



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

LICENCIATURA EN QUÍMICA

**ESTUDIO DE MEZCLAS, UREA Y CREATININA PARA EL
DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO DE CUANTIFICACIÓN
POR ELECTRONES CAPILAR EN MUESTRAS DE INTERÉS
BIOMÉDICO**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA

PRESENTA:

MÓNICA HERNANDEZ CRUZ

ASESORES:

DR. CARLOS ANDRES GALVAN VIDAL

DRA. MA. DE LOURDES PACHECO HERNÁNDEZ

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO

2005

El presente trabajo se ha realizado gracia al financiamiento de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (Programa Semestral Operativo 99-II-01-I) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT (Proyecto 40638-Y).

Mónica Hernández Cruz, agradece la beca de proyecto de investigación otorgada ID 7045

Los avances del presente trabajo han sido presentados en el XVIII Congreso Nacional de Química Analítica. Pachuca, Hidalgo, México. 28 Junio – 2 Julio 2004.

Cuantificación de urea y creatinina por electroforesis capilar. C. A. Galán Vidal, M. L. Pacheco Hernández y M. Hernández Cruz. Memorias del XVIII Congreso Nacional de Química Analítica. 2004 ISBN 970-31-0302-2.

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios de Electroquímica y Química Analítica del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Dedicatoria

A mis padres, a mi hija, a Carlos y a mis hermanos

Agradecimientos

A Dios por permitir estar aquí y haber concluido este trabajo

A mis padres por el apoyo incondicional tanto moral como económico

A mi hija por haberme cedido su tiempo

A Carlos por estar conmigo en todo momento que lo necesité

A Dr. Carlos Andrés Galán Vidal y la Dra. Ma. de Lourdes Pacheco Hernández por el tiempo dedicado y su esfuerzo para la realización de este trabajo. Gracias por todo.

A Eréndira y Briza por su colaboración en la etapa final de este trabajo

Y a todas las personas que me apoyaron.

Gracias por todo

Glosario, símbolos y abreviaturas

μm	Micrómetros
β -CD	β ciclodextrina
CD	Ciclodextrina
CD's	Ciclodextrinas
CEZ (siglas en ingles)	Electroforesis capilar de zona
cm^3	Centímetros cúbicos
dL	Decilitro
DSR	Desviación estándar relativa
CE (siglas en ingles)	Electroforesis capilar
Ec.	Ecuación
Ecs.	Ecuaciones
EOF(siglas en ingles)	Flujo Electroósmotico
Fig.	Figura
Figs.	Figuras
g	Gramos
hr	Horas
kV	Kilovoltios
M	Molaridad
mg	miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
nL	Nanolitro
nm	nanómetros
P.F	Peso fórmula
pH	Logaritmo del inverso de la concentración de protones
pka	Logaritmo del inverso de la constante de disociación de un ácido
ppm	Partes por millón
r^2	Coefficiente de correlación lineal
SDS	Dodecil sulfato de sodio
UV	Ultravioleta
t_m	Tiempo de migración
MERK (Siglas en ingles)	Cromatografía capilar micelar electrocinética
mg	Miligramos
NMR (siglas en ingles)	Resonancia Magnética Nuclear
M Ω	Mega ohms

Índice

	Página
Glosario, símbolos y abreviaturas	i
Introducción	1
Capítulo 1 Antecedentes y objetivos	
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Propiedades fisicoquímica e importancia biomédica de la Urea, creatinina glucosa	2
1.1.2 Técnicas para la cuantificación de urea	7
1.1.3 Electroforesis capilar	9
1.1.3.1 Introducción	9
1.1.3.2 Principios de electroforesis capilar	9
1.1.3.2.1 Electroforesis	9
1.1.3.2.2 Electroósmosis	11
1.1.3.2.3 Movilidad	13
1.1.3.3 Parámetros analíticos en electroforesis capilar	14
1.1.3.3.1 Tiempo de migración t_m	14
1.1.3.3.2 Factores de dispersión y eficiencia	15
1.1.3.3.3 Calor de Joule	16
1.1.4. Instrumentación en electroforesis capilar	17
1.1.4.1 Contenedores para los electrolitos	17
1.1.4.2 Contenedores para la muestra	18
1.1.4.3 Fuente de poder	18
1.1.4.4 Capilar	19
1.1.4.5 Detector	19
1.1.4.6 Inyección de muestra	20
1.1.5 Modos y principios de separación en electroforesis capilar	20
1.1.5.1 Electroforesis capilar de zona	20
1.1.5.2 Electroforesis capilar micelar electrocinética	21
1.1.5.3 Electroforesis capilar de gel	21
1.1.5.4 Electroforesis capilar de enfoque isoeléctrico	21
1.1.5.5 Isotacoforesis capilar	22
1.1.6 Aplicaciones de la electroforesis capilar	22
1.2 Objetivos	23
Capítulo 2: Metodología experimental	
2.1 Material, equipo y reactivos	25

2.1.1 Material	25
2.1.2 Equipo	25
2.1.3 Reactivos y Soluciones	25
2.2 Activación, reactivación y lavado de capilar	26
2.3 Preparación de la muestra real	27
Capítulo 3: Resultados y discusión	
3.1 Introducción	28
3.2 Selección de la longitud de onda óptima de trabajo	29
3.3 Selección de Buffer de corrida	30
3.3.1 Buffer de Boratos	31
3.3.2 Buffer de Boratos con SDS	33
3.3.3 Buffer de boratos con ciclodextrina	34
3.3.4 Buffer de acetatos	36
3.3.5 Optimización de método	38
3.3.6 Análisis de una muestra de orina	44
Capítulo 4: Conclusiones	46
Referencias	48

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo constituye una contribución al desarrollo de un método analítico para cuantificar urea en diversas muestras de interés biomédico mediante electroforesis capilar. Próximamente se pretende contar con una alternativa para el análisis de urea en muestras de orina, sangre y líquidos hemodializantes que permite confrontar los resultados obtenidos con un biosensor potenciométrico de urea desarrollado en el marco del proyecto “Desarrollo de biosensores miniaturizados de bajo costo en configuración plana (40638-Y)”, financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Considerando que el objetivo principal es aplicar las metodologías analíticas desarrolladas al control del proceso de hemodiálisis, y que los líquidos hemodializantes originalmente están constituidos por sales inorgánicas y glucosa, donde se incorporarán creatinina y urea durante el proceso de hemodiálisis; hemos considerado de interés realizar el estudio electroforético en mezclas de urea, creatinina y glucosa.

El presente estudio está organizado en 4 capítulos. En el primero se presentan los antecedentes relacionados con el trabajo y los objetivos que guiaron la realización del mismo. En el capítulo 2 se presentan los aspectos relacionados con la metodología utilizada y en el capítulo 3 se discuten los principales resultados obtenidos. Finalmente en el capítulo 4 se resumen las principales conclusiones.

CAPÍTULO 1

Antecedentes y objetivos

1.1 Antecedentes

1.1.1 Propiedades fisicoquímicas e importancia biomédica de la urea, creatinina y glucosa.

Urea

La urea $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (P.F. = 60.06 g/mol) es un compuesto nitrogenado de gran importancia biomédica, agropecuaria e industrial (Fig. 1.1). A temperatura ambiente se encuentra en estado sólido en forma de cristales tetragonales con una densidad de 1.32 g/cm^3 (18°C) y un punto de fusión de 132.7°C [1]. Su solubilidad en agua es de 100g/100mL a temperatura ambiente [2]. En soluciones acuosas se hidroliza lentamente para formar carbonato de amonio con la eventual formación de amoníaco y dióxido de carbono. Se usa principalmente como fertilizante, materia prima en la síntesis de resinas, plásticos y ácido barbitúrico; así como en la fabricación de papel. Asimismo es empleada como emoliente, diurético y fuente de nitrógeno en la dieta de rumiantes [1].

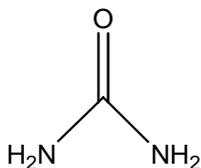


Figura 1.1. Estructura de la urea

La urea es prácticamente una especie neutra a cualquier pH. No obstante existe reportado un $\text{pK}_a = 0.1$ [3].

La importancia biomédica de la urea radica en ser el principal producto

terminal del metabolismo de las proteínas y aminoácidos en el hombre y en los mamíferos. A partir de su generación en el hígado pasa al torrente sanguíneo desde donde se distribuye a todos los líquidos intra y extracelulares; puesto que esta sustancia puede difundir libremente a través de la mayoría de las membranas celulares, pasa por diálisis en los riñones constituyendo un componente importante de la orina, misma que acaba siendo excretada. No obstante, también se excreta en cantidades mínima por medio de la sudoración y es degradada por bacterias intestinales [4-6].

La urea constituye aproximadamente el 50% en peso de los componentes de la orina (exceptuando el agua) y entre el 80 y 90% del nitrógeno urinario. Cabe destacar que las neuronas llegan a concentrar urea con un gradiente hasta 50 veces mayor que en el plasma [4-6].

La concentración sérica de la urea varía significativamente en los individuos normales y está influenciada por factores tan diversos como la ingesta dietética de proteínas y el estado de hidratación. Los valores normales en los adultos son entre 7 y 20 mg por decilitro. En los niños pequeños se aceptan valores de 5 a 18 mg/dL como dentro de la normalidad. Los valores superiores a 100 mg/dL se asocian a un fallo renal importante [6].

Un nivel elevado de urea en sangre (hiperuremia) puede ser debido a diferentes factores como: dieta hiperprotéica, enfermedad renal fallo cardiaco, hemorragia gastrointestinal, hipovolemia (quemaduras, deshidratación) y obstrucción renal (piedras, tumores). La urea en sangre por debajo del nivel normal (hipoureemia) aparece en: dieta pobre en proteínas, fallo hepático, embarazo, exceso de hidratación y desnutrición en general.

El intervalo de concentración de urea en orina en pacientes normales (niños y adultos) se ubica entre 12.8 y 36.4 g/24 hr (0.14-0.40 M); considerando un volumen promedio de 1.5 litros [7].

Creatinina

La creatinina $C_4H_7N_3O$ (P.F. 113.12 g/mol) es el producto final del catabolismo de la creatinina de gran importancia biomédica e industrial (Fig. 1.2). A temperatura ambiente se encuentra en estado sólido en forma de platos monoclinicos, tiene un punto de fusión $255^{\circ}C$. Su solubilidad en agua es de 8g/100mL a temperatura ambiente [2]. Se usa en la preparación comercial de

creatinina mediante el tratamiento con HCl. [1].

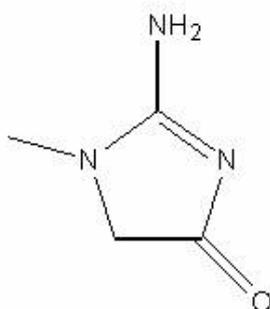


Figura 1.2. Estructura de la creatinina

La creatinina conforme a la bibliografía es una especie zwitterionica a pH 9.0 [8]. Por otra parte se reportan $pK_{a1}= 4.8$ y $pK_{a2}=9.0$ [2,8,9].

La creatinina no se reutiliza en el metabolismo del cuerpo, por tanto funciona únicamente como producto de excreción de la creatina. La concentración de creatinina resulta afectada por la dieta y mínimamente por la hidratación. La formación de creatinina también tiene relación directa con la masa muscular. El ejercicio vigoroso y una dieta rica en proteínas, pueden provocar un incremento significativo de la excreción de creatinina. La constancia en la formación y excreción de creatinina la convierten en un índice útil de la función renal, ya que es completamente excretada por el riñón [4-6].

Con una función renal normal, el nivel de creatinina sérica (en sangre) debe permanecer constante y normal. Dichos niveles son: en hombres adultos entre 0,7 y 1,3 mg por decilitro; en mujeres adultas entre 0.5 y 1.2 mg/dL en niños pequeños se aceptan valores de 0.2 a 1 mg/dL. Valores superiores a 4 mg/dl se pueden asociar a un fallo renal importante.

En un paciente adulto normal, la concentración de creatinina en orina debe ubicarse entre 0.6 y 2.0 g/24 hr ($3.1-10.1 \times 10^{-3}$ M); considerando un volumen promedio de 1.5 litros [7].

Los valores anormales de la creatinina en orina y sangre, así como la capacidad de eliminación de ésta pueden deberse a alguna de las siguientes condiciones: glomerulonefritis, pielonefritis, flujo sanguíneo renal reducido (por ejemplo: shock, insuficiencia cardiaca congestiva, etc.), insuficiencia renal, obstrucción del tracto urinario, distrofia muscular (fase tardía), miastenia grave, dieta hiperprotéica, etc.

Glucosa

La glucosa $C_6H_{12}O_6$ (P.F. 180.16 g/mol) es el monosacárido más abundante en la naturaleza (Fig. 1.3). A temperatura ambiente se encuentra en estado sólido en forma de cristales tetragonales con una densidad 1.5620 g/mL (18°C) y un punto de fusión de 146°C. Su solubilidad en agua es de 91g/100mL de agua a 25°C [2]. Es empleada principalmente como endulzante nutritivo en diversos alimentos [1].

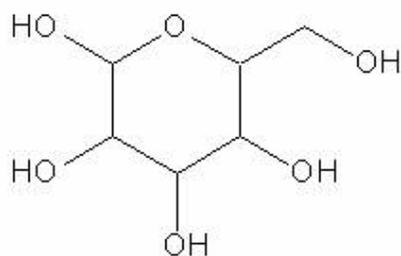


Figura 1.3. Estructura de la glucosa

La glucosa es prácticamente neutra a cualquier pH [9,10]. No obstante se encuentra reportado un $pK_a=12.3$ [10].

La glucosa es una hexosa, siendo el monosacárido más abundante en la naturaleza. Es el principal combustible del cerebro que consume alrededor de 140 gramos de glucosa al día, si este nivel desciende, como ocurre en casos de ayuno prolongado, se utiliza como fuente de energía los cuerpos cetónicos

procedentes de la oxidación de ácidos grasos en el hígado [4-6].

La glucosa es el hidrato de carbono más elemental y esencial para la vida, es el componente inicial o el resultado de las principales rutas del metabolismo de los glúcidos. Es también producto de la fotosíntesis que hacen los vegetales de hoja verde gracias a su clorofila. La glucosa se transforma luego en almidón en los cereales y hortalizas, o en fructosa en las frutas y la miel. Ambos se vuelven a transformar en glucosa en nuestro organismo y así es como se absorbe [4-6].

Cuando la glucosa que llega a las células es degradada, en un proceso denominado glucólisis, con ayuda del oxígeno (combustión). Como producto de este proceso se produce agua (que eliminamos o reutilizamos) y anhídrido carbónico (que exhalamos por medio de la respiración). Este es el modo principal de obtener energía para realizar todas las actividades que la requieran [4-6].

El consumo de todos los alimentos y bebidas que no contengan glucosa o azúcares, da lugar de manera directa o indirecta a una reducción del azúcar en sangre, lo que se denomina hipoglucemia. Esto provoca un estado de alarma en el organismo (sobre todo en el cerebro) ya que por falta de combustible muchas funciones no se podrían llevar a cabo y comenzarían a morir neuronas, de la misma forma como si nos faltara oxígeno. Muchas personas en esta situación sienten mareos e incluso desvanecimientos. [4-6].

En adultos sanos, los valores normales de glucosa en sangre se ubican entre 70 y 105 mg/dL. En los niños pequeños se consideran normales valores de 40 a 100 mg/dl. Valores inferiores de 40-50 mg/dL se consideran bajos (hipoglucemia); niveles superiores a 128 mg/dL se consideran altos (hiperglucemia) [6].

La glucosa debe estar ausente de la orina, en caso contrario, debe atribuirse a un problema renal [7].

Los niveles de glucosa en sangre (glucemia) se ven afectados por diversos factores, además de la diabetes: estrés por enfermedades agudas (infarto cerebral, cardíaco, anestesia general), tratamientos con sueros intravenosos (dextrosa), embarazo, medicamentos (antidepresivos, analgésicos, antihipertensivos, hormonas femeninas), alcohol, etc [4-6].

1.1.2 Técnicas para la cuantificación de urea [11]

La determinación de urea es importante en una gran variedad de campos, aunque es de particular interés en los ámbitos biomédico, ambiental y alimentario [11]. Así, se han desarrollado diversas alternativas analíticas de cuantificación, sin que ninguna de ellas domine debido a la gran diversidad de muestras en que debe ser determinada.

Actualmente, los métodos existentes para determinar urea se agrupan en indirectos y directos; siendo los primeros aquellos que involucran la degradación del analito, previamente a su detección. En contraparte, los métodos directos implican el desarrollo de color a partir de reacciones químicas directas con la urea. [7,11]

Aunque se han desarrollado diversas variantes de los métodos directos, en prácticamente todos los casos se utiliza la selectiva reacción entre la diacetil monoxima (o algún derivado) y la urea, misma que genera un producto estable de color amarillo. Actualmente esta metodología ha sido adaptada en sistemas de análisis en flujo alcanzándose límites de detección de $1 \times 10^{-7} \text{M}$.

En los métodos indirectos, existen tres estrategias para degradar a la urea de manera previa a su detección: descomposición térmica de la materia orgánica para formar N_2 con un óxido metálico en atmósfera de CO_2 , el método Kjeldahl (formación de amoníaco mediante la digestión ácida con ácido sulfúrico catalizada con HgO a 350°C) y la degradación enzimática con ureasa para obtener NH_4^+ y CO_2 . Después de aplicar alguno de los métodos degradativos descritos anteriormente, los productos son determinados por diversas técnicas convencionales de análisis; no obstante, en la actualidad es utilizada preferentemente la degradación enzimática seguida de un protocolo de detección espectrofotométrico o potenciométrico. En el primer caso el amoníaco liberado se hace reaccionar con fenol e hipoclorito para producir un color azul en presencia de nitroprusiato sódico. La detección potenciométrica está basada en el seguimiento de la concentración de amonio mediante un electrodo selectivo de iones.

Cabe destacar que las alternativas espectrofotométrica y potenciométrica de cuantificación indirecta de urea, han sido utilizadas para el desarrollo de sistemas comerciales de análisis portátiles, basados en medidas

de reflectancia o potencial eléctrico.

Con la finalidad de incrementar la selectividad de las técnicas anteriormente presentadas, algunas de ellas han sido integradas en sistemas cromatográficos o electroforéticos.

Por otra parte, también han sido reportados métodos cuantitativos de análisis de urea por ^{14}N NMR, espectroscopía de IR y titulaciones en solventes no acuosos; aunque las tres últimas metodologías son alternativas dignas de consideración, es importante comentar el alto costo de la primera, la necesidad de procesamiento quimiométrico de la segunda y la poca especificidad de la tercera.

Finalmente y como una de las propuestas analíticas más prometedoras para la cuantificación eficiente de urea, se ha reportado el uso de la quimioluminiscencia. En uno de los reportes más interesantes, se propone la degradación tri-enzimática de urea hasta producir peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con el luminol para producir el ion aminoftalato, mismo que emite con máxima intensidad a 425 nm.

La mayoría de las técnicas de cuantificación de urea han sido adaptadas para su operación en sistemas de análisis por inyección en flujo. Algunas de las características de dichos sistemas se resumen en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. Características de algunos sistemas FIA para determinación de urea en diversas muestras [11].

Principio	Detección	Muestra	Límite de detección
Urea + diacetil monoxima	Espectrofotométrica	Suelos	$4 \times 10^{-7} \text{M}$
Urea	Espectrofotométrica	Cosméticos	$1 \times 10^{-4} \text{M}$
Urea + hipobromito	Quimioluminiscencia	Orina	$9 \times 10^{-8} \text{M}$
Urea + ureasa	Potenciométrica	Leche	$6 \times 10^{-5} \text{M}$
Urea + 3 enzimas	Quimioluminiscencia	Suero	$5 \times 10^{-4} \text{M}$

No obstante la importancia de la cuantificación de urea y las ventajas que brinda la electroforesis capilar como técnica analítica, hasta el momento se desconocen reportes enfocados para la determinación de este analito por CE, aunque en algunos trabajos es utilizada en separaciones quirales y como aditivo; o bien, es eliminada como interferencia.

1.1.3 Electroforesis capilar [12]

1.1.3.1 Introducción

La electroforesis, definida como la migración de analitos dentro de una solución de electrolito bajo la influencia de un campo eléctrico, ha sido herramienta fundamental de los métodos bioquímicos de separación desde mediados de los años 30's, cuando fue implementada por el químico sueco Tiselius para separar proteínas en suero; trabajo que le significó ser reconocido con el premio Nobel de química en 1948 por su importante aportación. No obstante su gran utilidad, la electroforesis presenta importantes limitaciones debido a la difusión y el calor generado por el campo eléctrico aplicado, los cuales comprometen la resolución. En este sentido, se han desarrollado diversas estrategias a fin de minimizar el efecto de dichos factores, investigaciones que finalmente llevaron al establecimiento de la electroforesis capilar como una poderosa técnica analítica hacia finales de la década de los 80's [12-15]

La electroforesis capilar (CE) ha demostrado ser una técnica de amplia aplicación para la separación y análisis de fármacos, péptidos, aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, carbohidratos, hormonas, proteínas, ácidos nucleicos, células, etc. Sus principales ventajas son su rapidez, alta eficiencia en la separación y el requerimiento de mínimas cantidades de muestra y reactivos, lo cual implica costos mucho menores que en cromatografía o electroforesis convencional.

1.1.3.2 Principios de electroforesis capilar

1.1.3.2.1 Electroforesis

Electroforesis es un proceso definido por la migración de iones debido a la influencia de un campo eléctrico. La fuerza impartida por el campo eléctrico F_E es proporcional a la carga efectiva q y la magnitud del campo eléctrico E (Ec. 1).

$$F_E = qE \quad (1)$$

El movimiento de traslación del ion debido al campo eléctrico, será

limitado por la fuerza de fricción F_f , la cual es proporcional a la velocidad del ion, V_e y el coeficiente de fricción f (Ec. 2).

$$F_f = fV_e \quad (2)$$

Considerando que el ion casi instantáneamente alcanza una velocidad en que se equilibran F_E y F_f y despejando V_e , podemos definir el término movilidad electroforética del ion μ_i (Ecs. 3 y 4), la cual es una constante de proporcionalidad entre la velocidad del ion y la magnitud del campo eléctrico; siendo directamente proporcional a su carga, e inversamente proporcional al coeficiente de fricción.

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

$$V_e = \frac{q}{f} E = \mu_i E \quad (4)$$

El coeficiente de fricción de un ion en movimiento está relacionado con su radio hidrodinámico r y la viscosidad del medio circundante η (Ec. 5). Así, sustituyendo la ecuación 5 en la 4 y despejando μ_i (Ec. 6), se puede observar que a mayor carga del ion se presentará mayor movilidad, mientras que a mayor tamaño del ion, la movilidad se verá reducida.

$$f = 6\pi\eta r \quad (5)$$

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

La carga y tamaño que puede presentar un analito en particular depende del medio en que se encuentre; por ejemplo, sí el compuesto A puede estar presente en diferentes formas ácido-base (A , HA^+ , H_2A^{2+} , H_3A^{3+} , ...), entonces cada una presentará diferente movilidad iónica. No obstante, desde un punto de vista macroscópico se ha demostrado que el sistema se comportará como si

solamente existiera una especie química con una movilidad efectiva μ_{eff} , que será el resultado de las concentraciones de cada especie química del analito presente en la solución C_i y de su respectiva μ_i (Ec. 7)

$$\mu_{eff} = \left(\frac{1}{C_A} \right) \sum_{i=0}^k C_i \mu_i = \sum_{i=0}^k x_i \mu_i \quad (7)$$

donde C_A es la concentración total del analito, misma que puede expresarse conforme a la ecuación 8.

$$C_A = \sum_{i=0}^k c_i = [A] + [HA^+] + [H_2A^{2+}] + [H_3A^{3+}] + \dots \quad (8)$$

Conforme a las ecuaciones 7 y 8, es claro que un cambio del pH puede afectar la movilidad efectiva de los compuestos y ser una estrategia para llevar a cabo la separación de los analitos. Además del pH, diversas condiciones experimentales pueden cambiar las propiedad de los solutos y consecuentemente su movilidad. La explotación de la influencia de diferentes variables experimentales en la μ_{eff} es la clave del éxito en la electroforesis.

1.1.3.2.2 Electroósmosis

La electroósmosis es el proceso mediante el cual fluye el líquido o solvente dentro del capilar; se presenta como consecuencia de las interacciones entre la carga de la pared del capilar y el líquido cuando se aplica el campo eléctrico.

El interior de la superficie de capilar de sílice fundida contiene grupos silanol (-Si-OH), mismos que se encuentran ionizados en forma SiO^- a $pH > 2$. Así, la carga negativa del interior es balanceada por iones positivos del buffer, creando una doble capa eléctrica, a través de la cual se establece una diferencia de potencial (potencial zeta ζ). Los cationes, son fuertemente atraídos (inmovilizados) sobre la superficie del capilar para posteriormente formarse una atmósfera iónica más difusa. Así, al imponer un potencial a través

del capilar, los cationes contenidos en la zona difusa serán atraídos hacia el cátodo, acarreando consigo sus respectivas moléculas de agua de hidratación, creando entonces un flujo neto de solvente conocido como flujo electroosmótico EOF (Fig. 1.4).

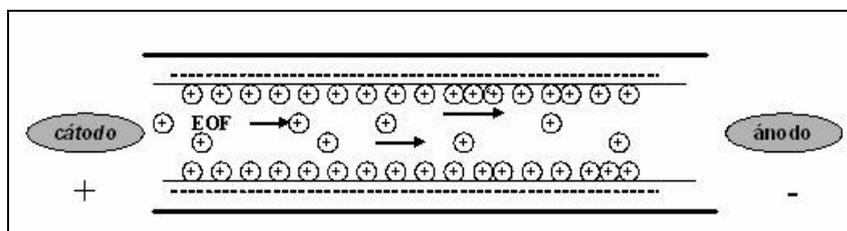


Figura 1.4 Representación del flujo electroosmótico

El flujo electroosmótico es provocado por una fuerza impulsora de carácter eléctrico, la cual se distribuye de manera prácticamente uniforme a través del capilar provocando un frente plano en el flujo y no parabólico como el obtenido en sistemas impulsados por presión (bombas) como en la cromatografía líquida. Esta característica particular de la electroforesis capilar, dota a esta técnica de su extraordinario poder de resolución (Figura 1.5).

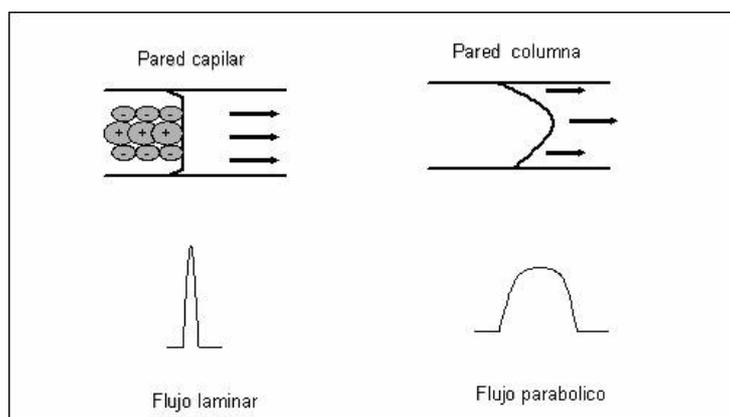


Figura 1.5. Representación del frente plano y parabólico de flujo en electroforesis capilar y cromatografía líquida respectivamente.

La velocidad electroosmótica V_{eof} se define de manera análoga a la velocidad del ion V_e (Ecs. 4 y 9)

$$V_{eof} = \mu_{eof} E \quad (9)$$

donde μ_{eof} es la movilidad electroosmótica; siendo la constante de proporcionalidad entre V_{eof} y la magnitud del campo eléctrico E . Por otra parte, conforme a la ecuación de Helmholtz-Smoluchovski, la velocidad electroosmótica es directamente proporcional a la constante dieléctrica del medio ε y el potencial zeta ζ de la interfase capilar-buffer, e inversamente proporcional la viscosidad η del buffer (Ec. 10).

$$V_{eof} = \varepsilon \zeta E / \eta \quad (10)$$

El potencial zeta es dependiente en gran medida de la carga del capilar y en menor medida de la naturaleza iónica del buffer. Así, en los capilares de sílice fundida, la electroósmosis disminuye al descender el pH, ya que se protonan los lo grupos silanol causando la disminución en el potencial zeta. La electroósmosis también disminuye con el aumento de la fuerza iónica, debido al colapso de la doble capa. Asimismo, el EOF puede reducirse recubriendo el capilar de tal manera que se suprima la ionización de los grupos $-\text{SiO}^-$ con poliacrilimida o metilcelulosa.

1.1.3.2.3 Movilidad

La movilidad aparente de un soluto μ_{app} se define como la suma de la movilidad efectiva del analito y la movilidad electroforética de la solución (Ec.11)

$$\mu_{app} = \mu_{eff} + \mu_{eof} \quad (11)$$

Los solutos neutros migrarán con la misma dirección y velocidad que el flujo electroosmótico y no se separarán. Sin embargo, los diversos cationes y aniones al presentar diferentes μ_{eff} podrán separarse con base en su diferente movilidad aparente. Para los cationes, la movilidad efectiva tendrá la misma dirección que el flujo electroosmótico *por lo cual* $\mu_{app} > \mu_{eff}$. Por otra parte, el

movimiento de los aniones, será en dirección opuesta a la electroósmosis, por lo cual $\mu_{app} < \mu_{eff}$.

A pH's > 6 se presenta un EOF alto por lo que los aniones pueden migrar hacia el cátodo, aunque después de los cationes y especies neutras. Si el pH es menor al señalado, la electroósmosis es débil y los aniones difícilmente alcanzan el detector, a menos que la polaridad sea invertida.

1.1.3.3 Parámetros analíticos en electroforesis capilar

Los principales parámetros analíticos asociados a la técnica de electroforesis capilar, son análogos a los empleados en cromatografía líquida: tiempo de migración, movilidad, factores de dispersión, eficiencia y resolución.

1.1.3.3.1 Tiempo de migración t_m

El tiempo requerido por un compuesto para llegar a la ventana de detección desde el lugar de la inyección, es definido como tiempo de migración t_m . Cuando el compuesto es un marcador de naturaleza neutra bajo las condiciones de trabajo (óxido de mesitilo, acetona, formaldehído, etc.), este parámetro es conocido como tiempo de migración del EOF t_{eof} . Ambos parámetros son necesarios para calcular la movilidad efectiva conforme a la ecuación 12

$$\mu_{eff} = \frac{L_t L_d}{V} * \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{eof}} \right) \quad (12)$$

donde V es voltaje aplicado, L_t y L_d son la longitud total y hasta el detector del capilar respectivamente.

Cabe aclarar que mediante μ_{eff} y la movilidad electroosmótica (Ec. 9), es posible a su vez determinar la velocidad de cada analito cargado para un voltaje aplicado en particular (Ec. 13).

$$v = (\mu_{eof} + \mu_{eff})E \quad (13)$$

1.1.3.3.2 Factores de dispersión y eficiencia

Debido al frente plano en el flujo, en CE la dispersión de los picos está determinada principalmente por la difusión. Considerando que el soluto migrará una distancia x (en ambas direcciones) desde el lugar de la inyección hasta alcanzar el detector, es posible describir el perfil de concentración con una función gaussiana, donde la altura corresponde a la máxima concentración del analito y el ancho del pico está relacionado con la desviación estándar σ , misma que es función de la constante de difusión D y el tiempo t (Ec. 14).

$$\sigma = \sqrt{2Dt} \quad (14)$$

Cabe aclarar que otros factores que contribuyen a la dispersión son los gradientes de temperatura, volumen de inyección, interacción soluto-capilar, etc., mismos que deben controlarse a fin de minimizar la dispersión o incrementar la resolución.

La forma más simple de caracterizar la separación de dos compuestos es mediante el cálculo de la resolución R , la cual es obtenida dividiendo la diferencia de las distancias de migración, entre el promedio de los anchos de pico en la línea base (Ec. 15).

$$R = \frac{2(x_2 - x_1)}{(w_1 + w_2)} \quad (15)$$

donde x_2 y x_1 son las distancias de migración del analito más lento y rápido respectivamente y w las correspondientes anchuras de pico.

Para una descripción cuantitativa de la separación electroforética, la resolución es definida como el cociente de la distancia entre los máximos de pico (Δx) y la anchura media de pico expresada como 4σ (Ec. 16).

$$R = \frac{\Delta x}{4\sigma} \quad (16)$$

El número de platos teóricos, N representa la eficiencia de la separación de la zona electroforética y se determina a partir de la ecuación 17.

$$N = \frac{L_d^2}{\sigma^2} = \frac{\mu_{eff} EL_t}{2DL_d} \quad (17)$$

Así, la relación entre la eficiencia de separación y el voltaje aplicado puede expresarse conforme a la ecuación 18:

$$N = \frac{\mu V}{2D} \quad (18)$$

Finalmente, la relación entre resolución y la eficiencia es (Ec. 19):

$$R = \frac{1}{4} \frac{\Delta\mu}{\bar{\mu}} \sqrt{N} \quad (19)$$

donde $\Delta\mu = \mu_1 - \mu_2$ y $\bar{\mu} = \frac{\mu_2 + \mu_1}{2}$; siendo μ_1 y μ_2 las movilidades de los analitos 1 y 2 respectivamente.

1.1.3.3.3. Calor de Joule

Conforme a la ley de Ohm (Ec. 20) y como consecuencia de la resistencia de la solución al flujo de corriente, en electroforesis capilar se genera calor, el cual se manifiesta como un incremento considerable de la temperatura del capilar.

$$V = IR \quad (20)$$

El calor generado dentro del capilar, se manifiesta como un gradiente de temperatura; siendo mayor la temperatura al centro del capilar y menor en sus paredes. Este hecho implica un incremento en la dispersión del analito y una pérdida de la eficiencia de separación.

Afortunadamente, la pared de los capilares en electroforesis capilar, son

capaces de disipar el calor de manera más eficiente que los geles utilizados en electroforesis convencional. Así, es posible llevar a cabo un eficiente control de la temperatura mediante sistemas de refrigeración en los equipos modernos, lo cual permite aplicar voltajes de hasta 30KV.

1.1.4. Instrumentación en electroforesis capilar.

Los principales componentes de un equipo de electroforesis capilar son (Fig. 4.6):

- Contenedores para los electrolitos
- Contenedores para la muestra
- Fuente de poder
- Capilar
- Sistema de detección

1.1.4.1. Contenedores para los electrolitos.

Son los recipientes donde se coloca la solución amortiguadora o buffer y donde los extremos del capilar se sumergen. En ellos también se introducen los electrodos que transfieren el potencial eléctrico dentro del capilar.

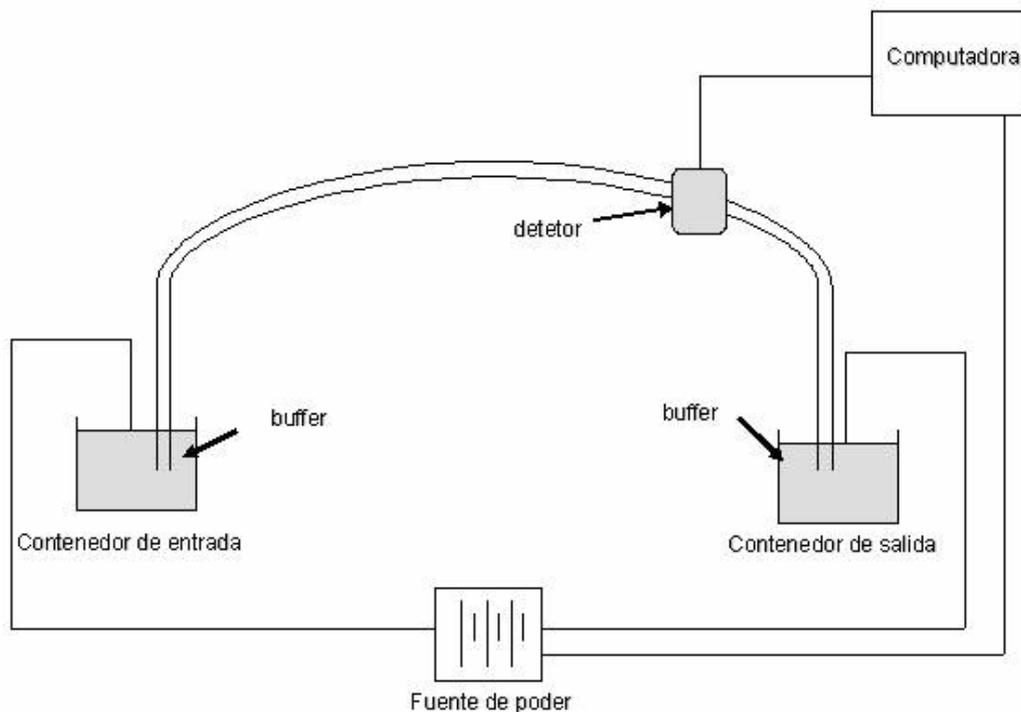


Figura 1.6. Representación de los componentes básicos de un equipo de electroforesis capilar.

1.1.4.2. Contenedores para la muestras

Son los viales donde se contienen las muestras que serán inyectadas. Comúnmente se encuentran dispuestos en portamuestras o carruseles automáticos para minimizar el tiempo de análisis de rutina.

1.1.4.3. Fuente de Poder

Es la fuente de energía eléctrica requerida en el sistema de separación; el voltaje debe ser regulado y es posible invertirlo para cambiar la polaridad de las terminales de acuerdo a las necesidades de análisis. Es necesario que el potencial impuesto sea estable para mantener una buena reproducibilidad en los tiempos de migración de las especies.

1.1.4.4. Capilar

El capilar es la estructura en la cual se lleva a cabo el proceso de separación electroforética. Los más usuales están hechos de sílice fundida con diámetros internos que varían entre 25 y 75 μm , y longitudes entre 30 y 74 cm. Existen capilares adaptados a necesidades específicas de análisis; como por ejemplo, capilares recubiertos para evitar la adsorción de ciertos compuestos sobre su pared. Algunos capilares integran un sistema especial para controlar la temperatura y evitar un aumento en la misma que pueda afectar la separación.

1.1.4.5. Detector

En electroforesis capilar, los detectores son similares en diseño y función a los empleados en cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Debido a lo delgado del capilar y pequeños volúmenes utilizados en esta técnica, el detector elegido debe presentar una alta sensibilidad. En la tabla 1.2, se presentan los detectores más comunes y sus respectivos límites de detección (LOD).

Tabla 1.2. Límites de detección de los detectores más comúnmente utilizados en electroforesis capilar [16].

Principio de detección	Límite de detección (moles)
<u>Espectrofotometría</u>	
Absorción	10^{-13} - 10^{-15}
Fluorescencia	10^{-17} - 10^{-20}
Lente térmico	4×10^{-17}
Raman	2×10^{-15}
Espectrometría de Masas	10^{-18} - 10^{-21}
<u>Electroquímica</u>	
Conductividad	10^{-16}
Amperometría	7×10^{-19}

1.1.4.6 Inyección de la muestra

Entre las ventajas de la CE destaca la posibilidad de inyectar volúmenes pequeños de muestra. El intervalo típico de volumen se ubica entre los picolitros y nanolitros. Los modos más comunes de inyección son: hidrodinámico y electrocinético.

La inyección hidrodinámica consiste en la aplicación de diferente presión entre los dos extremos del capilar por un tiempo determinado; dicha diferencia de presión provoca que un pequeño volumen de la muestra ingrese dentro del capilar. Esta es la manera más común de inyectar la muestra en CE.

La inyección electrocinética se lleva a cabo mediante la aplicación de un voltaje por un cierto periodo de tiempo (usualmente 1-5 seg.); así, los iones ingresan al capilar debido a la movilidad electroforética. La inyección electrocinética es útil para electroforesis capilar de geles en el cual el polímero dentro del capilar es demasiado viscoso para inyección hidrodinámica.

1.1.5. Modos y principios de separación en electroforesis capilar.

La electroforesis capilar comprende una familia de técnicas con diferente operación y características de separación. Estas son:

- Electroforesis capilar de zona (CZE)
- Isotacoforesis capilar (CITP)
- Electroforesis capilar en gel (CGE)
- Cromatografía capilar micelar electrocinética (MEKC)
- Enfoque isoeléctrico (IEF)

1.1.5.1. Electroforesis capilar de zona.

Es la modalidad más simple ya que el mecanismo de separación está basado en las diferencias de la relación masa carga de los analitos. En este esquema la solución buffer debe ser homogénea en todo el capilar; así como la fuerza

del campo eléctrico.

1.1.5.2. Electroforesis micelar electrocinética.

Esta técnica es un híbrido entre las técnicas de electroforesis y cromatografía; es uno de los modos más ampliamente utilizados siendo su característica principal la posibilidad de separar solutos neutros y/o cargados. El fundamento de su operación consiste básicamente en adicionar un tensoactivo por encima de su concentración micelar crítica; así la formación de micelas dentro del capilar y las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas de éstas con el capilar y los analitos, contribuyen en la separación de especies neutras.

1.1.5.3. Electroforesis capilar en gel

Esta modalidad está basada en la electroforesis en gel convencional puesto que sus mecanismos de separación son idénticos. Se emplea principalmente para las separaciones basadas en los diferentes tamaños de las moléculas. En esta técnica, el capilar está relleno de un polímero que actúa como un tamiz molecular en el cual las moléculas pequeñas pasan más fácilmente que las de mayor tamaño, separándose de esta forma conforme a sus dimensiones. Algunas macromoléculas como ADN y proteínas saturadas con SDS no se pueden separar sin utilizar un gel, ya que su razón masa/carga no varía con el tamaño por lo que esta técnica es la alternativa más empleada para poder llevar a cabo el análisis de estas macromoléculas.

1.1.5.4. Electroforesis de enfoque isoelectrico

Esta alternativa se emplea para la separación de péptidos y proteínas basándose en su punto isoelectrico PI. El origen de esta modalidad se encuentra en la electroforesis en gel convencional, pero recientemente adaptada para llevarse a cabo en capilares. Mediante la adición de una mezcla de anfólitos a la solución amortiguadora, se genera un gradiente de pH dentro del capilar lo que provoca que los analitos se sitúen en la zona donde no están cargados; es decir en su PI formándose bandas estrechas de acuerdo a las

moléculas presentes. Este proceso se conoce como enfoque y una vez alcanzado se elimina la corriente y se eluyen las muestras mediante presión o adición de sales a los reservorios.

1.1.5.5. Isotacoforesis capilar

En este modo de electroforesis capilar la muestra es inyectada entre dos soluciones buffer; así un buffer llena el capilar de manera previa a la inyección (electrolito frente) y posteriormente a ésta se emplea otro buffer para correr el experimento (electrolito terminal). Debido a que el primer buffer se elige de tal manera que presente mayor movilidad iónica que los componentes de la muestra y por otra parte que el buffer terminal debe poseer menor movilidad iónica que los componentes de la muestra, en la interfase los componentes de la muestra se separarán de acuerdo a sus propias movilidades electroforéticas.

1.1.6 Aplicaciones de la electroforesis capilar.

A pesar de que la electroforesis capilar es una técnica de desarrollo relativamente reciente, se ha establecido como un método de análisis en diversas áreas de estudio que ha permitido cuantificar una gran variedad de compuestos, permitiendo en algunos casos el análisis rutinario. Algunas de los usos más relevantes de la electroforesis capilar en la actualidad se listan a continuación:

- Selector quiral. Los análisis quirales son especialmente complicados y de una gran importancia en la industria farmacéutica y alimenticia actual.
- Biociencia. Muchas de las aplicaciones de la EC pueden clasificarse en esta área, específicamente para péptidos y proteínas; como ejemplo tenemos las glicoproteínas, las cuales son difíciles de analizar mediante otras técnicas. La determinación de ácidos nucleicos, pruebas de pureza y análisis de fragmentos de péptidos, drogas, fármacos y metabolitos, también ha encontrado en la EC una herramienta poderosa.

- Análisis medioambiental. En la separación y análisis de diversas sustancias como ácidos aromáticos sulfonados, iones inorgánicos, ácidos orgánicos, tensoactivos, colorantes, aminas alifáticas o aromáticas, ácidos aromáticos, fenoles, sustancia húmicas, pesticidas, etc.
- Industriales. Análisis de constituyentes de explosivos, caracterización de polímeros y compuestos sintéticos, análisis de residuos, etc.
- Alimenticia. En análisis de sustancias inorgánicas (sodio, potasio, calcio, fosfatos etc.) en diversas bebidas y jugos, frutas, vegetales, suero, etc. Además de otros compuestos orgánicos (cafeína, histamina, azúcares, etc.), edulcorantes artificiales, pescados y mariscos, hortalizas, carnes y proteínas en suero de leche y queso, etc.

1.2 Objetivos

Considerando la relevancia de la electroforesis capilar en la separación y análisis eficiente de diversas sustancias y la importancia biomédica de contar con alternativas analíticas para la cuantificación de mezclas de urea, creatinina y glucosa, especialmente en muestras de sangre, orina y líquidos hemodializantes, los objetivos del presente trabajo son:

Objetivo general:

- Realizar el estudio electroforético de mezclas de urea, creatinina y glucosa para la eventual implementación de una técnica de análisis de dichos analitos en muestras de sangre, orina y líquidos hemodializantes.

Objetivos particulares:

- Estudiar el efecto de diferentes buffers y pH's en la separación de

los analitos de interés.

- Evaluar el efecto de modificadores como ciclodextrinas y tensoactivos
- Evaluar la aplicación del método desarrollado en muestras reales

CAPÍTULO 2

Metodología experimental

En el presente capítulo se describe de manera general la metodología que se llevó a cabo en el estudio electroforético de urea, glucosa y creatinina.

2.1 Material, equipo y reactivos

2.1.1 Material

- Capilar de sílice fundida $L_t= 50.2$ cm, $L_d=40$, $i_d=75$ μm .
- Jeringa para el filtrado de soluciones
- Viales de 2 mL
- Filtros Millipore de $0.45\mu\text{m}$ y $0.22\mu\text{m}$

2.1.2 Equipo

- Electroforesis capilar Beckman Coulter P/ACE MDQ equipado con un detector UV
- Balanza analítica BP 2215 (Sartorius)
- Baño de Ultrasónico (Cole-Parmer 8890)
- Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 40
- Potenciómetro Corning-meter modelo 450 con electrodo combinado de vidrio.

2.1.3 Reactivos y soluciones

- Creatinina (Aldrich)
- Borato de sodio (Fluka)
- α -D-Glucosa (Aldrich)
- Fosfato monobásico anhídrido (Aldrich)
- Fosfato dibásico trihidratado (Aldrich)

- Hidróxido de sodio (Aldrich)
- SDS (dodecil sulfato de sodio) (Aldrich)
- Urea (Aldrich)
- Ácido acético glacial (J. T. Baker)
- Acetato de sodio (Aldrich)
- Ácido oxálico (J.T. Baker)
- Ácido cítrico (J.T. Baker)
- CTAB (bromuro de cetil-trimetil amonio) (Aldrich)
- Tween 20 (Aldrich)
- Tween 80 (Aldrich)
- β -Ciclodextrina (Aldrich)

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico; las soluciones fueron preparadas con agua desionizada (18 M Ω) y cuando fueron empleadas como electrolito soporte o muestra en electroforesis capilar, fueron filtradas para evitar obturar el delgado capilar.

2.2. Acondicionamiento y lavado del capilar.

El capilar fue acondicionado mediante el lavado con NaOH 1M por 15 minutos a 40⁰C, posteriormente se lavó con NaOH 0.1M a 30⁰C por 10 minutos y agua desionizada a 25⁰C por 10 minutos. Finalmente se lavó con el buffer de corrida por 10 minutos a 25⁰C. Una vez realizado este procedimiento, se inyecta buffer y se corre por 20 minutos (20KV), volviendo a acondicionar e inyectar y correr una vez más.

El lavado del capilar entre corridas y al final e inicio de una sesión de trabajo consistió en una lavado con NaOH 0.1M a 25⁰C por 10 minutos, seguido de agua desionizada por 5 minutos y el buffer de corrida por 10 minutos más. En todos los casos se aplicó una presión de 20 psi.

2.3 Preparación de la muestra real.

Como muestra real se utilizó orina proveniente de un individuo sano. Dicha muestra se diluyó con agua desionizada 1:5 y se filtró previamente a su análisis por EC.

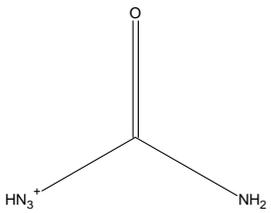
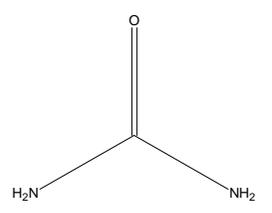
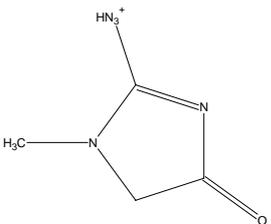
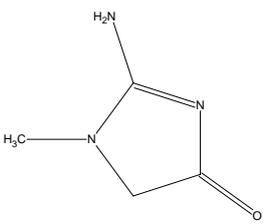
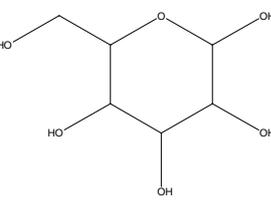
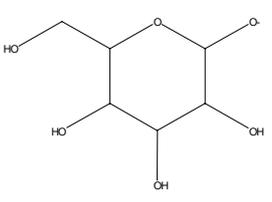
CAPÍTULO 3

Resultados y discusión

3.1 Introducción

Debido a su principio de operación, en electroforesis capilar las especies se separan fundamentalmente debido a su densidad de carga. En este sentido, es necesario tener una idea clara de las cargas que pueden presentar las especies que se pretenden separar en función del pH.

Tabla 3.1. Estructuras de las especies ácido-base de urea, creatinina y glucosa.

Espece	Forma ácida	Forma básica	pKa
Urea			0.1
Creatinina*			4.4
Glucosa			12.3

* Debido a que el segundo pKa sólo ha sido reportado en un trabajo, no se consideró confiable.

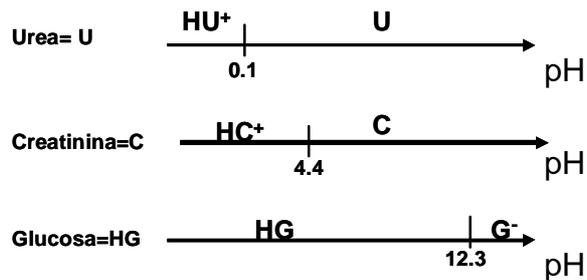


Figura 3.1. Diagramas lineales de zonas de predominio DZP en función del pH para urea, creatinina y glucosa.

Considerando lo anteriormente expuesto y conforme a la información presentada en la tabla 3.1, en un amplio intervalo de pH (4.4 – 12.3), la urea, creatinina y glucosa se encontrarán en forma neutra, por lo que se prevé que la separación no será una tarea sencilla (Figura 3.1).

3.2 Selección de la longitud de onda óptima de trabajo

Con el fin de determinar la longitud de onda óptima se obtuvieron los espectros de absorción UV-Vis, sabiendo que en solución acuosa sin ningún ajuste de pH, los tres analitos son neutros.

En los espectros de absorción mostrados en la figura 4.2, se observa que las tres especies absorben solamente en la región UV, presentando la creatinina el mayor coeficiente de absorción molar, siguiendo la urea y siendo la glucosa la especie que menos absorbe. La creatinina presenta un máximo de absorción en 233.4 nm y un mínimo en 216.5 nm. Considerando que las concentraciones promedio esperadas en muestras de orina y/o líquidos hemodializantes tienen un orden inverso a los coeficientes de absorción molar, a fin de obtener respuestas espectrofotométricas del mismo orden, se eligió como longitud de onda óptima de trabajo 214 nm, misma que fue fijada mediante un filtro en el detector UV del equipo de electroforesis capilar (Tabla 3.2).

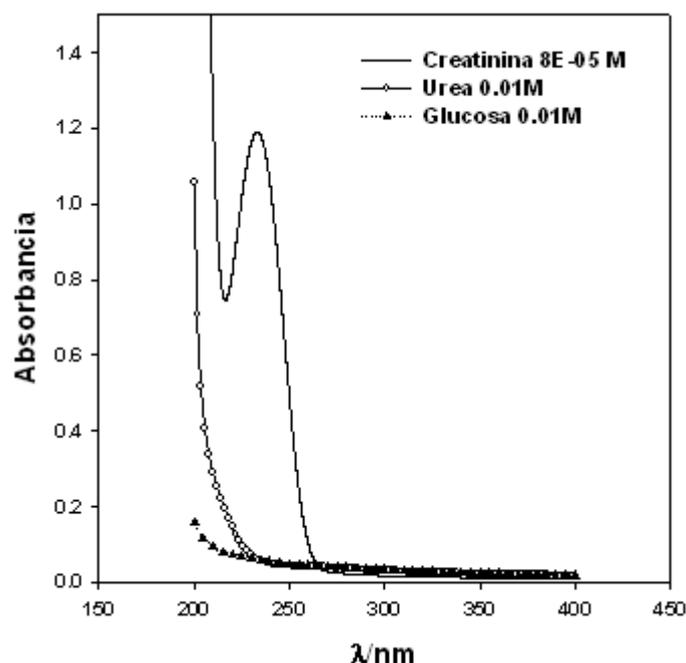


Figura 3.2. Espectros de absorción de creatinina, urea y glucosa en solución acuosa.

Tabla 3.2. Factores de respuesta esperados para urea, creatinina y glucosa en muestras de orina y líquido hemodializante.

Muestra	Analito	C/M ⁽¹⁾	$\epsilon^{214}/\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1(2)}$	F.R. ⁽³⁾
Orina	Urea	0.2700 (0.54)	22,4 (2.7)	1.5
Orina	Creatinina	0.0066 (0.0132)	10,058.8 (1,225.2)	16.2
Orina	Glucosa	Ausente	-	-
Líquido hemodializante	Glucosa	0.5000 (1)	8.2 (1)	1.0

⁽¹⁾ Concentración molar media de pacientes normales (entre paréntesis se presenta el factor de normalización respecto a glucosa). ⁽²⁾ Coeficiente de absortividad molar a 214 nm (entre paréntesis se presenta el factor de normalización respecto a glucosa). Factor de respuesta (F.R.=producto de los factores de normalización).

Trabajando a 214 nm y conforme a los resultados presentados en la tabla 3.2 el factor de respuesta esperado en las muestras es prácticamente del mismo orden de magnitud.

3.3 Selección del buffer de corrida

La idea principal de este trabajo es desarrollar un método simple de análisis que implique el uso de las condiciones más comúnmente usadas en electroforesis capilar; es decir, capilar de sílice fundida y un buffer convencional

(Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Soluciones buffer empleadas convencionalmente en electroforesis capilar.

Buffer	Intervalo de pH
Fosfatos	1.14-3.14
Fosfatos	6.20–8.20
Boratos	8.14–10.14
Acetatos	3.76–5.76
TRIS tris(hidroximetil)aminometano	7.30 – 9.30

No obstante, considerando dichas soluciones amortiguadoras, en la mayoría de los casos las tres especies no presentarían carga (Fig. 3.1), dificultando su separación. Aunque el buffer ácido de fosfatos y el de acetatos implicarían tener la creatinina en forma de monocatión (Fig. 3.1), es necesario considerar que bajo condiciones ácidas, los grupos silanol del capilar se encontrarían protonados (total o parcialmente), disminuyendo considerablemente el flujo electroosmótico y en consecuencia incrementando considerablemente los tiempos de electromigración de las especies.

3.3.1 Buffer de boratos.

Debido a la fuerte interacción entre el tetrahidroxiborato con los grupos hidroxilo de los polioles, se han reportado complejos de diversos carbohidratos [10]. Dichas especies exhiben carga negativa por lo que emplear un buffer de boratos podría ayudar a separar la glucosa de la urea y creatinina. Así, como primera alternativa se estudió el comportamiento electroforético de los analitos considerados en buffer de boratos (Fig. 3.3).

Los resultados obtenidos, muestran que bajo las condiciones de trabajo, los tres analitos conservan su carácter neutro (mismo tiempo de electromigración que MSO) y en consecuencia no se separan; este hecho

demuestra además que el complejo tetrahidroxiborato-glucosa no se forma bajo las condiciones reportadas en la literatura (pH 8-10); incluso elevando el pH hasta valores de 13, fue imposible modificar el tiempo de electromigración de la glucosa.

Por otra parte es importante mencionar que conforme al trabajo de Thanh y colaboradores [8], la creatinina tiene un pKa en 9.2, lo cual implicaría el predominio de una especie aniónica a pH mayor a 9.2; sin embargo, nuestros resultados no apoyan dicha aseveración, ya que no se obtuvo el desplazamiento esperado en la señal de la creatinina neutra a elevados valores de pH.

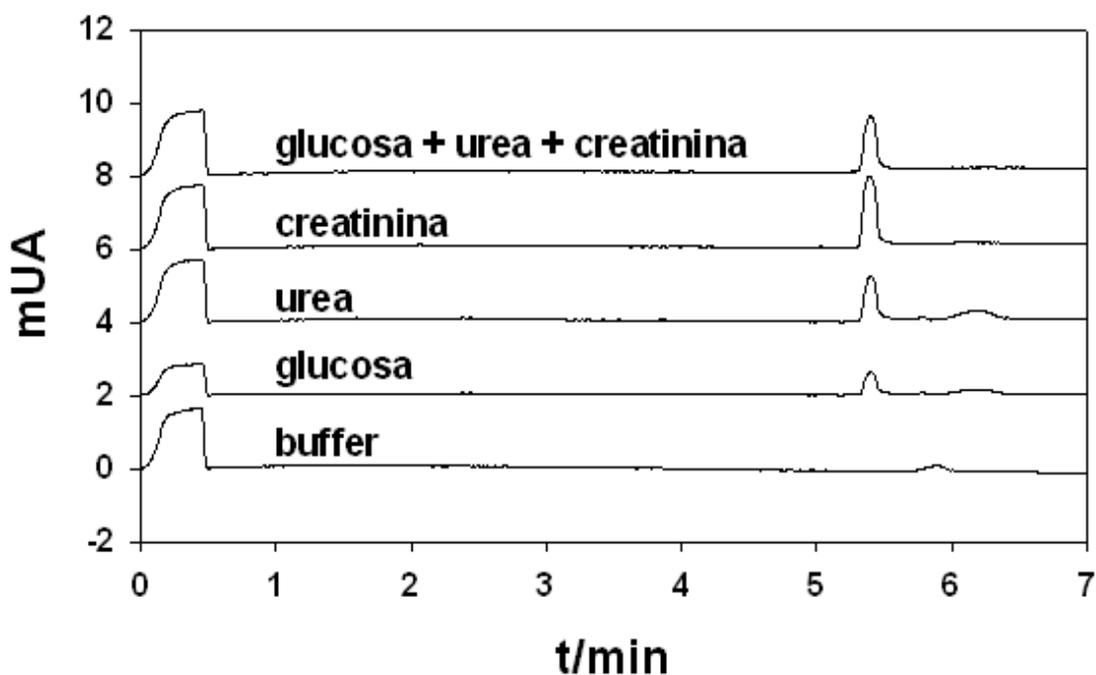


Figura 3.3. Electroferogramas de urea 0.1M, glucosa 0.1M y creatinina 1E-04M, con respecto a la mezcla de los analitos (0.033, 0.033 y 3.3E-05 M respectivamente). Buffer de boratos 0.1 M pH=8.5, 20 KV, 214 nm, 25° C, polaridad normal.

El tiempo de electromigración encontrado para los tres analitos y la mezcla de ellos es de 5.40 (0.11% DSR). Considerando el carácter neutro de las especies estudiadas bajo las condiciones de trabajo, se calculó la velocidad del flujo electroosmótico, encontrándose que es de 7.4 cm/min para un capilar

de 75 μ m de diámetro interno lo cual implica un flujo de 0.0327 nL/min.

Debido a que el buffer de boratos no fue efectivo para separar los analitos de interés, se evaluaron otros buffers (fosfatos 0.1M pH= 6.82 y TRIS 0.1M pH=10.25). No obstante, dichos medios tampoco lograron separar los compuestos, encontrándose además mayor ruido en los electroferogramas y menor reproducibilidad; requiriéndose mayores tiempos de reactivación del capilar.

Conforme a los resultados obtenidos con los diferentes buffers evaluados, se consideró trabajar exclusivamente con el buffer de boratos, ya que mostró mayor reproducibilidad de los electroferogramas y de la línea base, lo cual indica que resultó ser el mejor para reactivar el capilar.

Debido al carácter neutro mostrado por la urea, creatinina y glucosa, se recurrió a la electroforesis micelar electrocinética.

3.3.2 Buffer de boratos con SDS

Como estrategia para obtener una separación eficiente de los analitos, en esta etapa se adicionaron surfactantes aniónicos (SDS), catiónicos (CTAB) y neutros (Tween 20 y Tween 80) al buffer de boratos con la finalidad de separar las especies químicas.

Los resultados obtenidos con los tensoactivos catiónicos y neutros no fueron satisfactorios ya que se encontró escasa reproducibilidad y no se logró la separación. Aunque al emplear el SDS tampoco se consiguió una separación de los compuestos, al menos se obtuvo reproducibilidad en los electroferogramas obtenidos (Fig. 3.4).

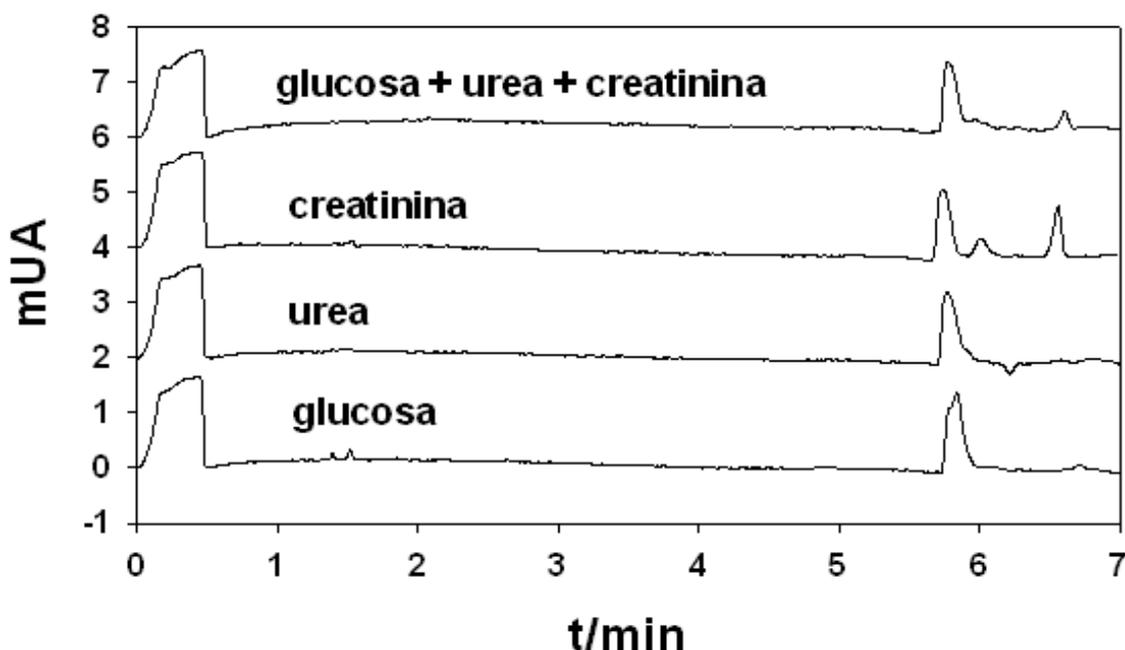


Figura 3.4. Electroferogramas de urea 0.1M, glucosa 0.1M y creatinina 1E-04M, con respecto a la mezcla de los analitos (0.033, 0.033 y 3.3E-05 M respectivamente). Buffer de boratos con SDS 0.1 M, 0.1 M respectivamente pH=8.5. 20 KV, 214 nm, 25° C, polaridad normal.

Los resultados presentados en la figura 3.4 muestran claramente que el tiempo de electromigración se incrementa ligeramente con respecto al buffer de boratos sin SDS (5.75 min), observándose además un poco de ruido por lo que se puede decir que la reproducibilidad disminuye con respecto al buffer de boratos sólo. Aunque las micelas presentan una carga externa aniónica, lo cual contrarresta el flujo electroosmótico, el decremento de éste fue mínimo, lo cual indica una baja interacción de los analitos con las micelas y que dicha interacción es de la misma magnitud para todos los analitos.

En virtud de no haber obtenido resultados satisfactorios con la estrategia de incorporar tensoactivos al buffer, se optó por evaluar el uso de ciclodextrinas.

3.3.3 Buffer de boratos con ciclodextrinas

Las ciclodextrinas CD's son oligosacáridos macrocíclicos, neutros y naturales que contienen varias unidades de (+)-glucopiranososa. Su forma es similar a un cono truncado con una cavidad de dimensiones variables

(profundidad y ancho) dependiendo del número de unidades de glucopiranosas. Las CD's pueden formar complejos por inclusión o huésped-anfitrión y son utilizadas como selectores quirales para separar isómeros ópticos, de posición y de estructura [10].

En las ciclodextrinas, la formación de complejos por inclusión de los analitos está basado en un equilibrio dinámico, en el cual el agua u otro compuesto dentro de la cavidad es reemplazado por uno distinto, denominado huésped [10]. La estabilidad de los complejos por inclusión depende de varios factores como: la estructura química e hidrofobicidad de la cavidad y huésped, ambiente iónico, pH, temperatura, etc.

Los resultados obtenidos con las ciclodextrinas no fueron satisfactorios ya que se presentó demasiado ruido y problemas de reproducibilidad, además de no lograr la separación (Fig. 3.5). El ruido puede atribuirse a un filtrado insuficiente, ya que se emplearon filtros de 0.45 μm .

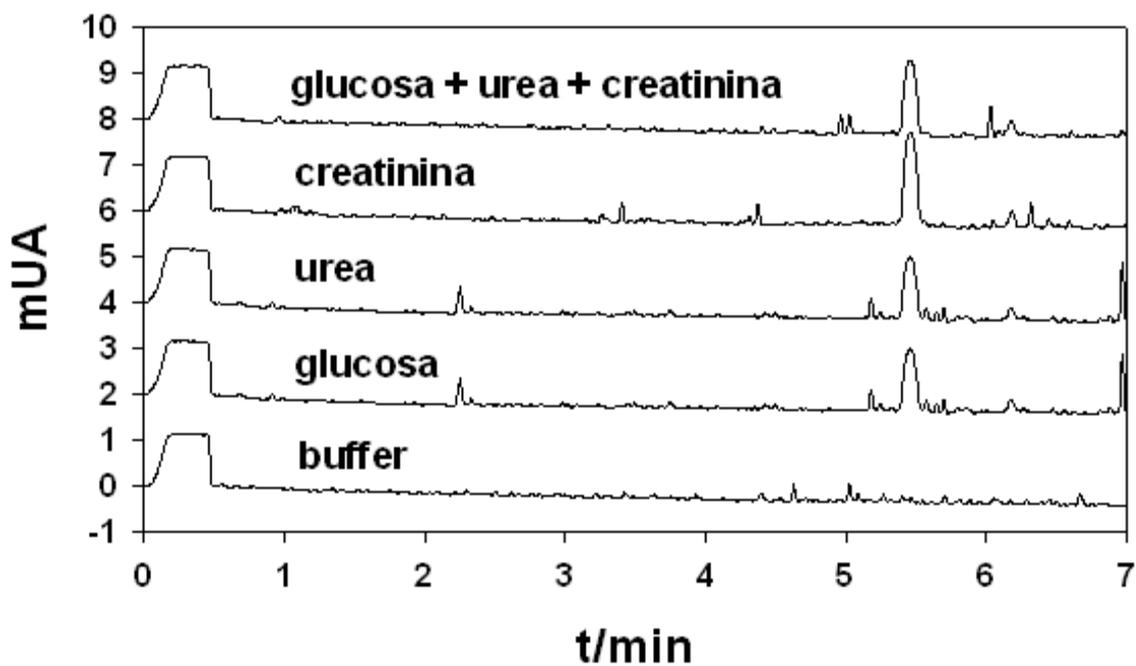


Figura 3.5. Electroferogramas de urea 0.1M, glucosa 0.1M y creatinina 1E-04M, con respecto a la mezcla de los analitos (0.033, 0.033 y 3.3E-05 M respectivamente). Buffer de boratos con β -ciclodextrina 0.1 M, 0.1 M respectivamente pH=8.5. 20 KV, 214 nm, 25° C, polaridad normal.

Los resultados (Fig. 3.5) muestran claramente que el tiempo de electromigración de los tres analitos fue de 5.45 min, siendo prácticamente

igual al reportado anteriormente en una solución buffer de boratos, por lo cual se puede concluir que prácticamente no existe interacción entre la urea, creatinina o glucosa con la β -ciclodextrina.

Debido a la falta de éxito en la separación de los tres analitos estudiados empleando el buffer de boratos sólo y con modificadores (SDS y CD's), se procedió a implementar una nueva estrategia; en este caso el empleo de un buffer más ácido.

3.3.4. Buffer de acetatos

Implementar el uso de un buffer ácido implica el inconveniente de la desactivación parcial del capilar y una disminución del flujo electroosmótico; sin embargo, considerando que la creatinina es una especie que puede formar un monocatión bajo estas condiciones, resulta una alternativa que debe explorarse.

Con base en lo anteriormente expuesto, se estudiaron como buffers ácidos: acetatos, citratos y oxalatos, siendo el primero el más propicio para la separación ya que se consiguió una línea base más estable y la separación de la creatinina en la mezcla de los analitos (Fig. 3.6).

En la figura 3.6 se presenta la comparación de los electroferogramas de urea y creatinina con respecto a la mezcla de ambas especies y el buffer de trabajo. En éste se puede apreciar que la línea base es constante y estable. En la mezcla de los analitos se observan las dos señales correspondientes al catión de la creatinina 3.8 min. y la urea neutra en 7.5 minutos. Cabe aclarar que la glucosa, aunque fue incorporada en este estudio, no presentó ninguna señal; probablemente cubierta por el mismo buffer.

Al estudiar el comportamiento de los electroferogramas cuando se incrementa la concentración de creatinina en el intervalo de 5×10^{-4} a 1×10^{-2} M (Fig. 3.7), se encontró un comportamiento lineal (respecto al área) con un coeficiente de correlación $r^2=0.9996$. El tiempo de migración de la creatinina bajo las condiciones de trabajo fue 3.55 minutos con una desviación estándar relativa de 3.8%.

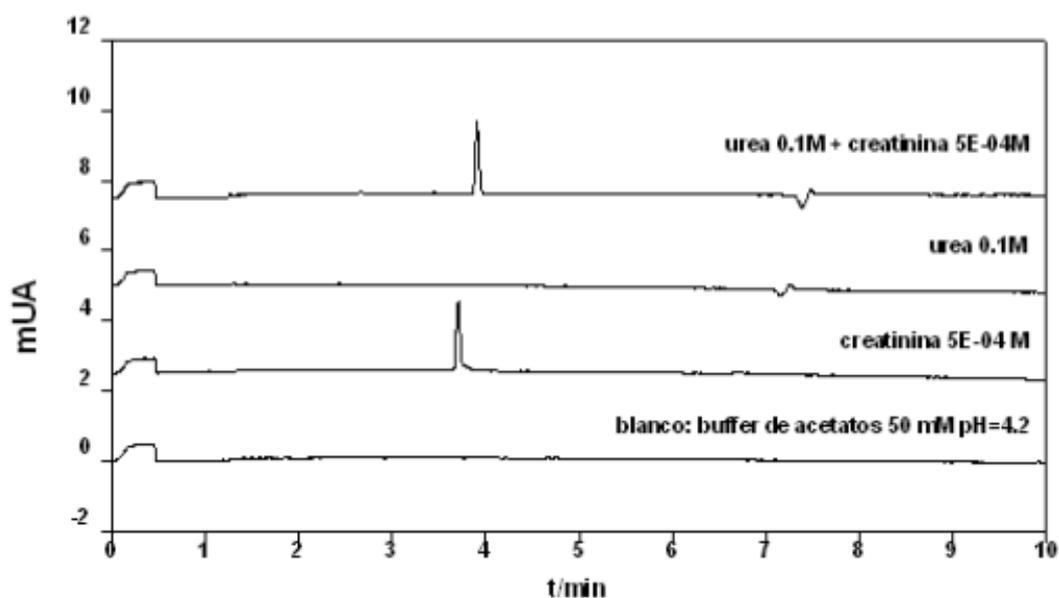


Figura 3.6. Electroferogramas de urea 0.1M, y creatinina 5E-04M, con respecto a la mezcla de los analitos. Buffer de acetatos 0.05M (pH 4.2), 13KV, 214 nm, 25° C, polaridad normal.

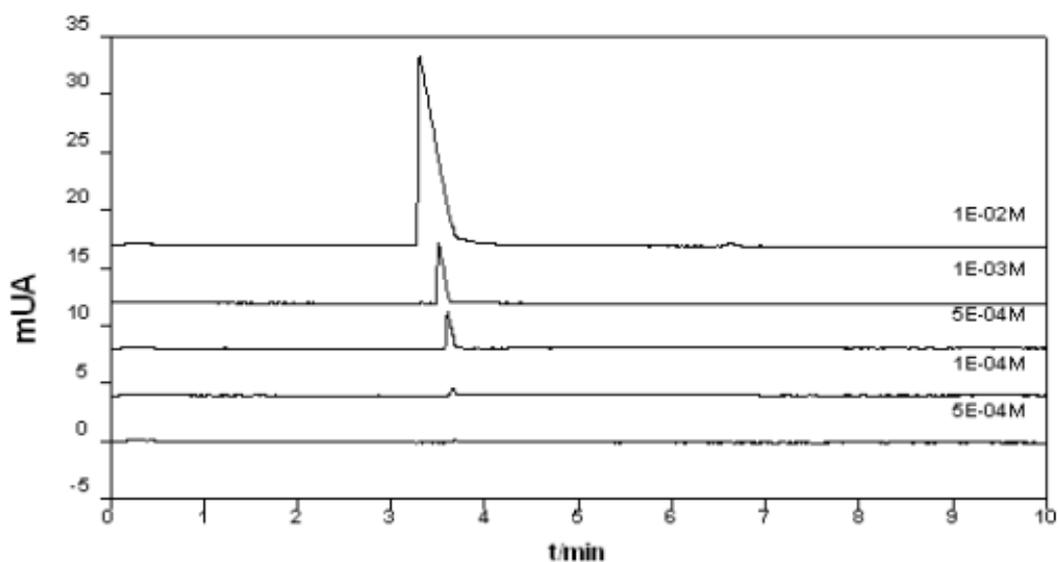


Figura 3.7. Electroferogramas de creatinina a diferentes concentraciones. Buffer de acetatos 0.05M (pH 4.2), 13KV, 214 nm, 25° C, polaridad normal.

En lo referente a la urea, el comportamiento de los electroferogramas, cuando se incrementa la concentración de 0.02 a 1.0M (Fig. 3.8), exhibió un comportamiento lineal (respecto al área) a partir de 0.05M con un coeficiente de correlación $r^2=0.9970$. El tiempo de electromigración de la urea bajo las condiciones de trabajo fue de 6.39 minutos con un porcentaje de desviación estándar relativa 3.7 %.

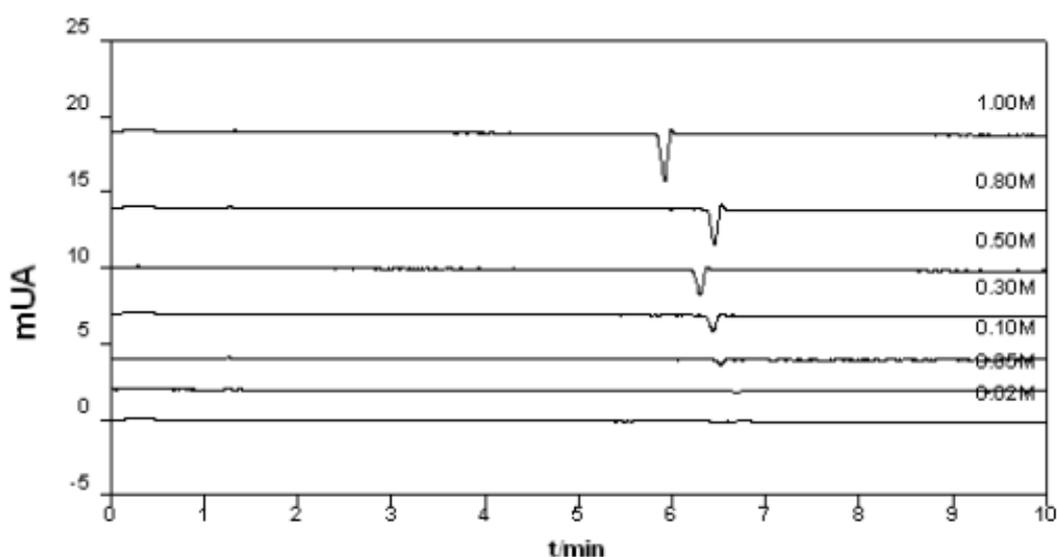


Figura 3.8 Electroferogramas de urea a diferentes concentraciones Buffer de acetatos 50mM (pH 4.2), 13KV, 214 nm, 25° C, polaridad normal.

Es importante señalar que con la urea se presentó una señal negativa, debido a que el buffer absorbe más radiación electromagnética que la propia urea a la longitud de onda de trabajo. En este sentido, la glucosa presenta un comportamiento análogo, aunque su diferencia en absorptividad respecto al buffer es despreciable y en consecuencia no se detecta.

3.3.5 Optimización del método

Con la finalidad de mejorar el método analítico de cuantificación desarrollado, se evaluaron modificaciones al mismo como: cambio de voltaje y adición de modificadores.

En primer lugar se optó por incorporar SDS, pero no se obtuvieron cambios significativos, lo cual si se logró al adicionar β -ciclodextrina e incrementar el voltaje aplicado. Con las modificaciones realizadas se logró incrementar la sensibilidad hacia la urea y disminuir el tiempo de análisis (Fig. 4.9). Así las señales de creatinina y urea aparecen a los 2-3 min. y 4.0 min respectivamente.

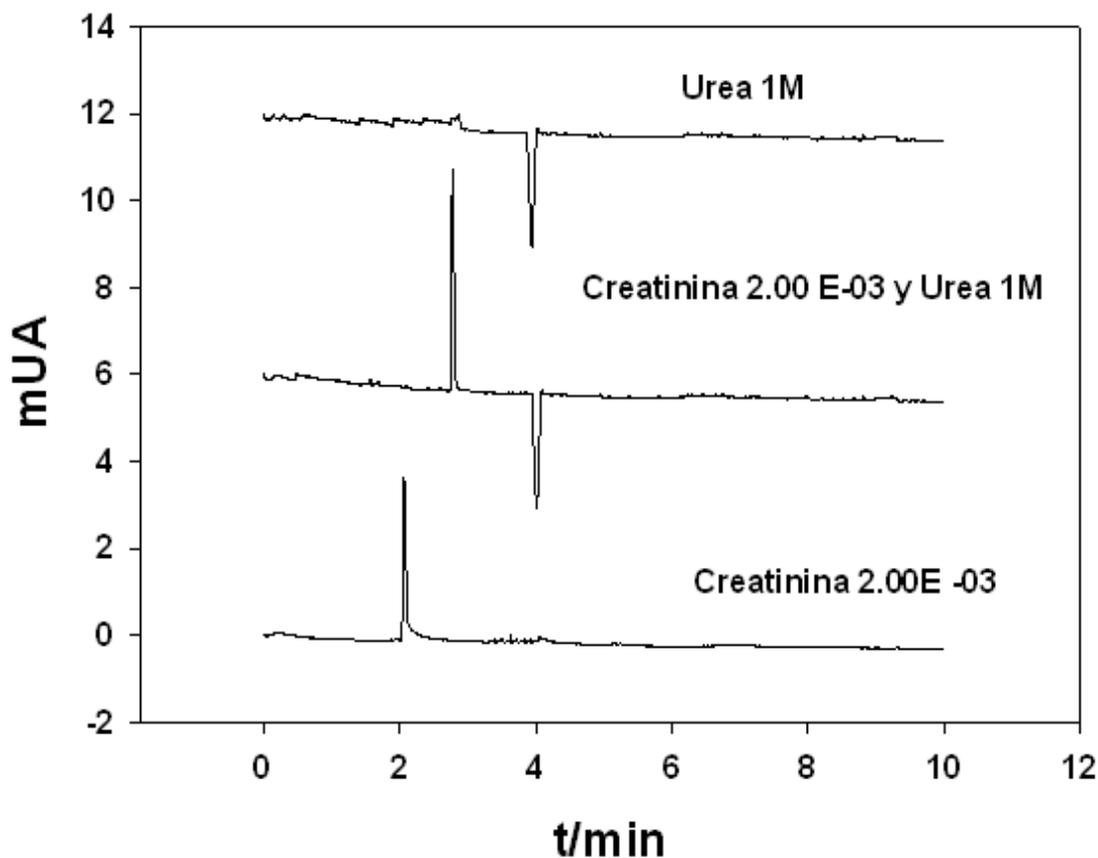


Figura 3.9. Electroferogramas de urea M y creatinina 2E-03M, con respecto a la mezcla de los analitos. Buffer de acetatos 0.05M y β -ciclodextrina 0.1M/0.1M (pH 4.2), 15KV, 214 nm, 25° C, polaridad normal.

Una vez elegidas las mejores condiciones de análisis, se realizaron curvas de calibración para creatinina y urea (Figs. 3.10 y 3.11). Cabe mencionar que bajo dichas condiciones se obtiene una excelente reproducibilidad en los tiempos de electromigración, lo cual indica que el capilar es activado adecuadamente entre cada una de las corridas.

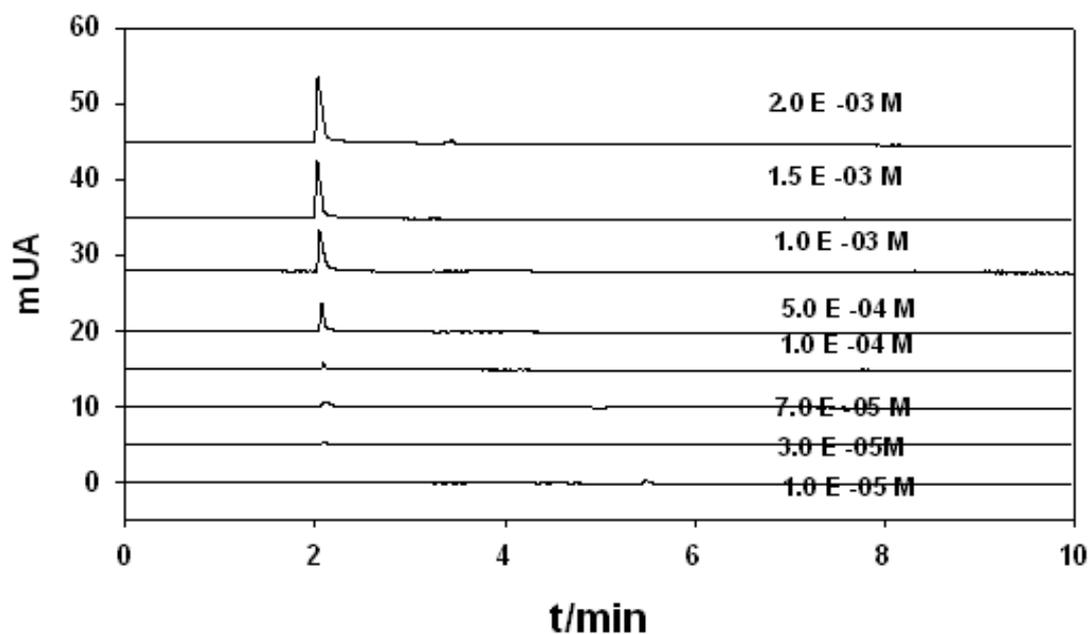


Figura 3.10. Electroferogramas de creatinina a diferentes concentraciones. Buffer de acetatos 0.05 M y β -ciclodextrina 0.1M/0.1M (pH 4.2), 15KV, 214 nm, 25° C, polaridad normal.

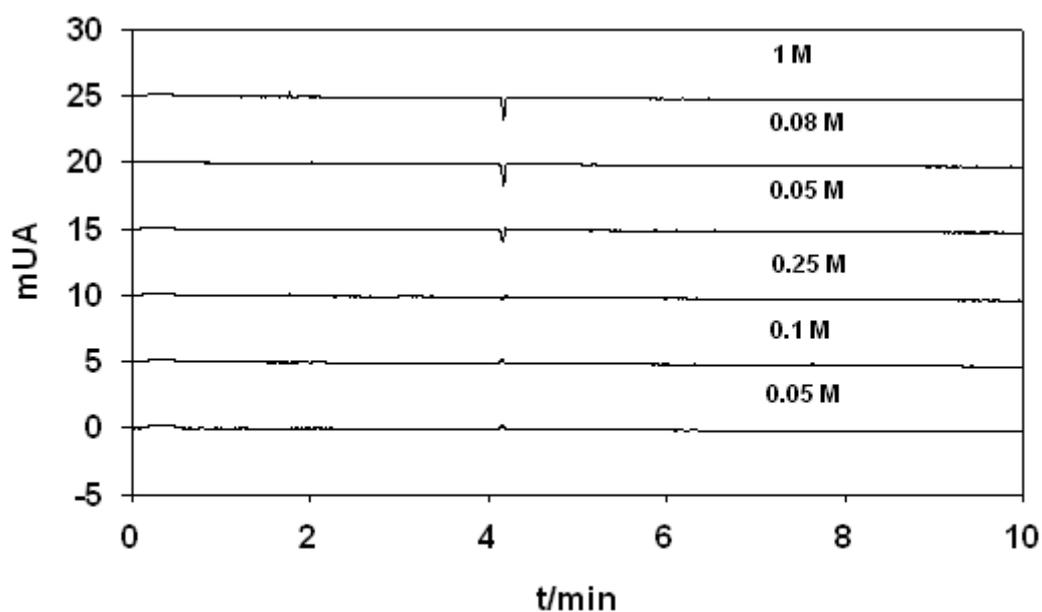


Figura 3.11. Electroferogramas de urea a diferentes concentraciones. Buffer de acetatos 0.05 M y β -ciclodextrina 0.1M/0.1M (pH 4.2), 15KV, 214 nm, 25° C, polaridad normal.

Para la creatinina, se presentó un tiempo de electromigración de 2.33 min. (0.47% DSR); la curva de calibración se llevó a cabo entre 1×10^{-5} y 2×10^{-3} M (Figs. 3.12 y 3.13), presentándose linealidad en el intervalo de 7×10^{-5} a 2×10^{-3} M; siendo el límite de detección de 1×10^{-5} M. Los parámetros de calibración con respecto al área y altura de pico, se presentan en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Parámetros de calibración de tres curvas de calibración para urea y creatinina obtenidas por electroforesis capilar.

Analito	Variable	Coefficiente de correlación (r^2)	Ordenada al origen (b)	Pendiente (m)
Urea	Área	0.9998	103.4 (14.4%)	3,717.8 (11.1%)
Urea	Altura	0.9999	6.0 (15.5%)	2,185.0 (4.0%)
Creatinina	Área	0.9998	302.9 (14.1%)	18,993,472.0 (3.3%)
Creatinina	Altura	0.9999	40.4 (6.2%)	4,293,543.2 (1.0%)

⁽¹⁾ Entre paréntesis el porcentaje de desviación estándar.

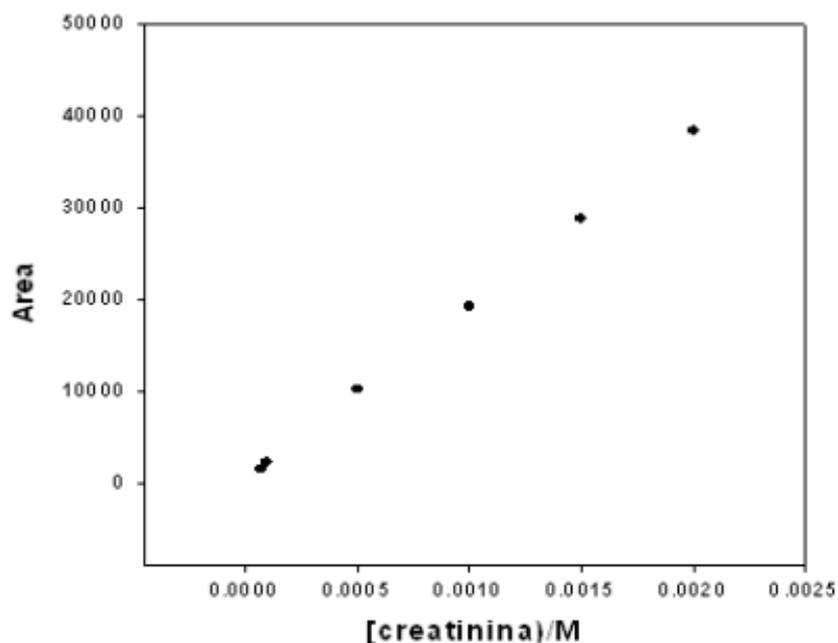


Figura 3.12 Curva de calibración de área contra concentración de creatinina obtenida a partir de electroferogramas como los mostrados en la figura 3.10.

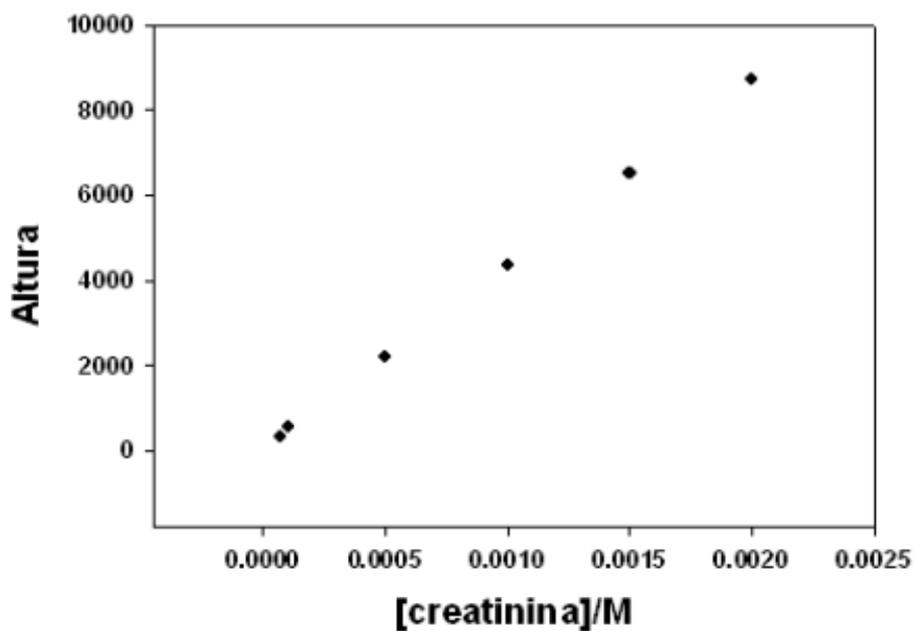


Figura 3.13 Curva de calibración de altura de pico contra concentración de creatinina obtenida a partir de electroferogramas como los mostrados en la figura 3.10.

La urea presentó un tiempo de electromigración de 4.19 min. (0.84% DSR); la curva de calibración se llevó a cabo entre 0.01 y 1.00M (Figs. 3.14 y 3.15), presentando linealidad en el intervalo de 0.1 a 1.0M; siendo el límite de detección de 0.1M.

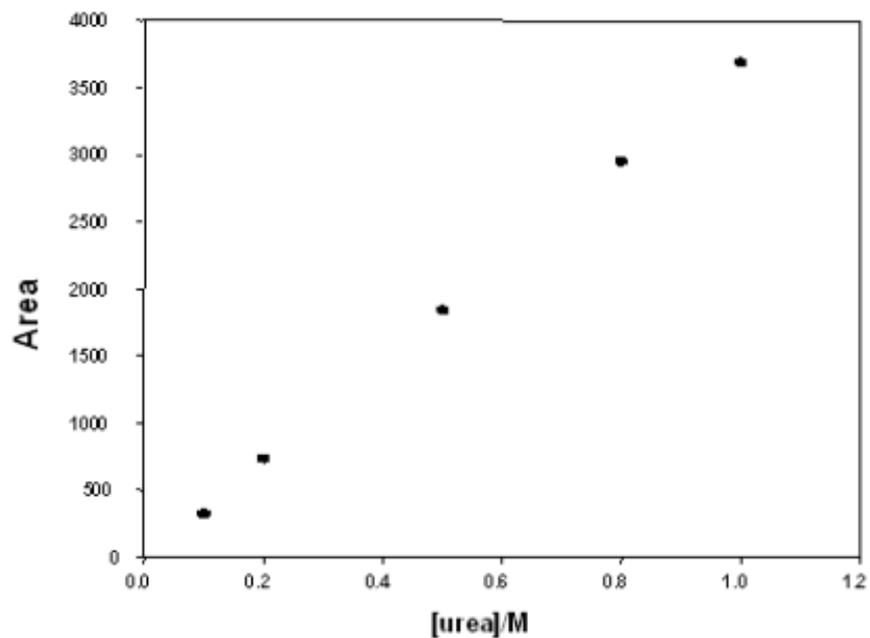


Figura 3.14. Curva de calibración de área contra concentración de urea obtenida a partir de electroferogramas como los mostrados en la figura 4.11.

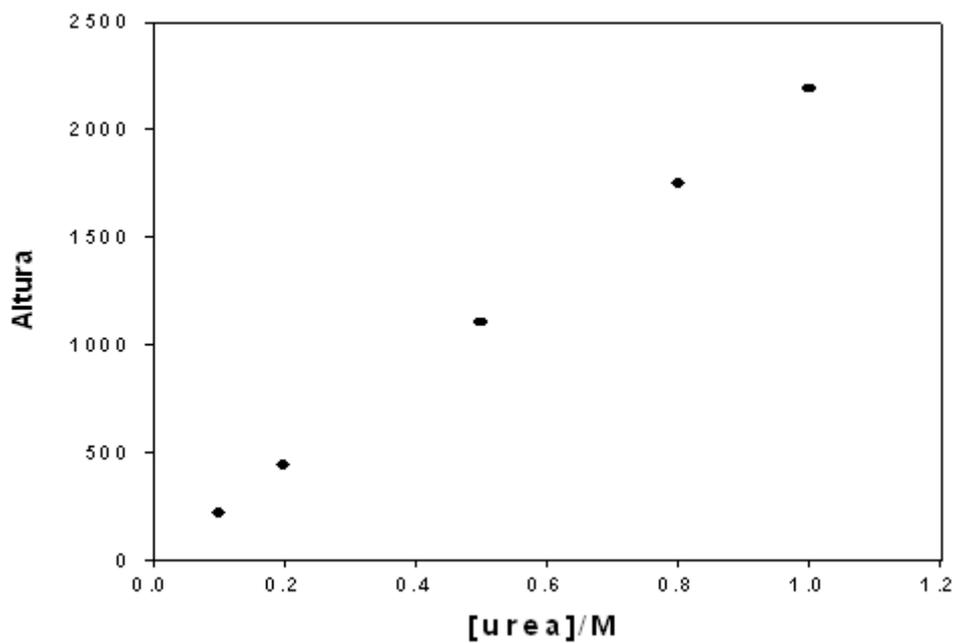


Figura 3.15. Curva de calibración de altura de pico contra concentración de urea obtenida a partir de electroferogramas como los mostrados en la figura 3.11.

3.3.6 Análisis de una muestra de orina

Como evaluación final del método electroforético desarrollado, se realizó el análisis de una muestra de orina, proveniente de un paciente sano. Dicha muestra fue diluida 1:5 y filtrada previamente a su inyección en el equipo. El electroferograma obtenido se muestra en la figura 3.16.

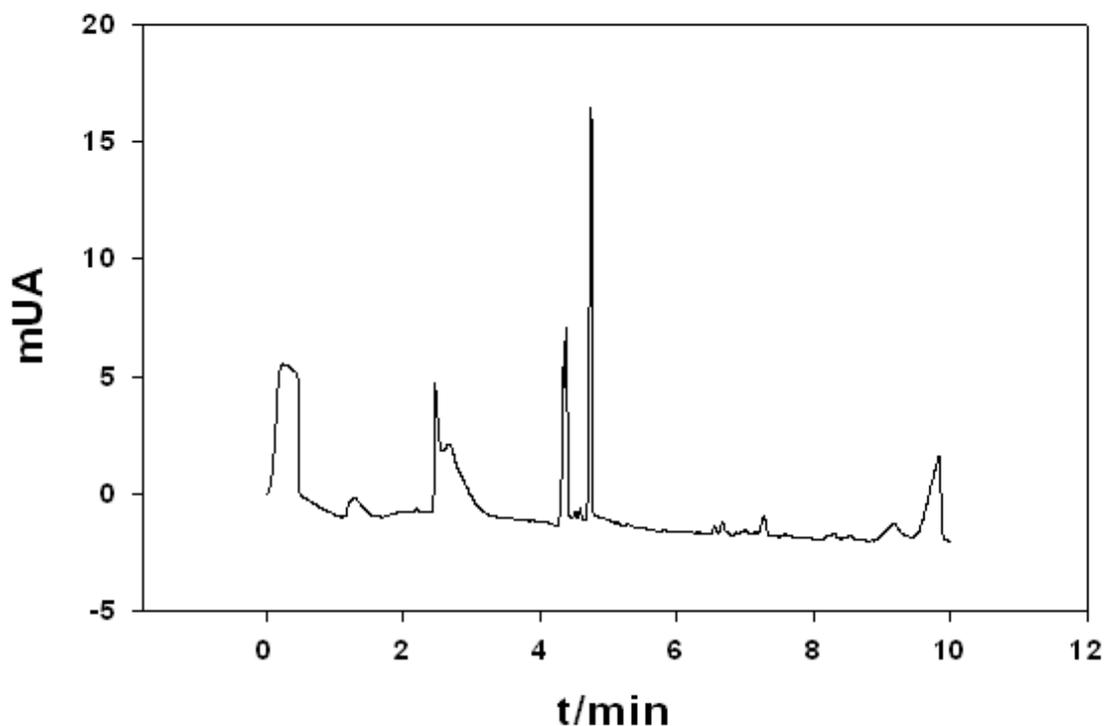


Figura 3.16. Electroferograma de la muestra de orina. Buffer de acetatos 0.05 M y β -cliclodextrina 0.1M (pH 4.2), 15KV, 214 nm , 25° C, polaridad normal

En el electroferograma obtenido se observa claramente que la orina es una muestra compleja que presenta diversas señales. Es particularmente interesante encontrar en 2.3 minutos, el pico correspondiente a la creatinina, aunque dicha señal no se encuentra totalmente resuelta; por otra parte, no se aprecia la señal debida a la urea, ya que a 4.2 minutos se obtiene un pico con señal positiva que lo encubre. Consecuentemente, solamente es posible cuantificar creatinina con el método desarrollado a partir de la altura de pico.

Haciendo la consideración anterior y tomando en cuenta la curva de calibración realizada; así como la dilución efectuada, se encuentra que la orina

analizada tiene una concentración de creatinina de $6.29E-03M$. por lo cual se puede decir que el método puede ser utilizado para la cuantificación de creatinina con otros métodos de análisis si consideramos que dicho valor se encuentra dentro de los límites normales (ver apartado 1.1.1). No obstante debe confirmarse dicha aseveración mediante otro método.

CAPÍTULO 4

Conclusiones

Las conclusiones más relevantes que se desprenden de la realización del presente estudio se listan a continuación:

- Mediante el uso de buffers neutros y básicos, bajo las condiciones de trabajo, no fue posible separar la mezcla de urea, creatinina y glucosa debido fundamentalmente a que bajo dichas condiciones todas ellas son especies neutras.
- El uso de modificadores como SDS y β -CD no permitió separar la mezcla de analitos considerados, lo cual es evidencia de la escasa interacción que existe entre la urea, creatinina y glucosa con los modificadores utilizados.
- La existencia de un complejo aniónico glucosa-borato no es apoyada por nuestros resultados experimentales, a pesar de haber sido reportada en la literatura.
- La técnica de cuantificación desarrollada en medio ácido, es útil para la cuantificación de creatinina en muestras de orina a partir de la altura de pico con buena sensibilidad y precisión. No obstante las diversas señales que presenta dicha muestra, hace imposible el análisis paralelo de urea y glucosa debido a la baja sensibilidad en su respectiva detección y la sobreposición de señales al tiempo de electromigración que presentan.
- El desarrollo de una técnica eficiente de cuantificación de urea en presencia de creatinina y glucosa, implica un reto analítico interesante para el cual el presente trabajo representa una importante contribución. En este sentido debe incrementarse la sensibilidad hacia urea y glucosa (probablemente mediante derivatización) y buscar alternativas para la separación eficiente de estas especies neutras. Asimismo, es necesario incorporar un tratamiento previo de las muestras a fin de eliminar especies

interferentes y el estudio de estabilidad de los analitos bajo diversas condiciones de análisis.

- En el presente trabajo se presentaron resultados experimentales que contradicen parte de la información termodinámica reportada en la literatura, por lo cual deben revisarse en posteriores estudios las constantes de acidez de la creatinina y glucosa; así como la supuesta existencia de un complejo aniónico borato-glucosa.

REFERENCIAS

Referencias

- [1] Merck & Co., Inc., *The Merck Index twelfth edition on CD-ROM version 12:2*. 1998, Chapman & Hall, USA.
- [2] Dean, J. A., *Lange. Manual de Química (Tomo III) 13ª Edición*. 1998, Mc Graw Hill, México.
- [3] Academic Software, *The IUPAC Stability Constants Database Sc query version 5.12*, 2001, Reino Unido.
- [4] Robert Bohinski, *Bioquímica 5a Edición*, 1998. Addison Wesley, México
- [5] Tood-Sanford,. *Diagnóstico y tratamiento clínico para el laboratorio*. 8a Edición. Ed Salvat Tomo I. México.
- [6] Krupp, Marcus A. et. all. *Manual de diagnóstico clínico y de laboratorio*. El Manual Moderno. 1986, México.
- [7] Argeri, Nelson Jorge y Lopardo, Horacio Angel. *Análisis de orina. Fundamentos y práctica*. Editorial Médica Panamericana. 1993, Argentina.
- [8] Than C. Tran, Timothy A. Huq, Helen L. Kantes, Joanne N. Crane, T. G.Strein. *Journal of Chromatography B*, 690 (1997) 35-34.
- [9] Advanced Chemistry Development, *ACD/pKa DB 5.0*, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada 1994-2001.
- [10] Ziad El Rassi, *High performarce capillary electrophoreis of carbohydrates*,1996. Beckman Instruments,USA.
- [11] Francis P. S., Lewis S. W., Lim K. F. *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 389-399.
- [12] Pacheco H. M. L. *Tesis doctoral*, Universidad de Masaryk, República Checa 2002.
- [13] Beckman Instruments, *Introduction to capillary electrophoresis*, 1994 Beckman Instruments, USA.
- [14] Morteza G. Khaledy.,*High Perfomance Capillary electrophoresis , Theory, Techniques, and Applications*. 1997. A Wiley- Interscien Publicación. Volumen 146.

- [15] Paul d. Grussman, Joel c. Colburn. Capillary electrofhoresis, theory and practice. Editorial Academic Press. 1992
- [16] Yan Xu. *The chemical educator*, 1 (1996) 1-14.