gives an example of a stereoselective ketone reduction.

Noyori's catalysts have found wide application in the synthesis of fine chemicals, pharmaceutical products and new, advanced materials.

Sharpless' chirally catalysed oxidations

Alongside the advances in chirally catalysed hydrogenation reactions, Barry Sharpless has developed corresponding chiral catalysts for other important reactions, *oxidations*. While hydrogenation removes a functional group because the double bond is saturated, oxidation leads to increased functionality. This creates new possibilities for building new complex molecules.

Sharpless realised that there was a great need for catalysts for asymmetric oxidations. He also had ideas as to how these could be achieved. He has made several important discoveries which here are exemplified by his chiral epoxidation. In 1980 he carried out successful experiments that led to a practical method for the catalytic asymmetric oxidation of allylic alcohols to chiral epoxides. This reaction utilised the transition metal titanium (Ti) and chiral ligands and gave high enantiomeric excess. Epoxides are useful intermediary products for various types of synthesis. This method opened up the way for great structural diversity and has had very wide applications in both academic and industrial research. The synthesis of the epoxide (*R*)-glycidol is shown in figure 7.

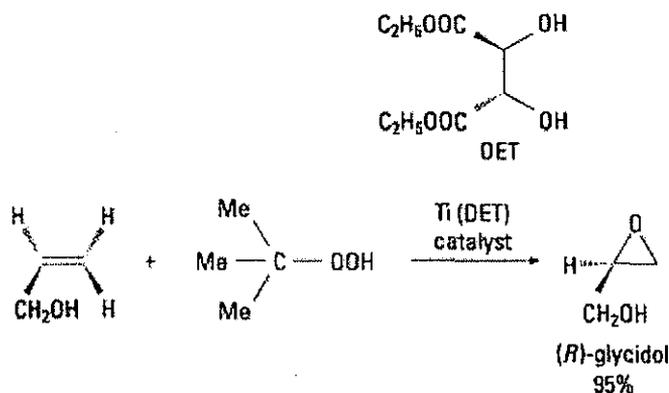


Figure 7. The allylic alcohol is oxidised to the epoxide (*R*)-glycidol using the oxidising agent tertiary butylhydroperoxide in the presence of a catalyst. This catalyst is formed in the reaction mixture of titanium tetraisopropoxide and the diethylester of naturally occurring D-tartaric acid. The metal simultaneously binds the chiral ligand, the hydroperoxide and the substrate, after which the chiral epoxidation takes place.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Glycidol is used in the pharmaceutical industry to produce beta-blockers, which are used as heart medicines. Many scientists have identified Sharpless' epoxidation as the most important discovery in the field of synthesis during the past few decades.

Consequences and applications

Many of the applications of this year's Nobel Laureates' pioneering work have already been discussed. It is especially important to emphasise the great significance of their discoveries and improvements for industry. New drugs are the most important application, but we may also mention the production of flavouring and sweetening agents, and insecticides. This year's Nobel Prize in Chemistry shows that the step from basic research to industrial application could sometimes be a short one.

All around the world many research groups are busy developing other catalytic asymmetric syntheses that have been inspired by the Laureates' discoveries. Their discoveries have provided academic research with many important tools, thereby contributing to more rapid advances in research - not only in chemistry but also in materials science, biology and medicine. Their work gives access to new molecules needed to investigate hitherto undiscovered and unexplained phenomena in the molecular world.

The Laureates

William S. Knowles

84 years, born 1917 (US citizen). PhD 1942 at Columbia University. Previously at Monsanto Company, St Louis, USA. Retired since 1986.

Ryoji

<http://www-noyori.os.chem.nagoya-u.ac.jp>

Noyori

63 years, born 1938 Kobe, Japan (Japanese citizen). PhD 1967 at Kyoto University. Since 1972 Professor of Chemistry at Nagoya University and since 2000 Director of the Research Center for Materials Science, Nagoya University, Nagoya, Japan.

K. Barry

<http://www.scripps.edu/chem/sharpless/kbs.html>

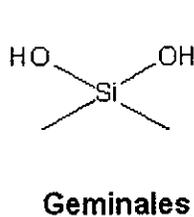
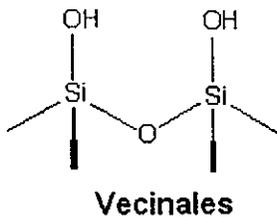
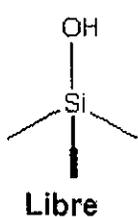
Sharpless

60 years, born 1941 Philadelphia, Pennsylvania, USA (US citizen). PhD 1968 at Stanford University. Since 1990 W.M. Keck Professor of Chemistry at the Scripps Research Institute, La Jolla, USA.

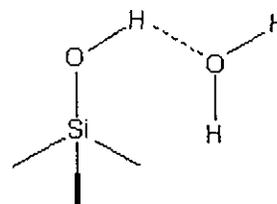
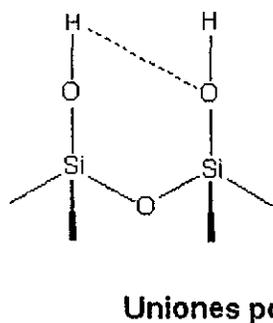
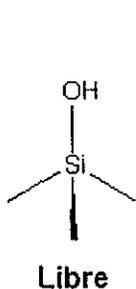
Anexo 2.***Tipos de enlaces presentes en la sílice fundida.***

La sílice fundida es un material muy heterogéneo en cuanto al tipo de grupos silanol que posee. El pKa aproximado de los grupos silanol es de 6.0. [103], este tipo de superficie puede dividirse en los siguientes tipos:

a) De acuerdo al tipo de enlace con los átomos de silicio



b) De acuerdo a la posible formación de puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo adyacentes o con agua físicamente adsorbida



Por lo tanto, la suma de la población de diferentes grupos silanol proporciona un valor de pKa aproximado de 6.0.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Anexo 3

Teoría de los tres puntos de interacción entre selectores quirales y enantiómeros.

El proceso de reconocimiento quiral puede ser representado esquemáticamente (figura 1) [93]. En esta figura puede observarse que existen tres puntos posibles de interacción entre el soluto quiral (sitios A', B', y C') y el selector quiral ligado a la fase estacionaria quiral (sitios A, B y C). El enantiómero I interacciona en tres sitios A-A', B-B', y C-C' mientras que su imagen especular, el enantiómero II, no presenta la interacción C-C'. Si la interacción C-C' favorece la estabilización del complejo diastereomérico transitorio entre el enantiómero I y la CSP, el enantiómero I será retenido en la columna más tiempo que el enantiómero II. Sin embargo, una interacción C-C' menos estable revertirá el orden de elución, por ejemplo, el enantiómero I eluirá antes que el enantiómero II. Si la interacción C-C' es mínima o inexistente, no ocurrirá reconocimiento quiral y el racemato no será resuelto.

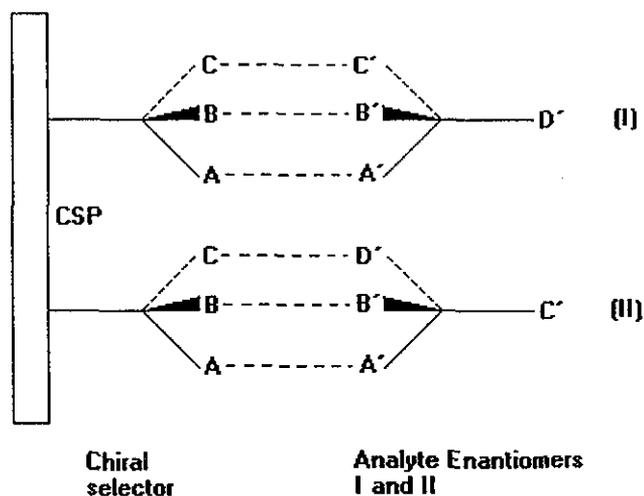


Figura 1. Modelo de interacción de los tres puntos de reconocimiento quiral

El modelo de los tres puntos de interacción sugiere que al menos tres interacciones atractivas entre el receptor o selector quiral y uno de los enantiómeros del racemato debe ser posible para obtener enantioselectividad, o incluso dos interacciones atractivas y una repulsiva. Al menos una interacción debe depender de la estereoquímica en el centro quiral tanto del receptor como del enantiómero. Las interacciones deben ser de diferente naturaleza, por ejemplo, puentes de hidrógeno, interacciones π - π o interacciones dipolo-dipolo. De otra forma, se podrían generar asociaciones desfavorables. Por ejemplo, si más de una interacción π - π es posible entre un enantiómero y el receptor, este último podría resultar “confundido” y perder su capacidad para realizar el reconocimiento molecular. Si las interacciones A-A' y B-B' son interacciones π - π similares, podemos esperar también que ocurran interacciones A-B', B-A', como se muestra en la figura 2, ambos enantiómeros deben ser retenidos en el mismo grado, impidiendo de este modo la resolución.

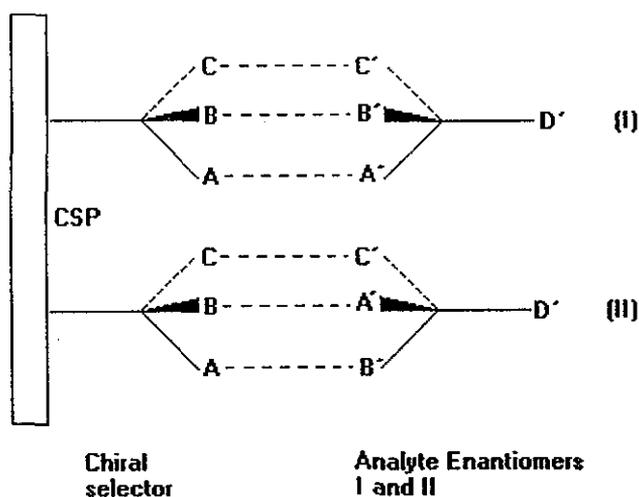


Figura 2. Interacciones no discriminativas debido a dos interacciones π - π similares (A-A', B-B').

Como ya se mencionó, el reconocimiento quiral es posible sólo si en el proceso de asociación al menos se ven involucradas una interacción repulsiva y dos atractivas. La interacción repulsiva es a menudo llamada estérica. Un caso típico es cuando un grupo voluminoso está ligado a un centro quiral. Sin embargo, incluso en presencia de un grupo de estas características, es posible una interacción atractiva si uno de los enantiómeros forma un acoplamiento estérico adecuado y forma interacciones de van der Waals favorables con el grupo voluminoso. Por ejemplo, considérese la explicación de Pirkle [104] respecto a la enantioselectividad obtenida con dos interacciones atractivas (interacción π - π y puente de hidrógeno) junto con una interacción estérica (figura 3). Es obvio que el enantiómero II experimentará una repulsión neta mayor proveniente de la fase estacionaria debida a la posición desfavorable de su grupo voluminoso. Un efecto secundario de este impedimento estérico es el debilitamiento de las interacciones π - π y ácido-base. El enantiómero I lleva a cabo interacciones más fuertes de lo que lo hace el enantiómero II y es preferencialmente retenido en la columna. Evidencias de estas interacciones han sido obtenidas mediante análisis de RMN [105] así como a partir de cálculos de mecánica molecular [106].

Las interacciones entre un selector y un analito son típicamente representadas como si ocurrieran en las esquinas de dos tetraedros centrados en los centros estereogénicos de las dos especies. El uso de los tetraedros provee de un esquema simplificado del proceso de reconocimiento molecular, sin embargo, es potencialmente erróneo. La regla de los tres puntos de interacción no implica el que las funciones interactuantes deban estar similarmente distribuidas con respecto a los centros estereogénicos del selector y el analito.

Considérese el caso en que los dipolos yacen a lo largo de los vectores de AB y A'B' tal y como se muestra en la figura 4. La interacción de estos dipolos es equivalente a dos interacciones atractivas, y el reconocimiento quiral resulta a partir de la interacción discriminatoria C-C'. Un argumento similar puede ser aplicado a las interacciones π - π entre anillos aromáticos.

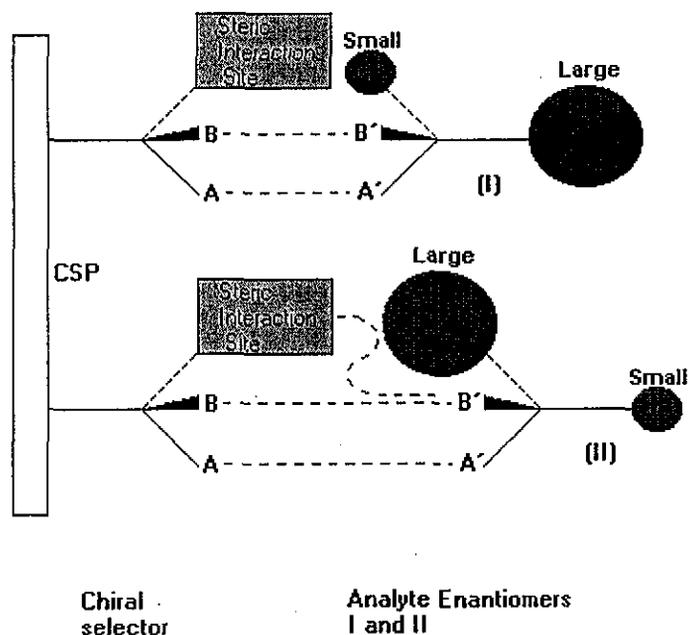


Figura 3. Discriminación debida a una interacción de naturaleza repulsiva y dos atractivas (ácido-base, π -ácido- π -base).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

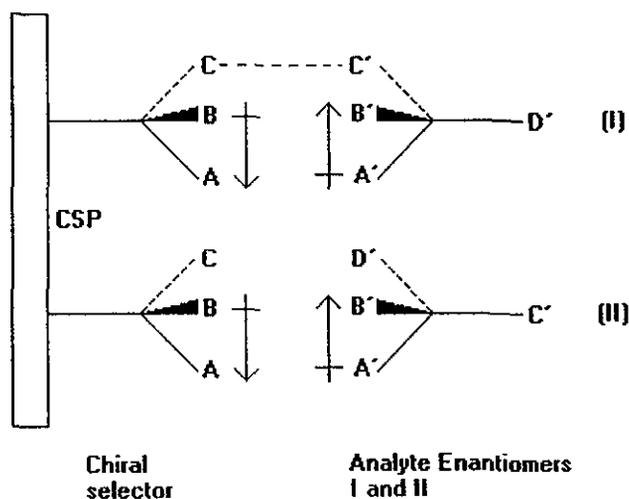


Figura 4. Discriminación vía interacción dipolo-dipolo.

Dicho de otra forma, las especies involucradas no necesariamente deben tener una conformación tetraédrica, aunque existe cierta rigidez sobre todo en la vecindad de los centros quirales. La flexibilidad puede llegar a reducir la capacidad de un receptor enantioselectivo, tal como se ejemplifica en la figura 5.

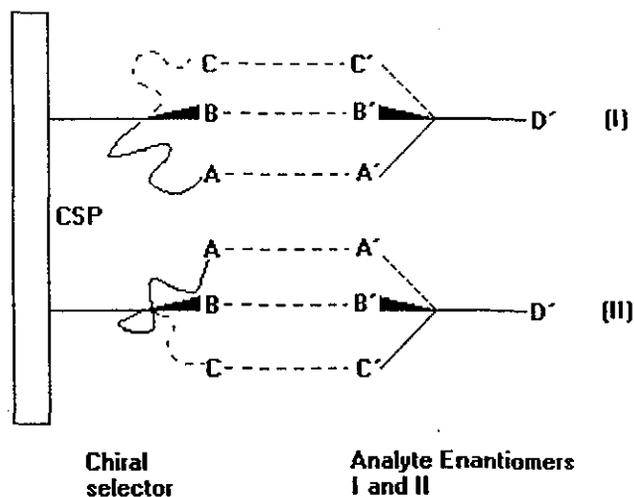


Figura 5. Interacciones no discriminativas debido a la flexibilidad del selector quiral.

En este caso, el receptor es capaz de llevar a cabo tres interacciones con ambos enantiómeros. Similarmente, los receptores muy rígidos pueden no distinguir entre los enantiómeros que son altamente flexibles.

Si los receptores se hallan muy próximos (tal como puede ocurrir en estructuras enlazadas con una alto recubrimiento superficial), es probable que la selectividad sea pobre. Una explicación a este hecho podría ser el que la retención de los enantiómeros es favorecida por su interacción con más de una molécula receptora adyacente. Con ciertas fases estacionarias para cromatografía de líquidos, al disminuir la concentración de receptores se reduce simultáneamente este efecto y se incrementa la importancia de las interacciones C-C'. Como consecuencia, se ha observado una mayor enantioselectividad en columnas de sílice menos densamente enlazadas a receptores.

Cabe preguntarse si los mecanismos de reconocimiento molecular planteados realmente explican los procesos reales [107]. Es relativamente simplista pensar que el complejo proceso de enantioseparación puede ser explicado por modelos hasta cierto punto sencillos. El reconocimiento quiral se origina a partir de la formación de todos los complejos posibles: diferentes direcciones de aproximamiento, diferentes conformeros, y diferentes combinaciones de tres (o más) interacciones simultáneas. Incluso puede decirse que la mayor parte de las interacciones transitorias entre el enantiómero y la fase estacionaria no son enantioselectivas. Por supuesto que sólo aquellas pocas interacciones que contribuyen a la enantioselectividad son de interés.

Anexo 4

Diseños factoriales.

Los diseños simultáneos son colectivamente llamados diseños factoriales y pueden ser en general agrupados en las siguientes clases:

-Los diseños en los cuales el énfasis recae en detectar qué factores pueden tener una determinada influencia o bien determinar dicha influencia. El diseño básico empleado es el diseño factorial completo de dos niveles. Los diseños factoriales de dos niveles son empleados para determinar si ciertos factores o la interacción entre dos o más factores tienen efecto en la respuesta y estimar la magnitud de tal efecto. Este tipo de diseño requiere de que se hagan tantos experimentos como combinaciones haya de los dos niveles de los k factores considerados. Tales experimentos son llamados *corridos* o *tratamientos*.

Los experimentos de dos factores a dos niveles pueden ser representados como se muestra en la figura 1. Por supuesto, más factores pueden ser incluidos tal como se muestra en la figura 2, representativa de experimentos de tres factores. El número de experimentos es igual a 4 ($=2^2$) en la figura 1 y a 8 ($=2^3$) en la figura 2. En general, el número de experimentos requeridos es 2^k , donde k es el número de factores.

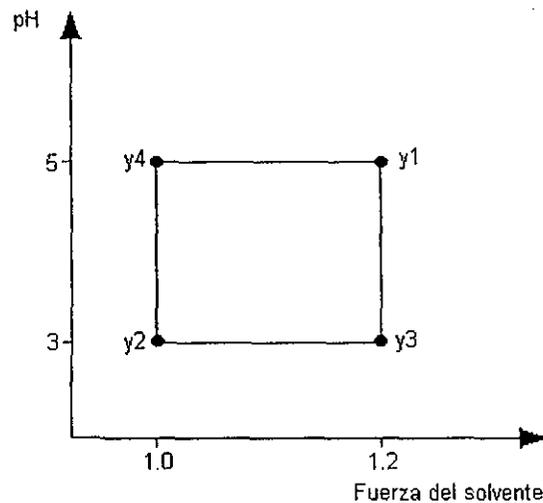


Figura 1. Un diseño de dos factores a dos niveles. Los factores son la fuerza del solvente (niveles 1.0 y 1.2) y pH (niveles 3 y 5). Se llevan a cabo cuatro experimentos, a partir de los cuales se obtienen las respuestas y_1 a y_4 (retención de un compuesto analizado por cromatografía de líquidos).

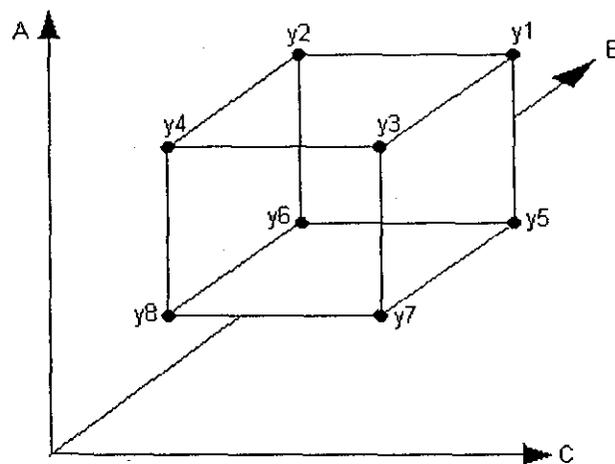


Figura 2. Un diseño de tres factores a dos niveles. Con los factores A, B y C.

Los niveles pueden ser representados de diferentes formas. Una de ellas indica un nivel como + (o +1) y el otro como - (o -1). Cuando los factores son cuantitativos el nivel +

indica el valor más alto, el nivel – el más bajo y 0 indica el centro o valor entre los dos anteriores

Cuando el número de factores se incrementa, también lo hace el número de experimentos a realizar. Por ejemplo, para 10 variables se requieren 1024 experimentos. En tales casos, sólo se hace una fracción de estos experimentos, por ejemplo 1/2, 1/4, 1/8. Estos diseños se conocen como *diseños factoriales fraccionales*. Debido a que se realizan menos experimentos, se pierde información acerca de algunas o todas las interacciones. En algunos casos uno puede no estar interesado en las interacciones. Esto es muy común cuando el único objetivo del experimento es determinar qué factores son relevantes para una o más respuestas. Por ejemplo, cuando se estudia un nuevo proceso, puede ocurrir que no se conozcan todos los factores que afecten los resultados, pero se puede hacer un *monitoreo* de aquellos potencialmente más importantes.

13-LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo:	Significado:
C	Concentración
DL₅₀	Dosis Letal Media
Δμ.	Diferencia de Movilidades Electroforéticas
e	Carga del electrón
ε	Constante Dieléctrica
E	Campo eléctrico aplicado
F_E	Fuerza Eléctrica
F_F	Fuerza Friccional
I	Fuerza iónica
kV	Kilo Volts
L_D	Longitud al Detector
L_T	Longitud Total de la columna
λ_{máx}	Longitud de Onda de Máxima Absorción
mM	Mili molar
μ_{ap}	Movilidad Electroforética Aparente
μ_e	Movilidad electroforética
μ_{ef}	Movilidad Electroforética Efectiva
μ_{EOF}	Movilidad Electroforética del EOF
μ_T	Movilidad Total de un analito

N	Eficiencia
η	Viscosidad de la solución
pI	Punto Isoeléctrico
q	Carga
r	Radio iónico
R	Resolución
R_S	Resolución
T	Temperatura
t	Tiempo (de análisis)
V_{EOF}	Velocidad del Flujo Electro Osmótico
V	Velocidad del soluto o molécula cargada (ion)
V	Voltaje aplicado
Z	Carga de un ion
ξ	Potencial Zeta

14-LISTA DE ABREVIATURAS

<u>Abreviatura:</u>	<u>Significado:</u>
αCD	Alfa Ciclo Dextrina
βCD	Beta Ciclo Dextrina
CCME	Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética
CD's	Ciclodextrinas
CG	Cromatografía de Gases
CMC	Concentración Micelar Crítica
CSP	Chiral Stationary Phase
CTAB	bromuro de N-Cetil-N,N,N-trimetil amonio
DMβCD	Dimetil Beta Ciclodextrina
EC	Electroforesis Capilar
ECC	Electrocromatografía Capilar
ECG	Electroforesis Capilar en Gel
ECZ	Electroforesis Capilar de Zona
EFG	Electroferograma
EIC	Enfoque isoeléctrico Capilar
EM	Espectrometría de Masas
EOF	Electro Osmotic Flow
ES	Electrolito Soporte
FDA	Food and Drug Administration

GS	Grado de Sustitución de una ciclodextrina
γCD	Gama Ciclo Dextrina
HPβCD	Hidroxi Propil Beta Ciclodextrina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSαCD	Highly Sulphated Alfa Cyclodextrin
HSβCD	Highly Sulphated Beta Cyclodextrin
HSγCD	Highly Sulphated Gamma Cyclodextrin
ITC	Isotacoforesis Capilar
L_D	Límite de detección
MβCD	Metil Beta Ciclo Dextrina
nm	Nanómetros
OVM	Ovomucoide
PAA	Poliacrilamida
pI	Punto isoeléctrico
PVA	Alcohol Polivinílico
RPLC	Reverse Phase Liquid Chromatography
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TEA	Tri Etanol Amina
UV	Luz Ultravioleta

15-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Polak, A., Jucker, E., *Progress in Drug Research* . Ed., Birkhauser Verlag, 49, (1997), 219.
- [2] Fostel, J. M., Lartey, P. A., *DDT*, 5 (2000), 25.
- [3] Lartey, P. A., Moehle, C. M., 1997, *Recent advances in antifungals agents. In Annual Reports in Medicinal Chemistry*. Ed Plattner Academic Press, J.J., (1997), pp. 151-160.
- [4] Takano, H., Oguri, Y. and Kato, T., *Nippon Noyaku Gakkaishi*, 11, (1986), 373.
- [5] Thalidomide Is Back. Author/s: Karen Wright Issue: April, 2000
- [6] Report of the Department Of Health and Human Services, the Food and Drug Administration and the Center for drug Evaluation and Research. Thursday, October 22, (1998).
- [7] Ahuja, S., *Chiral Separations: Applications and Technology*, American Chemical Society, Washington, D.C., 1997. Copyright American Chemical Society (1997).
- [8] Kitazaki, T., Tasaka, A., Hosono, H., Matsushita, Y., Itoh, K. *Chem. Pharm. Bull.* 47, (1999), 360.
- [9] Roychowdhury, U., Das, S. K. *J. of AOAC Int.*, 79, (1996), 656.
- [10] Zarapkar, S. S., Halkar, U. P. *Indian Drugs*, 28, (1991), 265.
- [11] Wallace, S. M., Shah, V. P., Riegelman, S., Epstein, W. L. *Anal. Lett.*, B11, (1978), 461.
- [12] Szathmary, S. C., Luhmann, I., *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 69, (1988), 119.
- [13] Kedor-Hackmann, E.R.M., Nery, M.M.F., Santoro, M.I.R.M., *Anal. Lett.*, 27, (1994), 363.

- [14] Abdelmageed, O.H., Khashaba, P.Y., *Talanta*, 40, (1993), 1289.
- [15] Fijalek, Z., Chodkowski, J., Warowna, M., *Acta Pol. Pharm.*, 49, (1992), 1.
- [16] Abounassif, M.A., El-Sazly, B.E.D.M., *Anal. Lett.*, 22, (1990), 2233.
- [17] Tucker, R.P., Fell, A.F., Berridge, J.C., Coleman, M.W., *Chirality*, 4, (1992), 316.
- [18] Chankvetadze, B., Chankvetadze, L., Sidamonidze, S., Yashima, E., Okamoto, Y., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14, (1996), 1295.
- [19] Sybliska, D., Zukovsky, J., in A.M. Krstulovic (Editor), *Chiral Separation by H.P.L.C.: applications to Pharmaceutical Compounds*, Ellis Horwood, Chichester, (1989), Ch 7, pp 147.
- [20] Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., *Anal. Chem.*, 53, (1981), 1298.
- [21] Guttman, A., Paulus, A., Cohen, A., Gringberg, N., Karger, B.L., *J. Chromatogr.*, 448, (1988), 41.
- [22] Fanali, S., Bocek, P., *Electrophoresis*, 11, (1990), 757.
- [23] Snopek, J., Soini, H., Novotony, M., *J. Chromatogr.*, 559, (1991), 215.
- [24] Prunonosa, J., Obach, R., Diezcason, A., Guoesclov, L., *J. Chromatogr.*, 574, (1992), 127.
- [25] Penn, S.G., Goodall, D.M., Loran, J.S., *J. Chromatogr.*, 636, (1993), 149.
- [26] Penn, S.G., Bergstrom, E.T., Goodall, D.M., Loran, J.S., *Anal. Chem.*, 66, (1994), 2866.
- [27] Chakvetadze, B., Endresz, G., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A*, 700, (1995), 43.
- [28] Vincent, J.B., Kirby, D.M., Nguyen, T.V., Vigh, G., *Anal. Chem.*, 69, (1997), 4419.

- [29] Morrison, R.T., Boyd, R. N., *Química Orgánica*, Sistemas Técnicos de Edición, S. A. de C. V. (1986), México D.F. páginas, 128-160.
- [30] Satinder Ahuja, *Chiral Separations: by Chromatography*, Oxford University Press, Inc. 198 Madison Avenue, New York, New York 10016, (2000). pp. 42-48; 3-6.
- [31] Ahuja, S., *Chiral Separations: Applications and Technology*, American Chemical Society: Washington, DC, (1997).
- [32] Ahuja, S., Francotte, E., *Chiral Separations: Applications and Technology*, Ed. American Chemical Society: Washington, DC, (1997).
- [33] Ahuja, S., Pirkle, W. and Welch, C., *Chiral Separations by Chromatography*, American Chemical Society, Short Course, (1994).
- [34] Ahuja, S., *Chiral Separations by Liquid Chromatography*, ACS. Washington, DC, (1991).
- [35] Allenmark, S.G., *Chromatographic Enantioseparations: Methods and applications*, Ellis Horwood, Chichester, (1991).
- [36] Gübitz, G., Schmid, M.G., *J. Chromatogr. A*, 792 (1997), 219.
- [37] Hara, S., Dobashi, A., Kinoshita, K., Hondo, T., Saito, M., Senda, M., *J. High Resolut. Chromatogr.*, 371 (1986) 153.
- [38] Schuring, V., Nowotny, H.P., *Angew. Chem.*, 9, (1990), 969.
- [39] Singh, N.H., Pasutto, F.N., Coutts, R.T., Jamali, F., *J. Chromatogr.* 378, (1986), 125.
- [40] Kobor, F., Schomburg, G., *High. Res. Chromatogr.*, 16, (1993), 693.
- [41] Di Pietra, A. M., Andrisano, V., Gotti, R., Cavrini, V., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1191.
- [42] Tendolkar, N.M., Desai, B. S., Shinde, V.M., *Ind. Drugs*, 31 (1994) 551.

- [43] Kublin, E., Taniewska, T., *Chem. Anal. (Warsaw)*, 41 (1996) 19.
- [44] El Shabouri, S.R., Emara, K.M., Khashaba, P.Y., Mohamed, A.M., *Anal. Lett.*, 31 (1998) 1367.
- [45] Tkach, V.I., Karandeeva, N. I., *Farm. Zh.*, 5 (1996) 86.
- [46] Fijalek, Z., Chodkowsky, J., Warowna, M., *Acta Pol. Pharm.* 49 (1992) 1.
- [47] Altria, K.D., Walsh, A.R., and Smith, N.W., *J. Chromatogr.*, 645, (1993), 193.
- [48] Soini, H., Snopek, J. and Novotny, M.V., *J. Chromatogr.*, 559, (1991), 215.
- [49] Nielen, M. W. F., *Anal. Chem.*, 65, (1993), 885.
- [50] Nishi, H., Fukuyama, T., Matsuo, M. and Terabe, T., *J. Chromatogr.*, 515, (1990), 233.
- [51] Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., *Anal. 53, Chem.*, (1981), 1298.
- [52] Li, S.F.Y., *Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications, Journal of Chromatography Library*, Vol. 52, Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, (1992).
- [53] Foret F., Krivanková, L., Bocek, P., *Capillary Zone Electrophoresis*, VCH, Weinheim, (1993).
- [54] Guzmán, N.A., *Capillary Electrophoresis Technology*, Marcel Dekker, New York, (1993).
- [55] Jandik, P., Bonn, G., *Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions*, VCH Publishers, Cambridge, (1993).
- [56] WeinbergerR., *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press, San Diego, CA, (1993).

- [57] Camilleri P., *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, CRC Press, Boca Raton, FL, (1993).
- [58] Kuhn, R., Hoffstetter-Kuhn, *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Berlín, (1993).
- [59] Landers J.P. (Ed), *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC Press, Boca Raton, FL, (1994), pp. 1-649.
- [60] Altria K.D., *Capillary Electrophoresis Guidebook*, Chapman & Hall, London, (1995), pp.1-384.
- [61] Righetti P.G. (Ed), *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, FL, (1996).
- [62] Altria K.D., *Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis*, Vieweg Publishing, Wiesbaden, (1998), pp. 1-176.
- [63] Vargas, M.G., Heyden, Y.V., Maftouh, M., Massart, D.L., *J. Chromatog. A.* 855, (1999), 681.
- [64] Fillet, M., Bechet, I., Crommen., J., *HRC.*, 19, (1996), 669.
- [65] Chiari, M., Damin, F., Reinjenga, J.C., *J. Chromatogr.*, 817, (1998), 15.
- [66] Cobb, K.A., Dolnik, V., Novotny, M., *Anal. Chem.* 62, (1990), 2478.
- [67] Gilges, M., Kleemiss, M.H., Schomburg, G., *Anal. Chem.*, 66, (1994), 2038.
- [68] Hjerten, S., *J. Chromatog.* 347, (1985), 191.
- [69] Righetti, P.G. and Gelfi, C., *J. Cap. Elec.* 1, (1994), 27.
- [70] Schwer, C., *Electrophoresis*, 16, (1995), 2121.
- [71] Pritchett, T.J., *Electrophoresis*, 17, (1996), 1195.
- [72] Verleysen, K., Sandra, P., *Electrophoresis*, 19, (1998), 2798.

- [73] Desiderio, C., Fanali, S., *J. Chromatogr. A*, 807, (1998), 37.
- [74] Villiers, A., *Compt Rendu*, 112, (1891), 536.
- [75] Pitha, Josef./US Patent 4 596 795; 6/24/86: Administration of sex hormones in the form of hydrophillic cyclodextrin derivatives.
- [76] Pitha, Josef./US Patent 4 727 064; 2/23/88: Pharmaceutical preparations containing cyclodextrin derivatives.
- [77] Muller, B.W./US Patent 4 764 604; 8/16/88: Derivatives of Gamma Cyclodextrins.
- [78] Huang, X., Coleman, W.F. and Zare, R.N., *J. Chromatogr.*, 480, (1989), 95.
- [79] Wren, S.A.C., Rowe, R.C., *J. Chromatogr.*, 603, (1992), 235.
- [80] Wren, S.A.C., Rowe, R.C., *J. Chromatogr.*, 609, (1992), 363.
- [81] Rawjee, Y.Y, Williams, R.L., Vigh, Gy., *J. Chromatogr.*, 635, (1993), 291.
- [82] Rawjee, Y.Y, Williams, R.L., Vigh, Gy., *J. Chromatogr.*, 652, (1993), 233.
- [83] Rawjee, Y.Y., Vigh, Gy., *Anal. Chem.*, 66, (1994), 619.
- [84] <http://www.cucba.udg.mx/es/paginter/hongos/MICOSIS.htm>
- [85] <http://diariomedico.com/infeciosas/n030400.html>
- [86] Domínguez, Q.P.J., (1997) *Manual de Antimicóticos: Bases Farmacológicas y Usos Terapéuticos.*, Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- [87] Janssen P A J, Symoens J E, (1983) *Hepatic reactions during ketoconazole treatment*, American Journal of Medicine 74, (1B), 80.
- [88] Lake-Bakaar, G., Sheuer, P.J., Sherlock, S., *Hepatic reactions associated with ketoconazole in the United Kingdom*. British Medical Journal 294, (1987) 419.

- [89] Atkins, P.W, *Fisicoquímica*, 3 ed., Addison-Wesley Iberoamericana, Wilmington, Delaware, USA, (1991), p. 276.
- [90] Fanali, S., *An Introduction to Chiral Analysis by Capillary Eletrcophoresis*, Instituto di Cromatografia del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Area della Ricerche di Roma, P.O. Box 10 00016 Monterotondo Scalo (Roma) Italy.
- [91] Altria, K.D., Goodall, D.M., Rogan, M.M. *Chromatographia*, 34, (1992), 19.
- [92] Atkins, P.W, *Fisicoquímica*, 3 ed., Addison-Wesley Iberoamericana, Wilmington, Delaware, USA, (1991), p. 254.
- [93] Taylor, D.R. and Maher, K.J., *Chromatogr. Sci.*, 30, (1992), 67.
- [94] Vincent, J.B., Sokolowsky, A.D., Nguyen, T.V., Vigh, Gy., *Anal. Chem.*, 69, (1997), 4226.
- [95] Revilla, A.L., Havel, J., Jandik, P., *J. Chromatogr. A.*, 745, (1996), 225.
- [96] Gebauer, P., Desiderio, C., Fanali, S., Bocek, P., *Electrophoresis*, 19, (1998), 701.
- [97] Jonathan, S., Green and James W., Jorgenson, *J. Chromatog.* 63, (1989), 478.
- [98] Gilges, M., Kleemiss, M.H., Schomburg, G., *Anal. Chem.*, 66, (1994), 2038.
- [99] Gratz, S.R., Stalcup, A.M., *Anal. Chem.* 70, (1998), 5166.
- [100] Fanali, S., *J. Chromatogr.*, 545, (1991), 437.
- [101] Persson, G., Palmarsdottir, S., Walhagen, A., Edholm, L. E., presented at the ,
15 th International Symposium on Column Liquid Chromatography. Basle,
June 3-7, (1991).
- [102] Nishi, H., Fukuyama, T., Terabe, S., *J. Chromatogr.*, 553, (1991), 503.

- [103] K. Unger (Ed.), *Packing and stationary phases in chromatographic techniques*, Chromatographic Science Series, Marcel Dekker, 1990.
- [104] Pirkle, W.H., Hyun, M., Tsipouras, A., Hamper, B.C., Banks, B. *J. Pharm. & Biomed. Anal.*, 2, (1984), 173.
- [105] Pirkle, W.H., Pochapsky. *J. Am. Chem. Soc.*, 109, (1987), 5975.
- [106] Lipkowitz, K.B., Demeter, D.A., Zegarra, R., Larter, R., Darden, T. *J. Am. Chem. Soc.*, 110, (1988), 3346.
- [107] Meyer, V.R., Rais, M., Chilality, 1, (1989), 167.