



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE  
DESCOMPOSICIÓN DEL CLORAMBUCILO  
POR ELECTROFORESIS CAPILAR.

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**Q U I M I C O**

**P R E S E N T A:**

**OSCAR ORDOÑEZ LIBRADO**

ASESORES:

Dr. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO.

Dr. MIGUEL ANGEL HERNÁNDEZ BALBOA.

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX. 2008



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.

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

## AGRADECIMIENTOS.

*Quiero dar gracias a Dios por darme la oportunidad de vivir y a mis padres por darme la vida; así como todo el apoyo, los consejos, por todos los sacrificios que han hecho por mi y sobre todo por la confianza que me han brindado, porque gracias a ustedes ahora soy una persona de bien y he logrado uno de mis más grandes anhelos que es ser profesional, mil gracias por todo, los quiero mucho...*

*Quiero agradecer a mis hermanos: Miguel Ángel, José Luis, Héctor Adrian y Jorge Alberto, por apoyarme en los momentos en los que más los he necesitado y por formar parte de mi vida, quiero que sepan que estoy muy orgulloso de cada uno de ustedes.*

*Gracias a mis cuñadas Leonila y Nora por formar parte de la felicidad de mis hermanos y a mis sobrinos Ma. Fernanda y Ángel Emmanuel, gracias por llenar de dicha nuestro hogar y brindar una gran felicidad a nuestras vidas bebés.*

*Un agradecimiento muy especial al Doc. Enrique y a la Dra. Ana María, porque son parte muy importante en mi vida profesional, mil gracias por ser mis amigos.*

*Quiero agradecer profundamente a todos mis amigos que a lo largo de este difícil pero muy satisfactorio camino nunca me han abandonado porque han estado conmigo en todo momento, gracias por todos los consejos, los regaños, los buenos y malos ratos que han compartido conmigo, y por hacer de cada uno de mis días en ésta facultad algo muy especial y diferente, pero sobre todo por su cariño y comprensión muchas gracias a todos chavos por dejarme ser parte de sus vidas: Abigail S. R, Angeles O, Cesar M. H, Elideth M. V, Elizabeth R. L, Isaias A. M, José G. M. H, Lizbeth A. M. H, Luis I. R. G, Marisol M. C, Martha R. F. G, Miguel A. H. B, Mónica S. S, Norma R. L, Tania R. P y Victor H. A. R.*

*Quiero agradecer a todos los profesores de esta gran institución por todos sus conocimientos y el tiempo compartido en las aulas así como fuera de ellas y también a la Dra. Adriana Ganem R, a la Dra. Gaby Vargas M y al M. C. Alberto Ramírez M por el tiempo y los consejos para la elaboración de este trabajo.*

*Por último quiero agradecer a todas las personas que en este momento están leyendo este trabajo.*

---

---

# ÍNDICE

1.0 INTRODUCCIÓN .....	1
2.0 GENERALIDADES .....	3
2.1 Electroforesis Capilar (EC) .....	3
2.2 Fundamento de la técnica .....	6
2.3 Flujo Electroosmótico (FEO) .....	8
2.4 Soluciones Amortiguadoras .....	12
2.5 Tipos de Electroforesis Capilar .....	13
2.6 Electroforesis Capilar de Zona (CZE) .....	13
2.7 Electroforesis Capilar en Gel (CGE) .....	13
2.8 Isotacoforesis Capilar (CITP) .....	14
2.9 Isoelectroenfoque Capilar (CIEF) .....	15
3.0 CINÉTICA QUÍMICA .....	16
3.1 Factores que influyen en la rapidez de reacción .....	16
3.2 Velocidad de reacción .....	16

---

---

4.0	COLORAMBUCILO .....	17
4.1	Aspectos Generales .....	18
4.2	Estructura .....	19
4.3	Propiedades Fisicoquímicas del clorambucilo .....	19
5.0	OBJETIVO GENERAL .....	21
5.1	OBJETIVOS PARTICULARES .....	21
6.0	MATERIAL Y EQUIPO .....	22
6.1	Reactivos .....	23
6.2	Preparación de soluciones .....	24
7.0	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	27
8.0	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
8.1	Resultados y Discusión pH 5 .....	29

---

---

<b>8.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN pH 7</b> .....	<b>35</b>
<b>8.2.1 Resultados y Discusión pH 7 20°C</b> .....	<b>35</b>
<b>8.2.2 Resultados y Discusión pH 7 37°C</b> .....	<b>39</b>
<b>8.2.3 Resultados y Discusión pH 7 60°C</b> .....	<b>42</b>
<b>8.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN pH 9.2</b> .....	<b>45</b>
<b>8.3.1 Resultados y Discusión pH 9.2 20°C</b> .....	<b>45</b>
<b>8.3.2 Resultados y Discusión pH 9.2 37°C</b> .....	<b>48</b>
<b>8.3.3 Resultados y Discusión pH 9.2 60°C</b> .....	<b>51</b>
<b>9.0 CONCLUSIONES</b> .....	<b>55</b>
<b>10.0 REFERENCIAS</b> .....	<b>56</b>

---

---

## 1.0 INTRODUCCIÓN

Hoy en día existe una gran demanda por el desarrollo de métodos analíticos sensibles, rápidos, confiables y de bajo costo para la determinación de diversos productos, control de calidad de productos farmacéuticos. Durante la síntesis, obtención y en el proceso de desarrollo de un nuevo fármaco, así como en todas las etapas subsecuentes de control de calidad deben analizarse una gran cantidad de muestras antes de poder liberar un producto al mercado, por lo que es imprescindible el generar métodos analíticos confiables.

Así mismo, durante la etapa de estudios clínicos, farmacológicos y toxicológicos de los nuevos fármacos, deben realizarse un sin número de análisis en fluidos biológicos como sangre, suero, orina, tejidos e identificación de las moléculas o compuestos.

Tradicionalmente estos análisis se han llevado a cabo usando métodos como la espectrofotometría, UV-Vis, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o la cromatografía de gases (CG). Sin embargo, han surgido otros métodos analíticos como: la cromatografía en capa delgada de alto rendimiento (HPTLC) y la electroforesis capilar (EC) que cubre con todos los requerimientos necesarios para llevar a cabo los mismos. Además la E.C ofrece otras cualidades que han generado un gran interés para emplearse en las etapas del análisis de medicamentos.

Para elegir una técnica de separación, además de tener en cuenta los criterios económicos y de accesibilidad, hay que considerar las propiedades físicas y estructurales de la molécula que se pretende separar e identificar.<sup>23</sup>

El control de calidad en la industria farmacéutica es especialmente riguroso porque el producto final está destinado a consumo humano. La determinación del contenido de principio activo, de impurezas relacionadas, la uniformidad de contenido por unidad de dosis o las pruebas de estabilidad son ensayos habituales en un laboratorio farmacéutico.



---

---

El elevado poder de resolución de la EC la hace una técnica adecuada para este tipo de ensayos donde es habitual la separación de compuestos con una estructura química muy parecida.

El clorambucilo es un compuesto químico utilizado principalmente en el tratamiento contra el cáncer de los nódulos linfáticos (leucemia) aunque también se puede utilizar para otros tipos de cáncer.

El clorambucilo interfiere con el crecimiento de las células cancerígenas. Este puede producir alteraciones en espermias y óvulos. Se ha encontrado que parte de sus efectos colaterales se deben a sus productos de biodegradación.<sup>10</sup>

En este trabajo se presenta el estudio de la cinética de degradación del clorambucilo por medio de la electroforesis capilar (EC), el método es rápido y relativamente económico porque no se requieren grandes cantidades de muestra, además de ayudar a la preservación del medio ambiente por tratarse de una técnica no destructiva que emplea soluciones acuosas con compuestos inocuos a la naturaleza.

La importancia de este estudio reside en la aplicación y la determinación de la velocidad de degradación del clorambucilo en función del pH y la temperatura.

El trabajo aportará conocimientos sobre el comportamiento y la determinación analítica de este fármaco, estos resultados serán importantes para el desarrollo de otros proyectos relacionados.

---

---

## 2.0 GENERALIDADES

### 2.1 Electroforesis capilar (EC).

La Electroforesis Capilar (EC) es una técnica de separación que se basa en la migración diferencial de una mezcla de analitos bajo la acción del campo eléctrico. Ha tenido un gran desarrollo a nivel de investigación en la última década, sin embargo; su implantación a nivel industrial ha sido reducida.

La E. C se basa en los mismos principios de las técnicas electroforéticas convencionales, pero utiliza condiciones y tecnología distinta que nos permiten obtener una serie de ventajas. El flujo electroosmótico (FEO) generado por los grupos silanol de la superficie interna del capilar da como resultado una corriente plana del frente del líquido que contrasta con el frente parabólico de la cromatografía líquida de alta resolución.

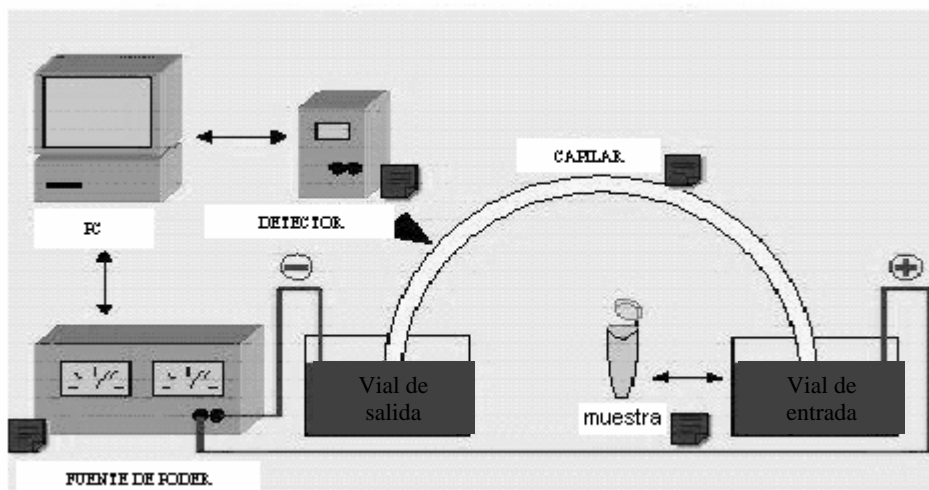


Fig. 1 Componentes básicos del sistema de EC. <sup>47</sup>

---

---

La ventaja de esta técnica es que el capilar de sílice fundida que generalmente se cubre con una capa de poliimida para darle mayor rigidez y resistencia, permite el paso de la luz UV de tal manera que la visualización es en línea. Con esta técnica es posible separar aniones, cationes, moléculas neutras y macromoléculas como proteínas, en forma simultánea.

La electroforesis convencional es actualmente una técnica de gran utilidad para separar especies complejas, de elevado peso molecular, de interés biológico y bioquímico. Sin embargo, este tipo de separación electroforética es lenta, laboriosa y difícil de automatizar, y además no proporciona resultados cuantitativos precisos. Debido a estos inconvenientes, a partir de la década de los ochenta comenzó a desarrollarse un tipo de electroforesis más rápida y con mejores resultados: la EC.<sup>22</sup>

Esta técnica se basa en la reducción drástica de la sección transversal del sistema de electroforesis empleado, es decir, la separación se realiza en el interior de un tubo capilar con un diámetro menor de 0.1 mm. De esta manera, la temperatura del líquido que fluye a través del capilar no aumenta si se aplica un potencial de corriente elevado (entre 20,000 y 30,000 V); ésto se traduce en una separación más rápida y con una mejor resolución. Por tanto, se pueden mantener voltajes más altos con un bajo calentamiento de Joule (el calentamiento de Joule es el calor producido por la corriente eléctrica).<sup>11</sup>

Otra ventaja adicional de la EC es que las especies separadas pueden detectarse directamente al aplicar el método. Se obtiene una gráfica de la respuesta en función del tiempo, llamada **electroferograma**, en la que cada pico representa una especie química separada.

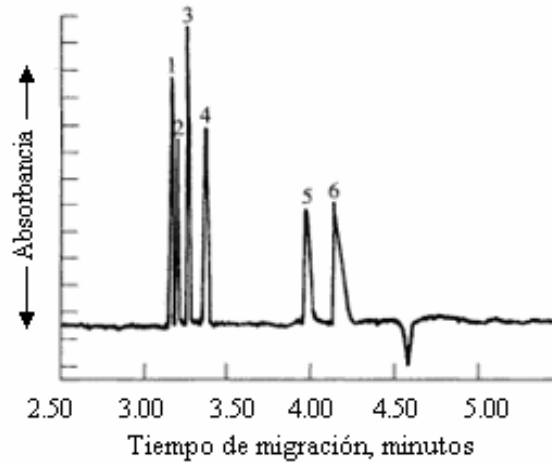


Fig. 2 Electroferograma de la hidrólisis del clorambucilo. <sup>32</sup>

Por resolución se puede entender la capacidad de una técnica o método para separar dos componentes en una mezcla. En la EC se define de forma análoga a la cromatografía:

$$R = \frac{t_{m1} - t_{m2}}{0.5(w_1 + w_2)} \quad \text{Ec. 1}$$

donde;

$t_{m1}$  = tiempo de migración del pico 1

$t_{m2}$  = tiempo de migración del pico 2

$w_1$  = ancho del pico 1

$w_2$  = ancho del pico 2

La separación entre los picos resulta de las diferencias en las movilidades electroforéticas de las especies, y por tanto será el ancho de la banda la que determine la mayor o menor resolución del método. El flujo electroosmótico, es el responsable de la disminución del ancho de las bandas.

---

Los electroferogramas tienen la misma apariencia general que los cromatogramas, por ello, la nomenclatura utilizada para describir la separación de los picos o bandas en cromatografía se usa también para la EC.

El sistema de EC, con su alta eficiencia y resolución, cortos tiempos de análisis, requerimientos mínimos de muestra y disolventes, cubre un amplio rango de aplicaciones, entre los cuales están el análisis de compuestos orgánicos desde bajo hasta alto peso molecular (proteínas, carbohidratos), el control de calidad en la industria farmacéutica, química y bio-ciencia.

Los métodos existentes evaluados por HPLC para el clorambucilo requieren de un tratamiento previo de la muestra con un tiempo promedio de 24 horas, así como de una solución estándar (aprox. 100 mL) y una fase móvil (500 mL), aumentando en esta manera el gasto por análisis de muestra, un acondicionamiento de la columna al menos de 30 minutos (con una solución de metanol-agua, 80:20) y 1 hora en promedio para realizar una corrida. Comparada con la EC, la muestra no requiere ser tratada, las cantidades de disolvente empleadas son menores (10 mL de metanol), el tiempo de trabajo es de 20 minutos aproximadamente.<sup>39</sup>

## **2.2 Fundamento de la técnica.**

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta se colocan en un campo eléctrico, experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo) fig 3.

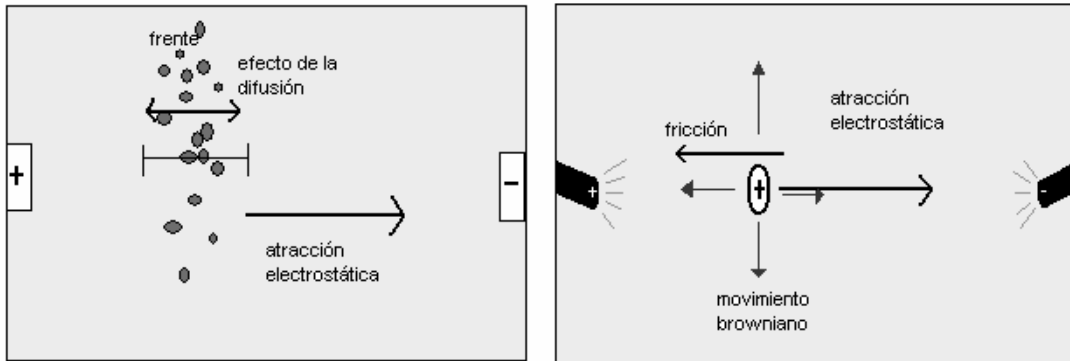


Fig. 3 Movimiento de las moléculas gobernado por dos fuerzas adicionales en EC. <sup>48</sup>

El movimiento de las moléculas está regido por dos fuerzas adicionales; inicialmente la fricción con el disolvente dificultará este movimiento originando una fuerza que se opone, por otro lado las moléculas tienen que moverse en forma aleatoria o movimiento browniano debido a que poseen energía cinética propia denominada difusión.

La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión.

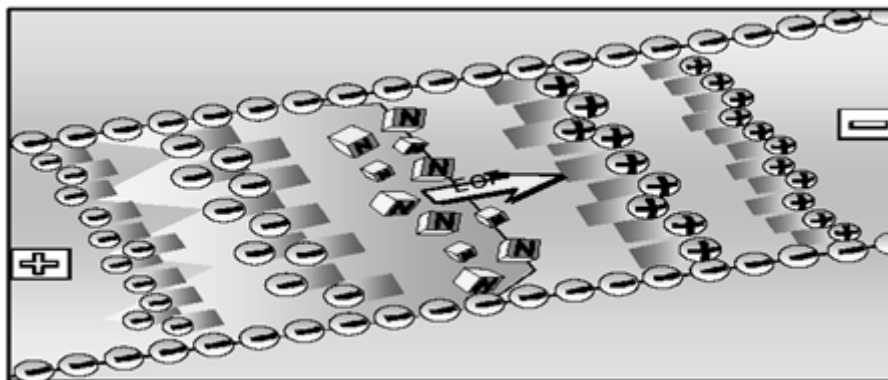


Fig. 4 Migración de iones a través del capilar. <sup>49</sup>

---

---

La suma de todas estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, de tal manera que, si las moléculas se colocan en un cierto lugar en la solución, los iones comenzarán a moverse formando un frente cuyo ancho aumentará con el tiempo. Para reducir el ancho de este frente podemos reducir el movimiento de las moléculas empleando un medio que oponga más resistencia ha dicho movimiento. Una forma común de hacer esto es formar un gel.<sup>31</sup>

La movilidad electroforética de un ión es directamente proporcional a la fuerza eléctrica del ión e inversamente proporcional a los factores de retardo por rozamiento. La fuerza de retardo por rozamiento se determina en un ión a partir de su tamaño y de la viscosidad del medio en el que migra. Las separaciones por tanto se basan en las diferencias en la relación carga-tamaño entre los diferentes analitos presentes en la muestra; cuanto mayor sea esta relación más rápido migrará el ión en el seno del campo eléctrico. Para iones del mismo tamaño, el de mayor carga eléctrica migrará más rápidamente. Para iones con la misma carga migrará más aquel de menor tamaño, ya que tendrá una fuerza de retardo por rozamiento de menor valor. La resistencia del medio al paso del ión también influye en su movilidad electroforética, ésta es menor cuanto mayor sea la viscosidad del medio.

Para hacer una separación efectiva es necesario mantener constantes las cargas de cada especie de iones, de manera que la relación carga-masa (y por tanto la velocidad de migración) permanezcan en el intervalo más estrecho posible. Asegurar que la carga se mantiene igual sobre cualquier ácido o base quiere decir que las separaciones electroforéticas requieren disoluciones.

### **2.3 Flujo electroosmótico (FEO).**

Al aplicar una diferencia de potencial entre los extremos de un capilar que contiene un líquido, se constata que el líquido se mueve. Este movimiento se denomina flujo electroosmótico (FEO). La velocidad del flujo es proporcional al potencial aplicado y a la viscosidad del tampón y depende de la carga en la superficie del capilar.

---

La causa de la aparición del flujo electroosmótico es la formación de la doble capa eléctrica. Básicamente es una separación de la carga iónica, una segregación de capas de iones que se acumulan en la interfase formada entre la superficie del capilar y la disolución.

Los capilares usados en electroforesis capilar suelen ser de sílice fundida. A un pH mayor de 5, la pared interna del capilar de sílice presenta carga negativa debido a la desprotonación de los grupos silanol (Si-OH) de la superficie. Los cationes de la disolución formarán cerca de la superficie del capilar una primera capa interna (fija), en la que los cationes (inmóviles), están unidos fuertemente a la superficie del capilar. Una segunda capa, denominada capa móvil o difusa, formada también por cationes aunque unidos de manera más débil a la superficie del capilar, migrará hacia el cátodo (electrodo negativo) en presencia de un campo eléctrico. El resto de la disolución, mediante capilaridad, migrará a la misma velocidad y en la misma dirección, lo que producirá un perfil de flujo plano, a diferencia de la cromatografía, que produce perfiles de flujo laminar.<sup>25</sup>



Fig. 5 Comparación de perfiles de flujo electroosmótico en EC y HPLC.

La segregación de las capas de iones produce un potencial en la superficie que disminuye cuando aumenta la distancia desde la superficie. Este potencial  $\psi$  es grande en la capa fija, y su valor va disminuyendo conforme se adentra en la capa difusa. El punto clave es que donde termina la capa fija aún existe un cierto potencial, llamado potencial zeta  $\zeta$ , que permitirá el movimiento del fluido. La velocidad del flujo electroosmótico es proporcional a la diferencia de potencial e inversamente proporcional a la viscosidad de la solución amortiguadora.



---

La velocidad del FEO va a variar en función de los cambios que se produzcan en la solución amortiguadora; por ejemplo, una variación del pH del tampón origina un cambio en la ionización del capilar y un aumento de la concentración del tampón da lugar a una disminución del FEO. En general, cualquier alteración en la disolución que modifique la carga en la superficie del capilar, modifique la viscosidad del tampón o requiera un cambio en el potencial, altera la velocidad del FEO.

Como el FEO da lugar a un perfil de flujo plano reduce significativamente el ensanchamiento de banda y por tanto, mejora la resolución. La gran ventaja que presenta el FEO es que la separación electroforética y la detección pueden realizarse a la vez para cationes y aniones. Sin el FEO, o sólo aniones, o sólo cationes migrarían hacia el detector. El ión de carga opuesta migraría retrocediendo al final de la inyección, y los compuestos neutros se quedarían al final y se dispersarían por difusión. Con FEO todas las especies pasan por el detector.

Finalmente, la velocidad de un ión en la electroforesis capilar vendrá determinada por su velocidad electroforética y por su velocidad de flujo electroosmótico:

$$V = (\mu_e + \mu_{feo}) E \quad \text{Ec. 2}$$

donde;

$V$  = velocidad del FEO

$\mu_e$  = movilidad efectiva del analito ( $\text{cm}^2 / \text{V} \cdot \text{s}$ )

$\mu_{FEO}$  = movilidad del FEO ( $\text{cm}^2 / \text{V} \cdot \text{s}$ )

$E$  = Potencial Eléctrico ( $\text{cm} \cdot \text{s}$ )

---

En la EC, las especies migran hacia el cátodo, los iones negativos tendrán una movilidad electroforética negativa y por tanto, estos iones migrarán más lentamente que los positivos. El resultado final en el electroferograma será una serie de picos que indican el siguiente orden de elución: primero los cationes más rápidos, seguidos sucesivamente de los cationes más lentos, todas las especies neutras en una única zona y finalmente los aniones más lentos seguidos de los aniones más rápidos (Fig 6).

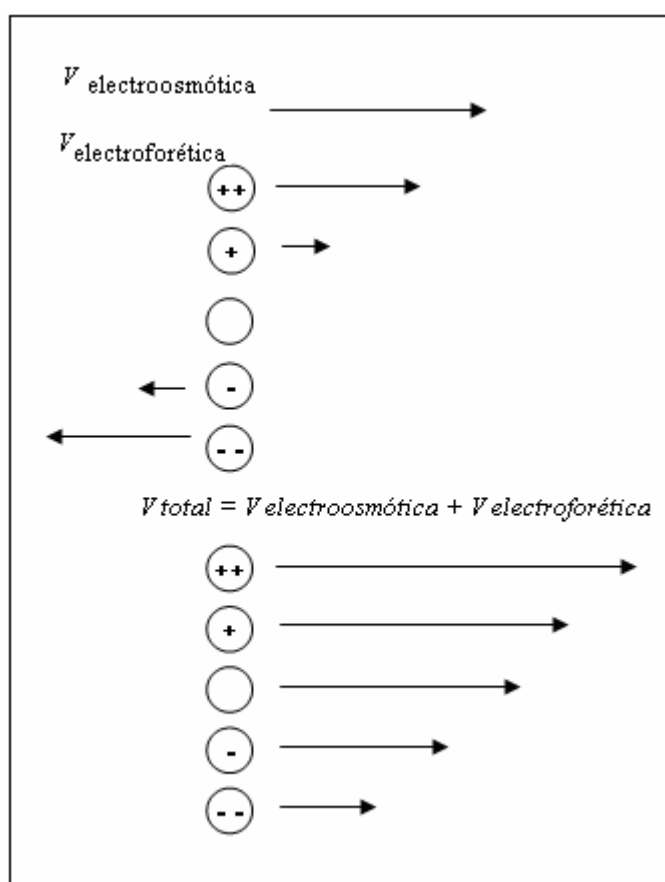


Fig. 6 Migración de iones según la movilidad electroforética.

---

---

## 2.4 Soluciones amortiguadoras.

Selección de la solución. La sensibilidad de FEO al pH requiere el uso de una solución amortiguadora o tampón que pueda mantener un pH constante. Los sistemas efectivos de estas soluciones tienen un rango de dos unidades de pH aproximadamente centradas alrededor del valor de pKa.

Una solución amortiguadora para uso de Electroforesis Capilar de Zona (CZE) debe tener las siguientes características:

- ✓ Buena capacidad de amortiguación en el rango seleccionado.
- ✓ Baja absorbancia a la longitud de onda de detección.
- ✓ Baja movilidad, para minimizar la generación de corriente.

Soluciones Amortiguadoras:

- De tipo químico.<sup>10</sup>

- ✓ Citrato
- ✓ Acetato
- ✓ Fosfato
- ✓ Borato

- De tipo biológico.<sup>9</sup>

- ✓ MES
- ✓ PIPES
- ✓ ACE
- ✓ HEPES

---

---

## **2.5 Tipos de electroforesis capilar.**

Existen principalmente dos métodos electroforéticos ampliamente utilizados: la electroforesis convencional y la electroforesis capilar. La primera se lleva a cabo sobre papel o sobre un gel, en los que se aplica la muestra directamente. La solución amortiguadora, que será el medio conductivo cubre la placa de papel o de gel. Seguidamente se aplica el potencial de corriente continua a través de la placa. Cuando se considera que se han completado las separaciones se interrumpe el paso de la corriente y si es necesario, las muestras se tiñen para visualizarlas.

La EC se divide a su vez en otras técnicas derivadas, éstas son:

## **2.6 Electroforesis capilar de zona (CZE).**

La composición del tampón es constante en toda la zona de separación, y los analitos se separarán en función de su movilidad, llevando todos (cationes, aniones y especies neutras) la misma dirección, debida al flujo electroosmótico.

Anteriormente, para el análisis de cationes se utilizaba la espectroscopia de absorción atómica, y para los aniones la cromatografía de intercambio iónico. Los equipos más económicos, con menor requerimiento de muestra, mayor rapidez y mejor resolución hacen de la electroforesis capilar un método apropiado para separar estos analitos.

La CZE puede también separar moléculas de distintos tamaños (pesticidas, fármacos) siempre que sean moléculas cargadas o puedan derivatizarse para dar un ión.<sup>42</sup>

## **2.7 Electroforesis capilar en gel (CGE).**

En la electroforesis convencional se usaron geles para reducir la dispersión del analito debida a la difusión del propio analito y a la convección.

---

Posteriormente se observó que el gel podía actuar de tamiz molecular, haciendo que las especies migrasen en grados diferentes según el tamaño de poro del gel. Este tipo de separación por tamaños es útil para especies que tienen la misma carga pero diferente tamaño.

La CGE se lleva a cabo en una matriz formada por un polímero de acrilamida (poliacrilamida) que deja una serie de poros en los que se aloja el tampón y en los que se lleva a cabo la separación. También es posible realizar la CGE con geles de agarosa.

## 2.8 Isotacoforesis capilar (CITP).

Isotacoforesis significa electroforesis a velocidad uniforme, es decir que el tiempo de recorrido en el capilar bajo condiciones isotacofóricas es independiente de la velocidad. La CITP es una técnica de separación por desplazamiento.

En ésta las bandas de los analitos migran todas a la misma velocidad. La muestra se inyecta entre dos tampones: el frontal, que contiene los iones de mayor movilidad (esta movilidad debe ser mayor que la de los componentes a analizar) y el terminal en el que van los iones de menor movilidad que los iones de la muestra. Este método no puede utilizarse para separar aniones de cationes a la vez.

En un principio, los iones migran a distintas velocidades, de acuerdo a la **ecuación 3**.

$$V = \mu_e E \quad \text{Ec. 3}$$

donde;

$V$  = velocidad del FEO

$\mu_e$  = movilidad efectiva del analito ( $\text{cm}^2 / \text{V} \cdot \text{s}$ )

$E$  = Potencial eléctrico ( $\text{cm} \cdot \text{s}$ )

---

---

y la diferencia en las velocidades de migración da lugar a la separación de los distintos analitos.

## **2.9 Isoelectroenfoque capilar (CIEF).**

La separación de los analitos en este caso se basa en sus diferentes puntos isoeléctricos (la carga neta de la molécula es cero). Los analitos deben ser sustancias anfóteras (sustancias que en disolución son capaces tanto de ceder como de aceptar un protón, como aminoácidos y proteínas).

La separación se lleva a cabo en una mezcla de tampones cuyo pH varía a lo largo del sistema de separación, es decir, se establece un gradiente de pH mediante la mezcla de tampones especiales denominados anfólitos, que son compuestos anfóteros.

Los analitos se disuelven en la mezcla de anfólitos y se introducen en el capilar. Uno de los extremos del capilar se introduce en una disolución básica, en la cual también se aloja el cátodo. El otro extremo del capilar se introduce en una disolución ácida que contiene el ánodo. Al aplicar el voltaje, los protones migrarán desde el ánodo hacia el cátodo, y los iones hidroxilo migrarán desde el cátodo hasta el ánodo. De esta manera se establece el gradiente de pH.

Cuando una molécula, bien sea un analito o bien un anfólito, tiene una carga negativa neta, entonces migrará hacia el ánodo. Esta migración se detiene cuando la molécula alcanza una zona del capilar en la que el pH es igual a su punto isoeléctrico. El resultado es la separación de los analitos en bandas estrechas, situadas en el valor de pH correspondiente a su punto isoeléctrico. Estas separaciones, por tanto, no se basan en las diferentes velocidades de migración de los analitos. <sup>5</sup>

---

---

## 3.0 CINÉTICA QUÍMICA

La cinética química es el campo de la fisicoquímica que se ocupa de la rapidez o velocidad de las reacciones, así como de los mecanismos de las mismas. La velocidad de cada reacción se determina experimentalmente.

### 1.1.3.1 Factores que influyen en la rapidez de reacción.

Existen varios factores que afectan la velocidad de una reacción química: la concentración de los reactivos, la temperatura, la presión, la presencia de catalizadores y la superficie de contacto tanto de los reactivos como del catalizador.

### 3.2 Velocidad de reacción.

Se define la velocidad de una reacción química como la cantidad de sustancia formada (si tomamos como referencia un producto) o transformada (si tomamos como referencia un reactivo) por unidad de tiempo.

La velocidad de reacción no es constante. Al principio, cuando la concentración de reactivos es mayor, también es mayor la probabilidad de que se den choques entre las moléculas de reactivo, y la velocidad es mayor. A medida que la reacción avanza, al ir disminuyendo la concentración de los reactivos, disminuye la probabilidad de choques y con ella la velocidad de la reacción.

La medida de la velocidad de reacción implica la medida de la concentración de uno de los reactivos o productos a lo largo del tiempo, esto es, para medir la velocidad de una reacción necesitamos medir la cantidad de reactivo que desaparece por unidad de

---

---

tiempo ó la cantidad de producto que aparece por unidad de tiempo. La velocidad de reacción se mide en unidades de concentración/tiempo, esto es, en (mol/L) / s es decir mol / (L•s).

La velocidad media de aparición del producto en una reacción está dada por la variación de la concentración de una especie química con el tiempo:

$$v = \frac{dC}{dt} \quad \text{Ec. 4}$$

La velocidad de aparición del producto es igual a la velocidad de desaparición del reactivo. De este modo, para una reacción química hipotética:



El orden total de la reacción es la suma de todos los órdenes parciales de la reacción.

$$a+b+g+h = \text{orden de reacción total}$$

La velocidad de las reacciones químicas abarca escalas de tiempo muy amplias.<sup>27, 29 y 35</sup>

## 4.0 CLORAMBUCILO

**Clorambucilo**  $C_{14}H_{19}Cl_2NO_2$  (Nº CAS 305-03-3)

Sinónimos: Ácido 4-[*p*-(bis[2-hidroxietil]amino)fenil]butírico<sup>24</sup>, Amboclorin, Ácido bencenbutanoico, 4-[bis(2-cloroetil)amino], Ácido  $\gamma$ - *p*-bis-(2-cloroetil)bencenbutanoico, Cloramínofeno, Clorobutin.<sup>48</sup>



## 4.1 Aspectos generales.

El clorambucilo interfiere con el crecimiento de las células cancerígenas. Los efectos secundarios pueden continuar después de que se complete el tratamiento. El clorambucilo puede ocasionar un malestar general, esto es normal ya que afecta tanto a las células sanas como a las células cancerígenas. El individuo será más susceptible a las infecciones mientras esté tomando clorambucilo. Puede provocar problemas en la coagulación de la sangre, lo que provoca que las heridas cicatricen lentamente, con un mayor riesgo de infección.

La exposición puede provocar fiebre debida a reacciones alérgicas, mielosupresión, hepatotoxicidad, infertilidad, crisis convulsivas y toxicidad gastrointestinal. También puede reducir temporalmente el número de glóbulos blancos en la sangre, aumentando la posibilidad de contraer una infección, puede reducir el número de plaquetas, que son necesarias para la coagulación correcta de la sangre.<sup>3, 10, 24</sup>

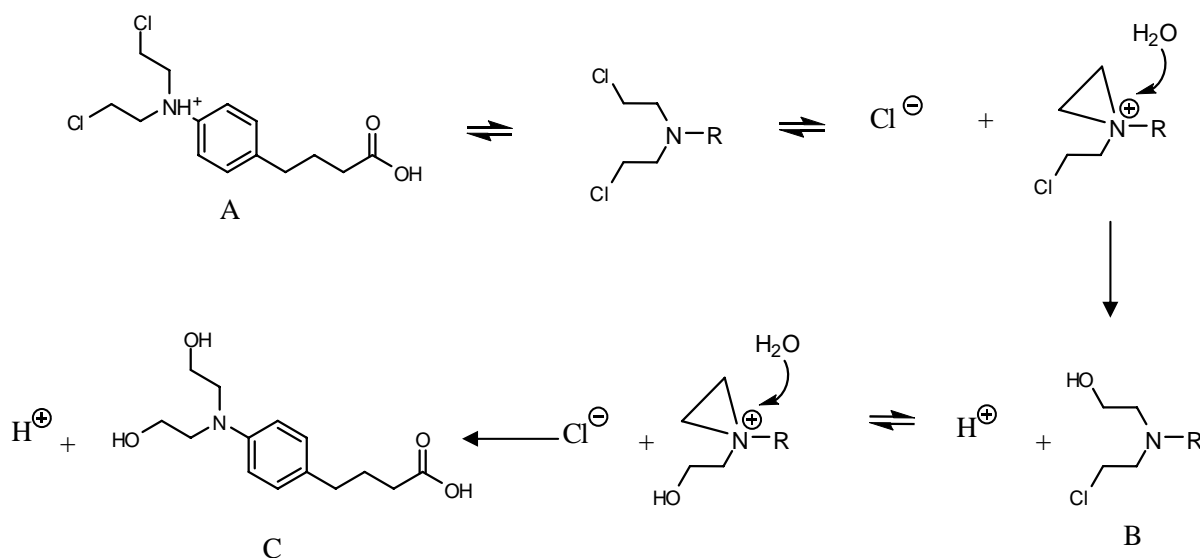


Fig. 7 Mecanismo de degradación del clorambucilo. (A) Clorambucilo, (B) Compuesto clorohidroxilado, (C) Compuesto di-hidroxilado.<sup>33</sup>

---

---

## 4.2 Estructura.

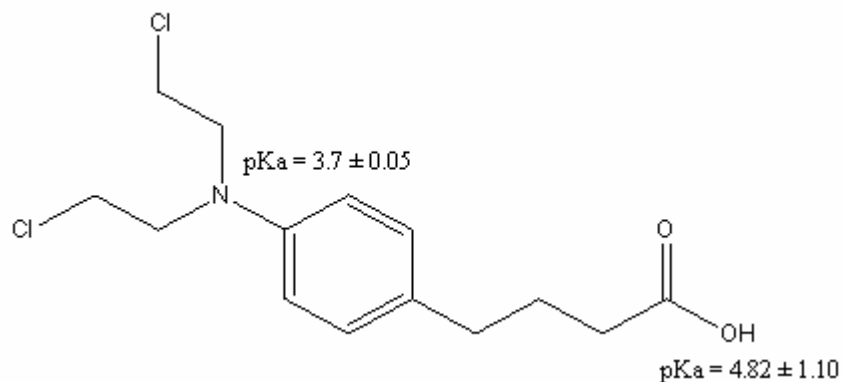


Fig. 8 Estructura del clorambucilo, valores de pKa calculados. <sup>2</sup>

1.

### 4.3 Propiedades Fisicoquímicas.

El clorambucilo es un agente alquilante bifuncional usado en el tratamiento de enfermedad de Hodgkin, en linfomas malignos, leucemia linfocítica crónica, cáncer de ovario y seno, el uso del clorambucilo provoca heces negras alquitranadas; sangre en la orina o en las heces; tos o ronquera.<sup>30</sup>

El clorambucilo puede producir alteraciones en espermatozoides y óvulos. Se ha encontrado que parte de los efectos colaterales del clorambucilo se deben a sus productos de biodegradación.<sup>2, 10</sup>

---

Es un compuesto tóxico en caso de ingestión. Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias.

Aspecto: polvo de color beige, con un peso molecular de 304.2 g/mol, P<sub>f</sub> 60–64°C, condición de inestabilidad: luz. Este fármaco debe mantenerse a una temperatura de 2–8°C para evitar su descomposición.

Es soluble en éter, a 20°C en 1.5 partes de alcohol, en 2.5 partes de cloroformo y 2 partes de acetona. Prácticamente insoluble en agua.<sup>37</sup>

---

---

## **5.0 OBJETIVO GENERAL**

- Estudiar la cinética de descomposición del clorambucilo por medio de EC, a diferentes valores de temperatura y pH, con la finalidad de contribuir al conocimiento de la estabilidad del clorambucilo, para estudios posteriores acerca de la formulación adecuada para mantener su estabilidad en el tracto gastrointestinal.

## **5.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Observar las señales de los productos de descomposición del clorambucilo, a 20 °C, 37 °C y 60 °C.
- Realizar el estudio de descomposición del clorambucilo a pH de 5 y 7 en solución amortiguadora de fosfatos y en boratos a pH 9.2
- Realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos por electroforesis capilar (EC).

---

---

## 6.0 Material y Equipo.

- Termómetro.
- Pipetas Pasteur; 10-100  $\mu\text{L}$  y 100-1000  $\mu\text{L}$  (Transferpette, Brand)
- pH-metro (Beckman Q 310)
- Matraces volumétricos de 5, 10, 25 y 100 mL (Kimax)
- Balanza analítica (Mettler AT200 Fact) precisión 0.1 mg.
- Parrilla (Thermolyne. Type 100 Stir Plate)
- Sonicador (Ultrasonic LC 304 Elma)
- Membranas de 0.45  $\mu\text{m}$ , diámetro: 2.5 mm (Durapore<sup>®</sup> PVDF)
- Capilares de sílice fundida de 59 cm de longitud total y 50 cm longitud efectiva, 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 325  $\mu\text{m}$  de diámetro externo. (Beckman Coulter, Fullerton, CA)
- Bomba de vacío.
- Equipo de Electroforesis Capilar (Beckman Coulter P/ACE System MDQ Capillary Electrophoresis, Fullerton, CA)

---

---

## 6.1 Reactivos.

- Hidróxido de sodio (Productos Químico Monterrey)
- Ácido clorhídrico (Productos Químico Monterrey)
- Solución amortiguadora estándar (Beckman Coulter pH's 4, 7 y 10)
- Metanol grado HPLC (TECSQUIM MÉXICO)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; ensayo 100% (Técnica Química)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; ensayo 100% (J. T Baker Xalostoc, México)
- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ; ensayo 100% (J. T Baker Xalostoc, México)
- Agua desionizada.
- Clorambucilo (Sigma Aldrich).

---

---

## 6.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

Para preparar cada una de las soluciones, se lavó y secó perfectamente todo el material que se utilizó.

### - Solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1 N

Para esta solución se pesaron 0.4 g de NaOH en un vaso de precipitados de 50 mL, se agregó agua desionizada para disolver el reactivo.

Una vez disuelto completamente, se vertió el contenido del vaso en un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con agua desionizada.

### - Solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N

Para esta solución se tomaron 0.8 mL de HCl con una pipeta graduada de 5 mL y se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL, el cual contenía agua desionizada.

Posteriormente se aforó.

### - 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 20 mM, a pH 5.

Se pesaron 0.2759 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en un vaso de precipitados de 100 mL, se agregó agua desionizada para disolver el reactivo.

Disuelto el reactivo totalmente, se agregó agua desionizada hasta un volumen de 80 mL aproximadamente, se ajustó el pH con la solución de NaOH ó HCl 0.1N según el caso.

---

---

Una vez obtenido el pH deseado se aforó la solución con agua desionizada a un volumen de 100 mL, se filtró con una membrana Durapore<sup>®</sup>, la solución obtenida se vertió en un frasco de color ámbar, por último se colocó en el sonicador (el frasco debe estar abierto) para desgasificar.

**- 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos 20 mM, a pH 7.**

Se pesaron 0.7602 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en un vaso de precipitados de 100 mL, se agregó agua desionizada para disolver el reactivo.

Disuelto el reactivo totalmente, se agregó agua desionizada hasta un volumen de 80 mL aproximadamente, para ajustar el pH (en este caso pH 7).

Una vez obtenido el pH deseado se aforó la solución con agua desionizada a un volumen de 100 mL, se filtró con una membrana Durapore<sup>®</sup> la solución obtenida se vertió en un frasco de color ámbar, por último se colocó en el sonicador (el frasco debe estar abierto) para desgasificar.

**- 100 mL de solución amortiguadora de boratos  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  20 mM, a pH 9.2**

Se pesaron 0.7628 g de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  en un vaso de precipitados de 100 mL, se agregó agua desionizada para disolver el reactivo.

Disuelto el reactivo totalmente, se agregó agua desionizada hasta un volumen de 80 mL aproximadamente, para ajustar el pH (en este caso pH 9.2).

Una vez obtenido el pH deseado se aforó a un volumen de 100 mL con agua desionizada, la solución se filtró con una membrana Durapore<sup>®</sup> la solución obtenida se



---

---

vertió en un frasco de color ámbar y por último se colocó en el sonicador (el frasco debe estar abierto) para desgasificar.

**- 10 mL de solución stock de clorambucilo [1200 mg/mL]**

Para esta solución se pesaron 12 mg de clorambucilo en un vaso de precipitados de 50 mL al cual se agregó metanol para disolver el fármaco.

Una vez disuelto totalmente el fármaco, la solución obtenida se vertió en un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con metanol.

|

---

---

## 7.0 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

- Se preparó la solución de clorambucilo con metanol grado HPLC (solución stock).
  - Se prepararon tres soluciones amortiguadoras.
- Solución amortiguadora de fosfatos a pH 5 y 7 respectivamente, con una concentración 20 mM.
- Solución amortiguadora de boratos a un pH de 9.2 y una concentración de 20 mM.
- De la solución stock se tomó una alícuota de 1650  $\mu$ L los cuales se aforaron hasta un volumen de 10 mL con la solución amortiguadora, (según las condiciones a las que se trabajaron).
  - Se variaron las condiciones de temperatura a: 20, 37 y 60 °C según el caso. La cual se mantuvo constante, con ayuda de un baño de agua a temperatura controlada.
  - Los ensayos se realizaron por triplicado, para cada sistema se tomó una alícuota de la solución stock y se aforó con la solución amortiguadora correspondiente.
  - De los sistemas anteriores se tomó una alícuota de 400  $\mu$ L para llevar a cabo cada corrida variando las condiciones de trabajo (temperatura y pH) las alícuotas se tomaron a los siguientes tiempos: 0 min, 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10 hrs.
  - Se realizaron las lecturas correspondientes en el equipo de EC contando con un detector de arreglo de diodos (UV-Vis), a una longitud de onda de 220 nm, polaridad normal y una temperatura del capilar de 25°C.
  - Se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

---

---

## 8.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA DESCOMPOSICIÓN DEL CLORAMBUCILO A DIFERENTES TEMPERATURAS Y pH's

Las corridas de cada experimento se realizaron por triplicado para cada uno de los tiempos de muestreo y de esta manera poder realizar el análisis estadístico adecuado, con los datos obtenidos se sacan los promedios del tiempo de migración, del flujo electroosmótico (MetOH), el tiempo de migración de clorambucilo, el área de los picos y la movilidad efectiva (**Ec. 5**), así como la desviación estándar.

$$\mu_{ef} = \frac{LxI}{V} \left( \frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{FEO}} \right) \quad \text{Ec. 5}$$

donde;

L = Longitud total del capilar

I = longitud efectiva

t<sub>m</sub> = tiempo de migración del analito

t<sub>FEO</sub> = tiempo del Flujo Electroosmótico

Considerando que los experimentos se realizaron con una polaridad denominada normal, el FEO se dirige hacia el cátodo (electrodo con carga negativa), los analitos con carga positiva mostraran señal con menor tiempo de migración, incluso antes que el FEO y los aniones a su vez tendrán tiempos de migración mayores que el flujo electroosmótico; por lo tanto los cationes presentarán movilidades positivas y los aniones negativas.

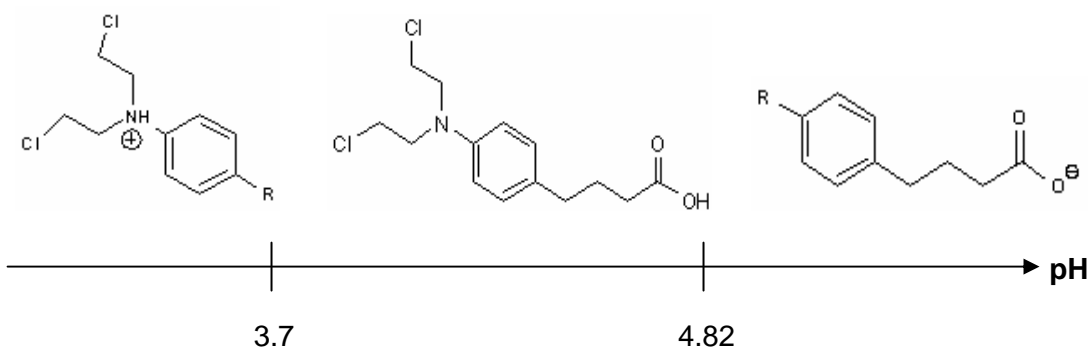


Fig 9 (A) Clorambucilo en su forma catiónica, (B) Clorambucilo, (C) Clorambucilo en su forma aniónica.

## 8.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE pH 5

El primer pH al cuál se trabajó fue de 5, a una temperatura de 20°C en esta parte del experimento se observó que el FEO en el tiempo inicial presentó señal antes que los productos de descomposición del clorambucilo.

La descomposición del fármaco es acelerada, debido a que desde la primera muestra que se analizó se aprecian picos que no corresponden al FEO ni al analito, esto lo podemos apreciar en los electroferogramas de la figura 10, en donde se observa que la concentración del fármaco va disminuyendo y conforme transcurre el tiempo se obtienen picos previos al FEO, sin embargo; después de las 2 horas el comportamiento del mismo comenzó a invertirse observándose un pico de descomposición antes que la del FEO; se cree que fue debido a la protonación del fármaco, ya que este tiene dos valores de pKa 3.7 y 4.82<sup>1</sup>

Posiblemente la molécula en estudio adquirió una carga positiva logrando que de esta manera se convirtiera en un catión por lo tanto, se cree que se puede llegar a formar el producto de descomposición di-hidroxilado fig 7C (Loftsson T. 1989)<sup>33</sup>

---

---

Al observar la estructura en estudio podemos ver que tiene dos grupos funcionales: una amina terciaria y un carboxilo.

A pH 5 el compuesto se puede encontrar en su forma neutra (fig 9 B) ó aniónica (fig 9C).

Al estar en un medio ácido, los protones presentes son atraídos por el par de electrones libres de la amina ocasionando que la amina adquiera una carga formal positiva, una vez originado esto, la amina va a tender a buscar su estabilidad y por lo tanto esto podría ocasionar que está forme un ciclo, hasta llegar al producto di-hidroxilado fig 7C.

Por esta razón en los electroferogramas, antes de dos horas se observan picos después del FEO debido a un compuesto con carga negativa, a partir de las tres horas hay un pico que se observa antes del FEO con carga positiva, el proceso de adsorción que posiblemente ocurre para este pH, es posible que represente un factor importante.

Este compuesto es fácilmente ionizable hacia su forma catiónica, haciendo que la velocidad y la movilidad del FEO se vea reducida posiblemente por efecto de adsorción del compuesto de degradación a los grupos silanol del capilar.

Conforme pasa el tiempo de muestreo, el pico que tiene tiempo de migración aproximadamente de 6 minutos incrementa su tamaño, después de tres horas desaparece como anión y se presentan dos nuevos picos a los 3 y 4 minutos aumentado el tamaño de sus áreas y el de su movilidad ya que después de las 5 horas se tienen tiempos de migración más cortos, puede que esto se deba al fenómeno de adsorción del fármaco.

Debido al comportamiento que presenta el fármaco y con la rapidez con la que se descompone no fue posible obtener las concentraciones a través del tiempo con la suficiente confianza, para realizar el estudio de la cinética de descomposición.

Observando los electroferogramas de la fig 11 obtenidos del análisis realizado a una temperatura de 37°C se puede apreciar que hay dos picos de descomposición los cuales se van definiendo conforme transcurre el tiempo, después de las dos horas los productos de descomposición se observan antes que el FEO.

---

El comportamiento del clorambucilo en estas condiciones es similar al estudio realizado a 20°C, con respecto al tiempo del FEO y la descomposición del fármaco.

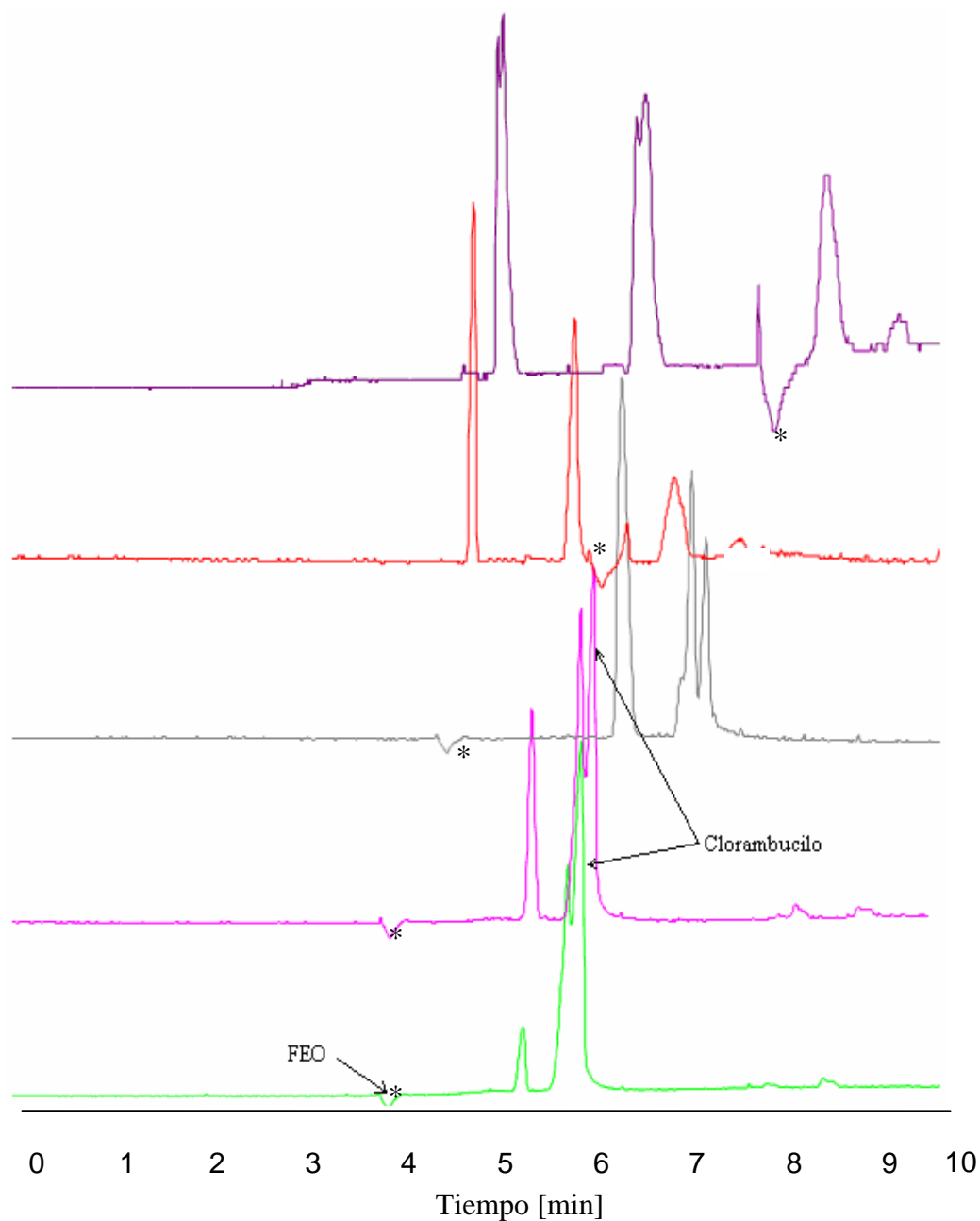
Para 60°C el comportamiento es similar, la degradación del fármaco es inmediata ya que como se observa en los electroferogramas de la fig 12 se puede apreciar la descomposición, la cual se observa a los diez minutos.

En esta parte experimental considerando los electroferogramas para las tres temperaturas de trabajo se pueden observar distintos picos que podrían ser de productos de descomposición, sin embargo; no se conocen con certeza de que productos de descomposición se puede tratar.

Basándonos en los resultados obtenidos podemos decir que bajo estas condiciones de estudio el clorambucilo no es estable.

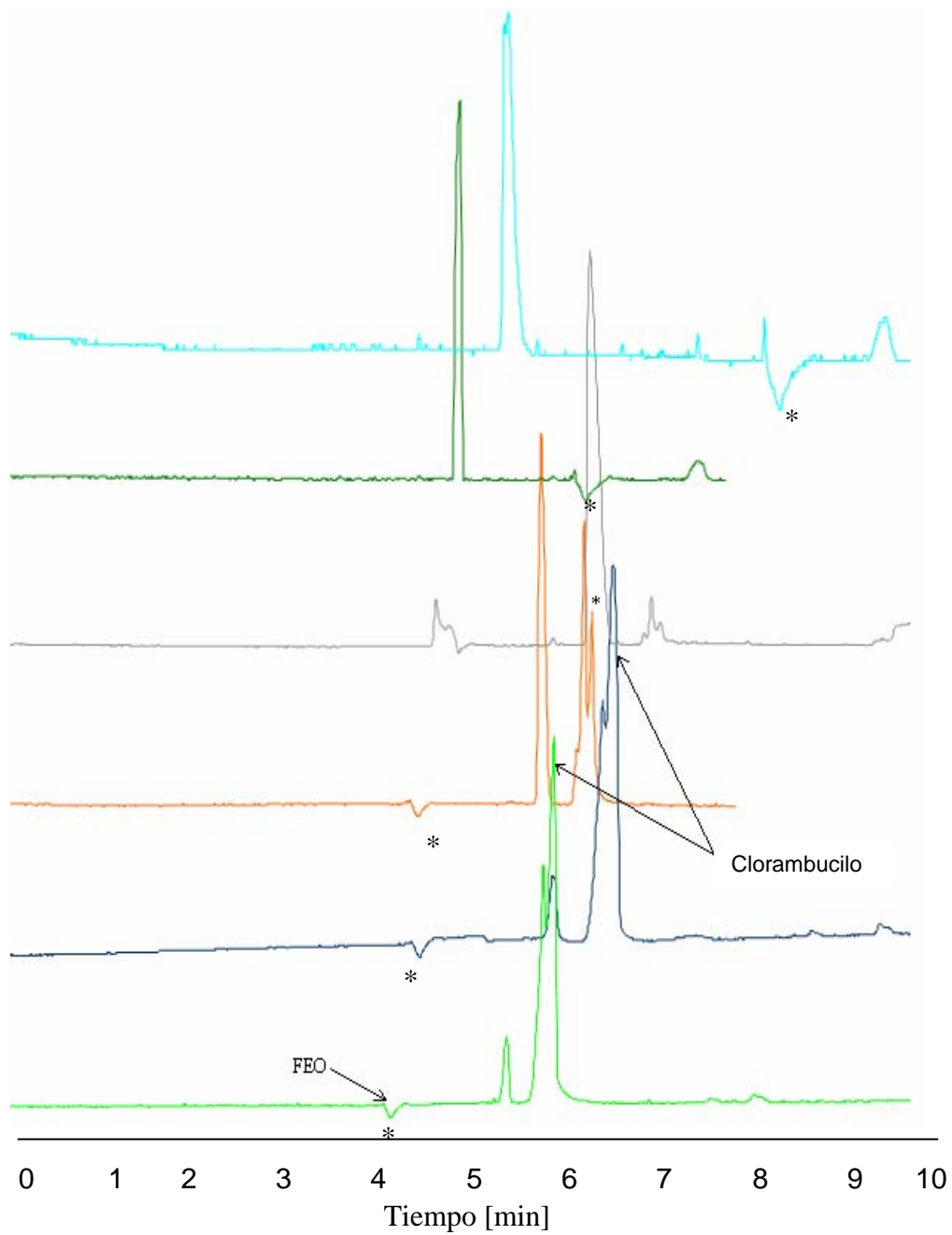
Debido al comportamiento que presenta el fármaco en estas condiciones no fue posible obtener una curva patrón, y de esta manera comparar el comportamiento de la cinética de descomposición del mismo.

Debemos tener en cuenta que con el tiempo el pH disminuye por lo tanto, el FEO no es constante, ya que cambios en el pH promueven cambios también en la movilidad de las especie.



<span style="color: green;">█</span> Tiempo inicial	<span style="color: red;">█</span> 3 horas
<span style="color: magenta;">█</span> 30 minutos	<span style="color: purple;">█</span> 5 horas
<span style="color: grey;">█</span> 2 horas	

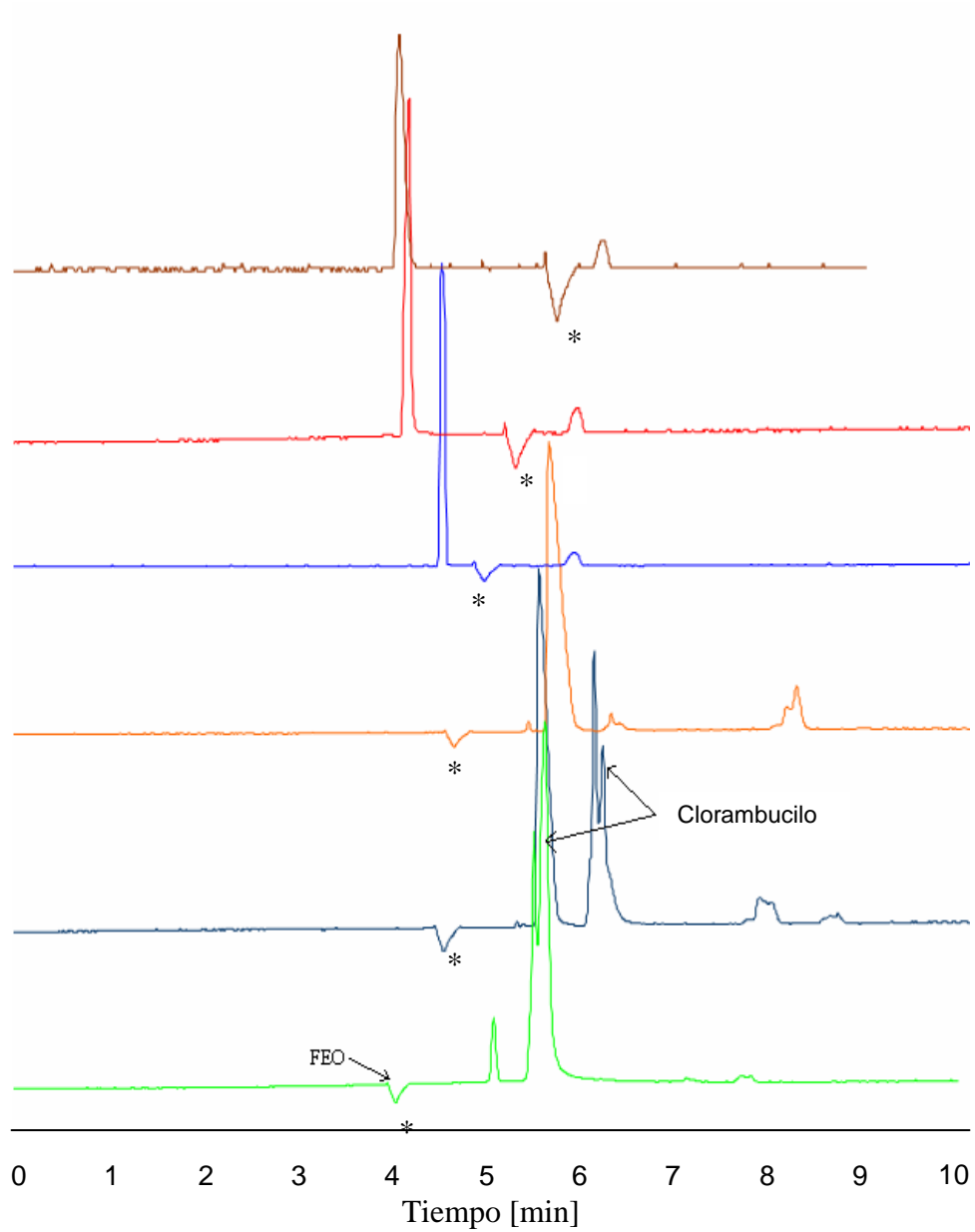
Fig 10. Electroferogramas del clorambucilo de pH 5 a 20°C. En donde \* es el flujo electroosmótico (FEO).



<span style="color: green;">█</span> Tiempo inicial	<span style="color: grey;">█</span> 2 horas
<span style="color: blue;">█</span> 10 minutos	<span style="color: darkgreen;">█</span> 4 horas
<span style="color: orange;">█</span> 20 minutos	<span style="color: cyan;">█</span> 8 horas

Fig 11. Electroferogramas del clorambucilo de pH 5 a 37°C. En donde \* flujo electroosmótico (FEO).





<span style="color: green;">█</span> Tiempo inicial	<span style="color: blue;">█</span> 1 hora
<span style="color: darkblue;">█</span> 10 minutos	<span style="color: red;">█</span> 3 horas
<span style="color: orange;">█</span> 20 minutos	<span style="color: brown;">█</span> 6 horas

Fig 12. Electroferogramas del clorambucilo de pH 5 a 60°C. En donde \* flujo electroosmótico (FEO).

---

---

En los electroferogramas de pH 5, se puede observar que los picos de descomposición disminuyen a medida que aumenta la temperatura, posiblemente debido a que al incrementar la temperatura, y sólo se detectan los picos de dichos productos de descomposición con mayor estabilidad en cuanto a la temperatura y pH.

## **8.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE pH 7**

### **8.2.1 Resultados de pH 7 a 20°C**

Para el estudio del clorambucilo a pH 7 y una temperatura de 20°C se observó un pico definido el cuál fue reproducible experimentalmente, esto se puede apreciar en los electroferogramas de la fig 13, así mismo podemos ver en la tabla 1, el tiempo de migración del FEO fue de 4.2 minutos en promedio y la señal del clorambucilo se puede observar en un tiempo de 6.3 minutos la cual se mantuvo constante en esta parte experimental.

Tomando en cuenta los valores obtenidos de la movilidad efectiva y el coeficiente de variación (C. V) calculado con la **ec. 6** que es aceptable para métodos fisicoquímicos sí es menor al 3%, podemos observar que no hay una variación grande, lo cuál nos indica que el fármaco es estable bajo estas condiciones de trabajo, por esta razón no se observa la descomposición del mismo en los electroferogramas presentados, con una ligera variación en las áreas esto muy posiblemente al modo de integración del software del equipo ya que como se aprecia en los electroferogramas de la fig 13 estos cambios no son muy significativos, pero el sistema en algunos casos no toma el valor total del área sino que la integración se lleva a cabo en partes debido a la presencia de pequeños hombros.

---

Sin embargo, en esta parte es importante resaltar que el pH y la temperatura de 20°C son adecuados, ya que nos permite monitorear el fármaco sin observar una descomposición notable.

$$C.V = \left( \frac{desvSTD}{\bar{X}} \right) \times 100 \qquad \text{Ec. 6}$$

donde;

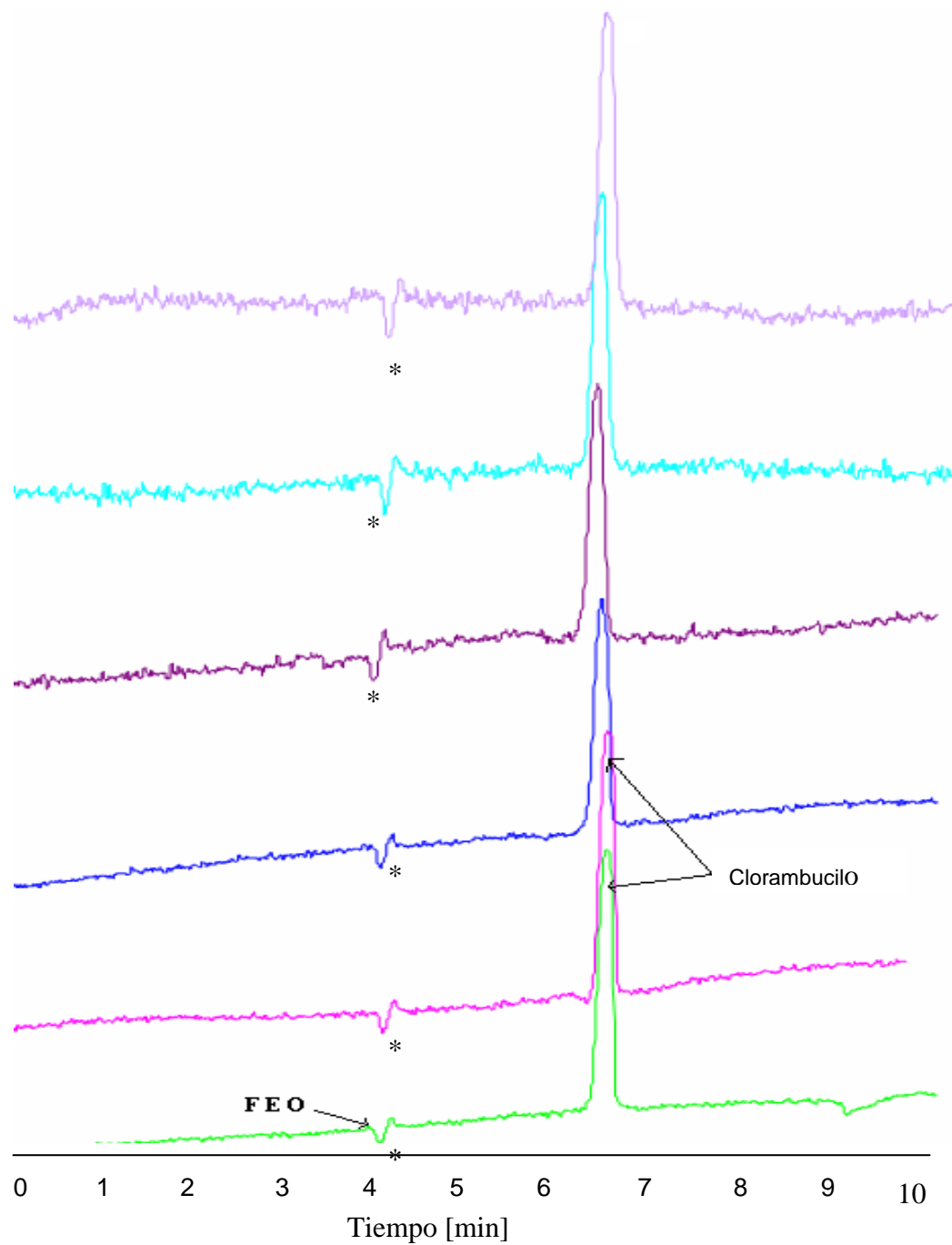
C. V = Coeficiente de Variación

Desv STD = del tm del CHL / tm del FEO

$\bar{X}$  = del tm del CHL / tm del FEO

				C.V
pH 7 a 20°C	t de migración FEO [min]	t migración CHL [min]	mov efect CHL [cm <sup>2</sup> / V· min]	tm <sub>CHL</sub> /tm <sub>FEO</sub> [min]
	prom	prom		
<b>t inicial</b>	4.2	6.5	-0.0126	1.5476
<b>30min</b>	4.3	6.5	-0.0118	1.5116
<b>1Hr</b>	4.1	6.3	-0.0128	1.5366
<b>2 Hrs</b>	4.1	6.2	-0.0124	1.5122
<b>3Hrs</b>	4.1	6.0	-0.0116	1.4634
<b>4Hrs</b>	4.4	6.3	-0.0103	1.4318
<b>5Hrs</b>	4.3	6.2	-0.0107	1.4419
<b>6Hrs</b>	4.2	6.1	-0.0111	1.4524
<b>8Hrs</b>	4.3	6.2	-0.0107	1.4419
<b>10Hrs</b>	4.3	6.3	-0.0111	1.4651
			prom	1.480
			desvest	0.0426
			C. V	2.843

Tabla1. Resultados de pH 7 a 20°C. En donde; (FEO) es el flujo electroosmótico y (CHL) es el clorambucilo.



<span style="color: green;">█</span> Tiempo inicial	<span style="color: purple;">█</span> 5 horas
<span style="color: magenta;">█</span> 30 minutos	<span style="color: cyan;">█</span> 8 horas
<span style="color: blue;">█</span> 1 hora	<span style="color: darkblue;">█</span> 10 horas

Fig 13. Electroferogramas del clorambucilo de pH 7 a 20°C. En donde Electrosmótico (FEO).

---

---

### 8.2.2 Resultados de pH 7 a 37°C

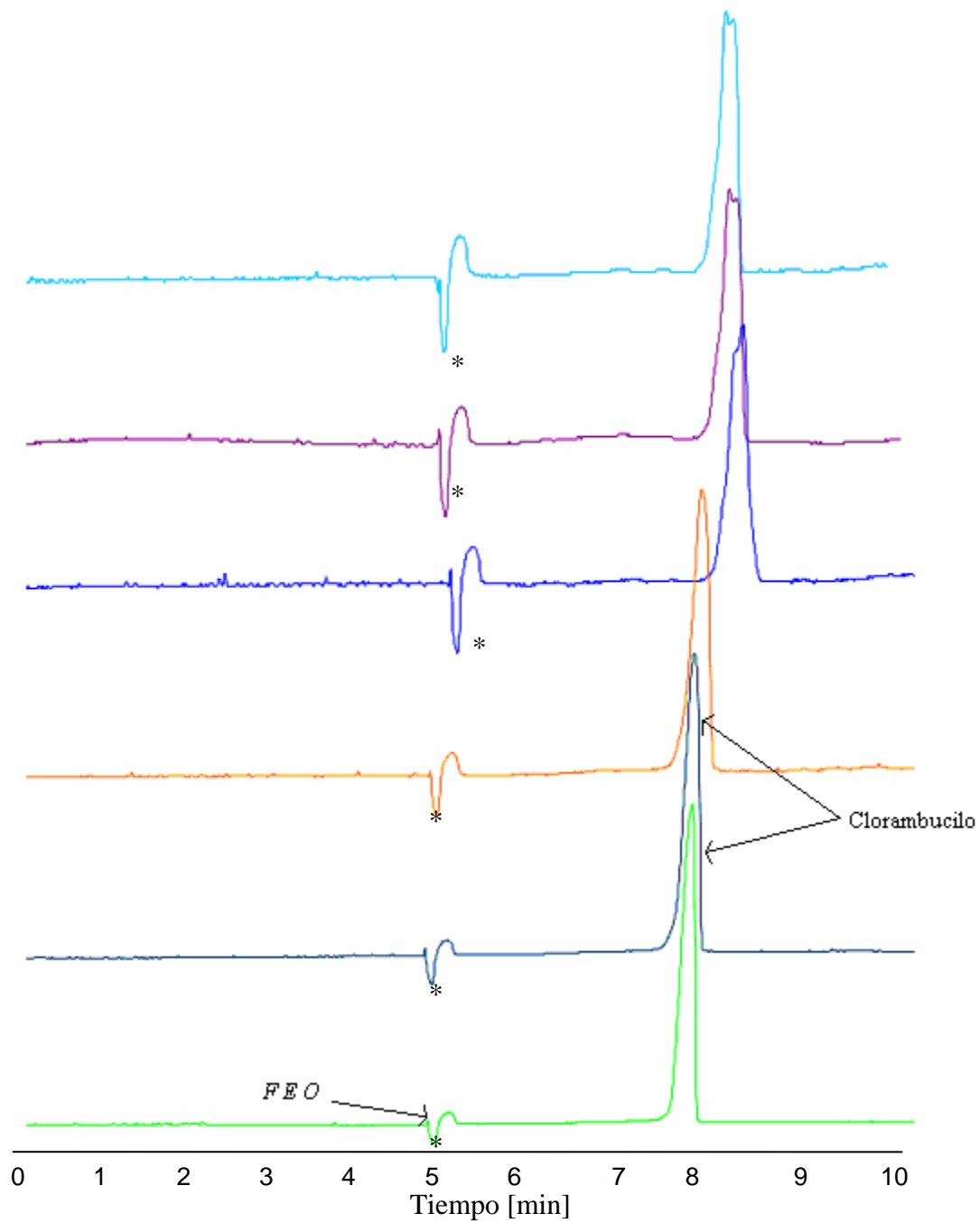
Para la temperatura de 37°C al comenzar el estudio se puede observar en los electroferogramas de la fig 14 que el pico del fármaco es uno sólo, hasta después de una hora en donde se comienza a ver un pequeño hombro cuyos valores están reportados en la tabla 2 por esta razón no hay valores en el inicio de la misma si no hasta una hora después.

En esta parte no hay un cambio significativo en el comportamiento del clorambucilo ya que como se puede ver en la tabla 2 el C. V es de 0.9753 lo que nos indica que no hay una variación muy significativa en la movilidad, ni del pico de degradación desconocido ya que el tiempo en el que estos presentan señal se mantiene prácticamente constante al transcurrir las 10 horas de monitoreo obteniendo así un valor de 8.2 en promedio, es importante mencionar que sólo hubo un pequeño cambio después de la muestra tomada a las 5 horas ya que se encontró una variación en el área del clorambucilo, sin embargo el tiempo del FEO que fue en promedio de 5.2 no varió excepto en la intensidad de la señal que este presenta haciéndose un poco más intensa pero sin una variación significativa en lo que se refiere al tiempo.

Se observa que al incrementar temperatura la señal del FEO se afecta ya que su área aumenta; esto nos indica que probablemente existe un producto de descomposición del fármaco que tiene un tiempo de migración parecido al del FEO.

pH 7 a 37°C	picos de degradación desconocidos			picos del CHL			C.V
	t de migración FEO [min]	t migración pico desc [min]	mov efect pico desc [cm <sup>2</sup> /V·min]	t migración CHL [min]	área CHL	mov efect CHL [cm <sup>2</sup> /V·min]	tm <sub>CHL</sub> /tm <sub>FEO</sub> [min]
	prom	prom		prom			
<b>t inicial</b>	5.1	-	-	7.8	286905.0	-0.0103	1.5326
<b>10min</b>	5.1	-	-	7.8	203258.0	-0.0102	1.5297
<b>20min</b>	5.1	-	-	7.9	150740.5	-0.0101	1.5269
<b>30min</b>	5.2	-	-	7.9	48361.0	-0.0100	1.5285
<b>1Hr</b>	5.3	8.1	-0.0098	8.2	43529.5	-0.0104	1.5377
<b>2 Hrs</b>	5.3	8.0	-0.0097	8.0	29121.5	-0.0102	1.5165
<b>3Hrs</b>	5.4	8.3	-0.0097	8.4	33231.0	-0.0103	1.5475
<b>4Hrs</b>	5.4	8.3	-0.0097	8.4	31823.5	-0.0103	1.5463
<b>5Hrs</b>	5.4	8.3	-0.0096	8.4	34181.0	-0.0103	1.5517
<b>6Hrs</b>	5.5	8.6	-0.0098	8.6	38056.0	-0.0106	1.5678
<b>8Hrs</b>	5.4	8.4	-0.0096	8.4	34974.5	-0.0104	1.5614
<b>10Hrs</b>	5.5	8.4	-0.0096	8.5	35861.0	-0.0104	1.5421
						prom	1.5407
						desvest	0.015
						C.V	0.9753

Tabla 2. Resultados de pH 7 a 37°C. En donde; (FEO) es el flujo electroosmótico, y (CHL) es el cloramucilo.



<span style="color: green;">█</span> Tiempo inicial	<span style="color: blue;">█</span> 1 hora
<span style="color: darkblue;">█</span> 10 minutos	<span style="color: purple;">█</span> 5 horas
<span style="color: orange;">█</span> 20 minutos	<span style="color: cyan;">█</span> 8 horas

Fig 14. Electroferogramas del clorambucilo de pH 7 a 37°C. En donde \* flujo electroosmótico (FEO).



---

---

Como se muestra en los electroferogramas antes de la primera hora, el pico del clorambucilo está definido, después de este tiempo se siguió el estudio hasta las diez horas en las cuáles se pudo observar que no hubo una descomposición notoria basándonos en los electroferogramas con alturas similares, lo que habla de picos con áreas similares y en los valores numéricos reportados anteriormente.

### **8.2.3 Resultados de pH 7 a 60°C**

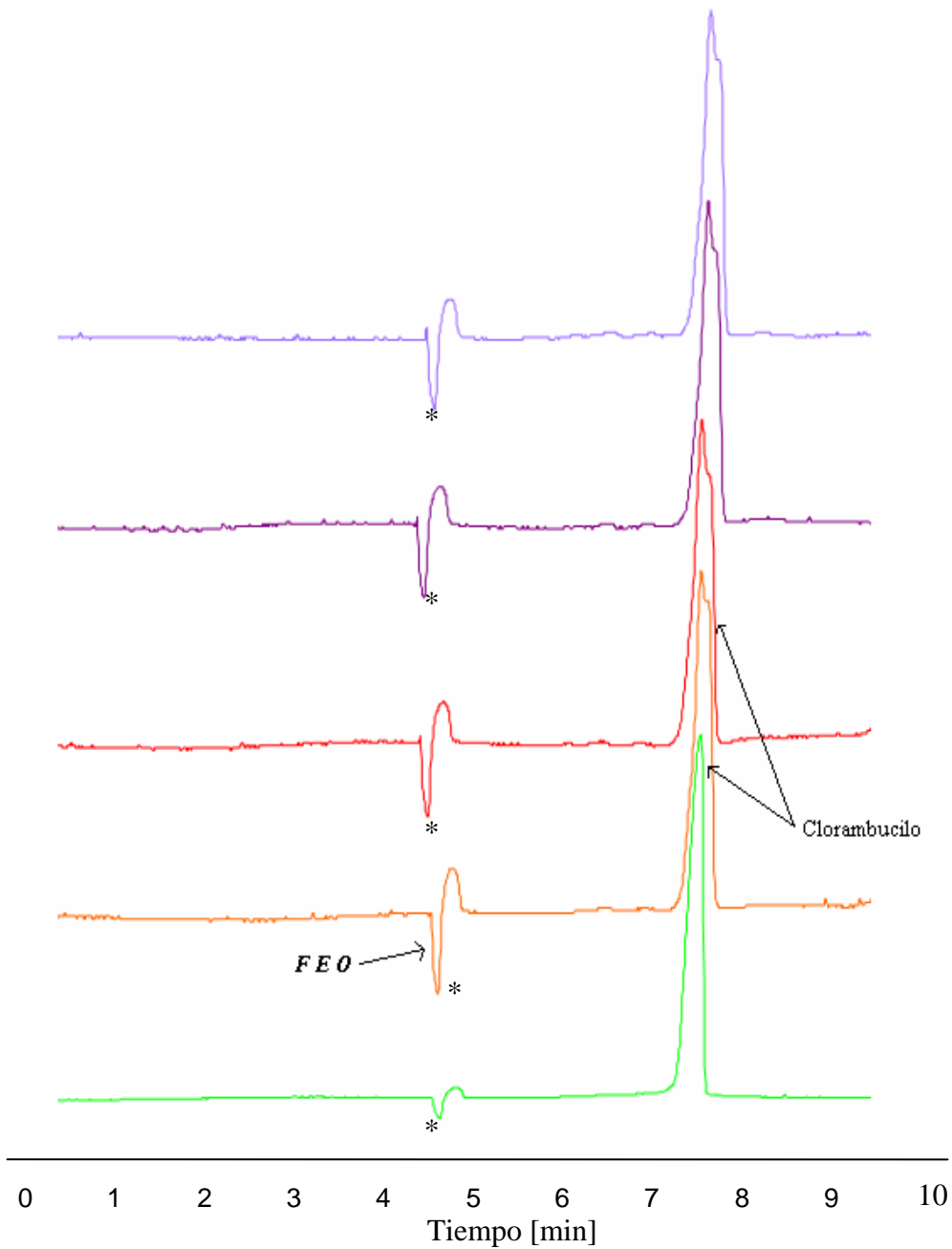
En los electroferogramas de la fig 15 se puede apreciar que hay una descomposición del fármaco a los 20 minutos después de haber comenzado el experimento, así como un pico de descomposición desconocido a los 10 minutos, un incremento en el área conforme pasa el tiempo, lo cual indica que el fármaco se descompone.

Se pueden apreciar dos picos no muy definidos de los cuales uno de ellos es el clorambucilo y el otro un producto de descomposición desconocido, para el FEO se puede ver que no hubo una variación con respecto al tiempo pero si en el área, (puede ser que uno de los productos presente señal al mismo tiempo y este es muy notorio al comenzar el monitoreo del experimento) ya que como se observa en el electroferograma de la fig 15 este presenta una señal más grande, comparando estos resultados con los electroferogramas de las figuras 13 y 14 se puede apreciar que el pico o la señal que se presenta junto con el FEO no es muy evidente, lo cual indica que la temperatura en esta parte si influye con respecto a la velocidad con la que se descompone el fármaco.

En cuanto a la movilidad efectiva del pico de descomposición del clorambucilo se puede ver en la tabla 3 que no hay una variación considerable, tomando en cuenta el valor obtenido del coeficiente de variación.

pH 7 a 60°C	picos de degradación desconocidos			picos del CHL				C.V
	t de migración FEO [min]	t migración pico desc [min]	mov efect pico desc [cm <sup>2</sup> / V·min]	t migración CHL [min]	área CHL	desvest del CHL	mov efect CHL [cm <sup>2</sup> / V·min]	tm <sub>CHL</sub> /tm <sub>FEO</sub> [min]
	prom	prom		prom	prom			
<b>t inicial</b>	4.5	-	-	6.6	36738.5	0.0351	-0.0106	1.4678
<b>10 min</b>	4.8	6.6	-0.0097	6.7	39389.0	2.5415	-0.0088	1.3897
<b>20 min</b>	4.6	6.6	-0.0097	6.7	38601.5	2.5397	-0.0101	1.4461
<b>30 min</b>	4.8	6.7	-0.0100	6.7	39733.5	2.5375	-0.0092	1.4143
<b>1 Hr</b>	4.7	6.6	-0.0099	6.7	40897.5	2.5289	-0.0091	1.4074
<b>2 Hrs</b>	4.7	6.6	-0.0099	6.6	41419.0	2.5199	-0.0092	1.4083
<b>3 Hrs</b>	4.7	6.6	-0.0098	6.7	41171.0	2.5355	-0.0092	1.4079
<b>4 Hrs</b>	4.8	6.7	-0.0100	6.7	41196.0	2.5276	-0.0092	1.4119
<b>5 Hrs</b>	4.8	6.8	-0.0100	6.8	41640.0	2.5409	-0.0091	1.4104
<b>6 Hrs</b>	4.8	6.8	-0.0100	6.8	41952.5	2.5379	-0.0094	1.4299
<b>8 Hrs</b>	4.9	7.0	-0.0097	7.0	42130.0	2.6341	-0.0094	1.4393
<b>10 Hrs</b>	4.9	6.9	-0.0098	7.0	42876.5	2.5904	-0.0092	1.4260
							prom	1.4215
							desvest	0.0213
							C.V	1.5015

Tabla 3. Resultados de pH 7 a 60°C. En donde; (FEO) es el flujo electroosmótico y (CHL) es el clorambucilo.



<span style="color: green;">█</span> Tiempo inicial	<span style="color: purple;">█</span> 5 horas
<span style="color: orange;">█</span> 20 minutos	<span style="color: grey;">█</span> 10 horas
<span style="color: red;">█</span> 3 horas	

Fig 15. Electroferogramas del clorambucilo de pH 7 a 60°C. En donde \* flujo electroosmótico (FEO).

---

---

Analizando los resultados obtenidos a pH 7, podemos considerar que el analito es más estable por ello los cambios que genera la temperatura sobre el fármaco son notables, comparando los resultados en los electroferogramas de las figuras 13, 14 y 15 respectivamente, podemos observar que no hay un cambio significativo en el tiempo de migración de FEO, pero sí en la intensidad del pico así como su área, con respecto al clorambucilo a una temperatura de 20°C se puede observar solamente un pico lo que nos indica que no hay una descomposición en comparación con la temperatura de 37°C y 60°C, considerando que el fármaco a estas condiciones presenta la mejor estabilidad.

### **8.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE pH 9.2**

#### **8.3.1 Resultados de pH 9.2 a 20°C**

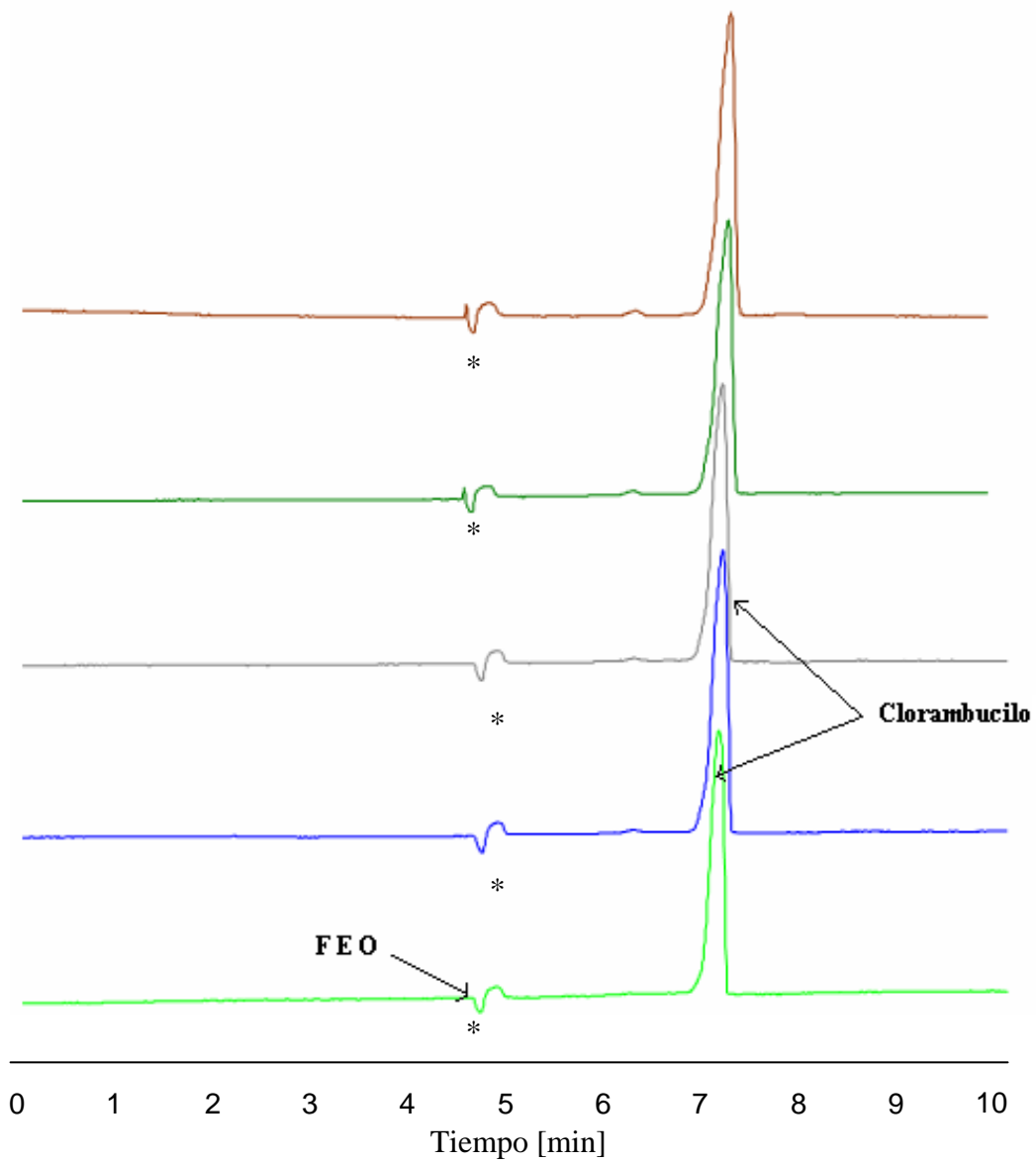
De acuerdo a estudios anteriores sobre el clorambucilo se sabe que las condiciones de trabajo más óptimo son a un pH 9.2 con una temperatura de 20°C, en los electroferogramas obtenidos podemos ver que el pico que se observa está bien definido su tiempo de migración en promedio es de 7.35, el cuál corresponde a la curva de calibración de estudios realizados anteriormente <sup>40</sup> el tiempo de migración del FEO en promedio es de 4.8 (valor obtenido de la tabla 4).

En los electroferogramas de la fig 16 se puede ver que el tiempo de migración que es de 7.3 minutos y el FEO no cambian, no hay variación en la forma que presenta la señal del clorambucilo aún después de haber transcurrido las 10 horas del monitoreo de esta parte experimental.

Solamente hay un ligero cambio en el tamaño de las áreas las cuales aumentan conforme transcurre el tiempo (valores reportados en la tabla 4).

pH 9.2 a 20°C	pico del CHL					C.V
	t de migración FEO [min]	t migración CHL [min]	área CHL	desvest del CHL	mov efect del CHL [cm <sup>2</sup> /V·min]	tm <sub>CHL</sub> /tm <sub>FEO</sub> [min]
	prom	prom				
<b>t inicial</b>	4.8	7.2	217281.0	0.0116	-0.0101	1.4856
<b>30 min</b>	4.9	7.2	221401.5	0.0064	-0.0101	1.4868
<b>1 Hr</b>	4.9	7.2	226347.0	0.0064	-0.0101	1.4863
<b>2 Hrs</b>	4.9	7.2	224057.0	0.0026	-0.0101	1.4882
<b>3 Hrs</b>	4.8	7.2	222414.0	0.0113	-0.0102	1.4893
<b>4 Hrs</b>	4.8	7.2	222295.5	0.0085	-0.0102	1.4909
<b>5 Hrs</b>	4.9	7.3	231268.0	0.1945	-0.0103	1.5057
<b>6 Hrs</b>	4.9	7.5	241860.5	0.0057	-0.0105	1.5240
<b>8 Hrs</b>	4.9	7.5	237096.0	0.0445	-0.0105	1.5205
<b>10 Hrs</b>	4.9	7.5	241398.0	0.0318	-0.0105	1.5210
					prom	1.4998
					desv	0.0162
					CV	1.083

Tabla 4. Resultados de pH 9.2 a 20°C. En donde; (FEO) es el flujo electrosmótico y (CHL) es el clorambucilo.



<span style="color: red;">█</span> Tiempo inicial	<span style="color: green;">█</span> 6 horas
<span style="color: blue;">█</span> 3 horas	<span style="color: orange;">█</span> 10 horas
<span style="color: grey;">█</span> 4 horas	

Fig 16. Electroferogramas del clorambucilo de pH 9.2 a 20°C. En donde \* flujo electroosmótico (FEO).

---

---

### 8.3.2 Resultados de pH 9.2 a 37 °C

A 37°C en los electroferogramas de la fig 17 se puede ver que la forma del FEO no está bien definida esto a que probablemente un producto de descomposición del clorambucilo presenta señal en ese tiempo que es de 5.1 (tabla 5), conforme transcurre el tiempo se puede ver que este producto que no esta bien definido se va acercando al FEO, incluso se observa que a las 10 horas es más abundante.

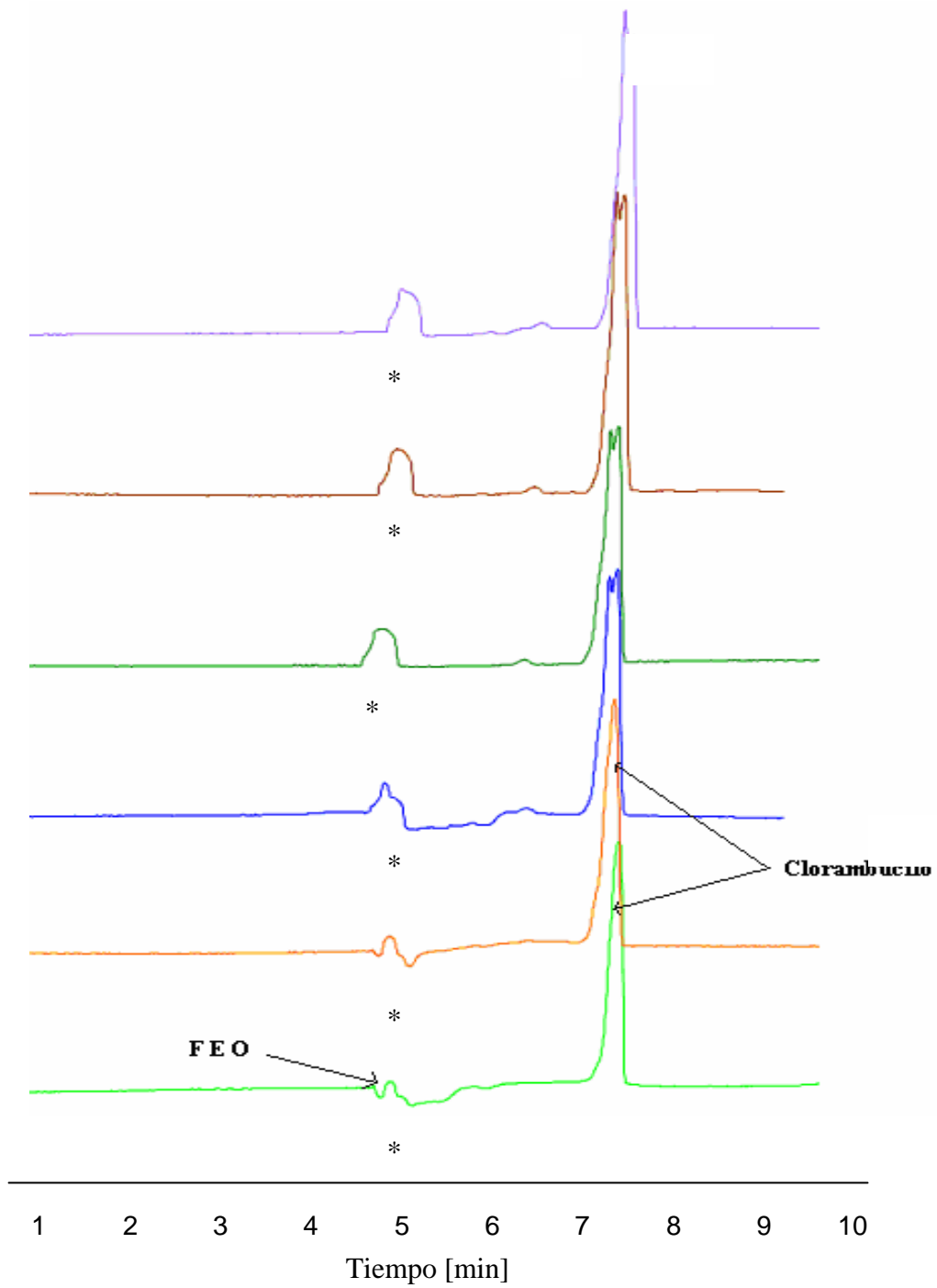
En la tabla 5 no hay valores en el pico del producto de degradación desconocido ya que como podemos apreciar en los electroferogramas este aparece después de los 30 minutos de haber comenzado la experimentación, las áreas de los picos cambian, en el caso del pico desconocido va aumentando y en el pico del clorambucilo va disminuyendo conforme pasa el tiempo, esto nos habla de que la temperatura influye en la descomposición del fármaco; ya que estos resultados demuestran que hay formación de uno de los productos de descomposición que está neutro a este pH.

En esta parte no hubo una variación con respecto al tiempo de migración del clorambucilo, ni del pico desconocido, ya que estos salieron en un tiempo de 7.5 en los dos casos y se mantuvieron constantes durante la experimentación, en cuanto a la movilidad efectiva (reportada en la tabla 5) podemos ver que no hubo una variación significativa.

pH 9.2 a 37°C	picos de degradación desconocidos			picos del CHL			C.V
	t de migración FEO [min]	t migración pico desc [min]	mov efect pico desc [cm <sup>2</sup> / V·min]	t migración CHL [min]	desvest del CHL	mov efect CHL [cm <sup>2</sup> / V·min]	tm <sub>CHL</sub> /tm <sub>FEO</sub> [min]
<b>t inicial</b>	5.3	-	-	7.4	0.0262	-0.0083	1.4073
<b>10 min</b>	5.2	-	-	7.4	0.0651	-0.0084	1.4170
<b>20 min</b>	5.0	-	-	7.4	0.0622	-0.0097	1.4779
<b>30min</b>	5.1	7.3	-0.0093	7.4	0.0651	-0.0096	1.4687
<b>1 Hr</b>	5.0	7.4	-0.0095	7.5	0.0000	-0.0097	1.4847
<b>2 Hr</b>	5.1	7.4	-0.0094	7.5	0.0205	-0.0096	1.4760
<b>3Hrs</b>	5.1	7.5	-0.0095	7.6	0.0262	-0.0097	1.4905
<b>4 Hrs</b>	5.1	7.5	-0.0094	7.6	0.0028	-0.0096	1.4870
<b>5 Hrs</b>	5.1	7.5	-0.0094	7.6	0.0120	-0.0096	1.4898
<b>6Hrs</b>	5.1	7.4	-0.0090	7.5	0.0205	-0.0092	1.4593
<b>8 Hrs</b>	5.1	7.4	-0.0091	7.5	0.0735	-0.0093	1.4620
<b>10 Hrs</b>	5.0	7.3	-0.0092	7.3	0.1273	-0.0094	1.4596
						prom	1.465
						desvest	0.0272
						CV	1.8572

Tabla 5. Resultados de pH 9.2 37°C. En donde; (FEO) es el flujo electroosmótico y (CHL) es el clorambucilo.





■ Tiempo inicial	■ 4 horas
■ 20 minutos	■ 6 horas
■ 1 hora	■ 10 horas

Fig 17. Electroferogramas del clorambucilo de pH 9.2 a 37°C. En donde \* flujo electroosmótico (FEO).

---

---

### 8.3.3 Resultados de pH 9.2 a 60°C

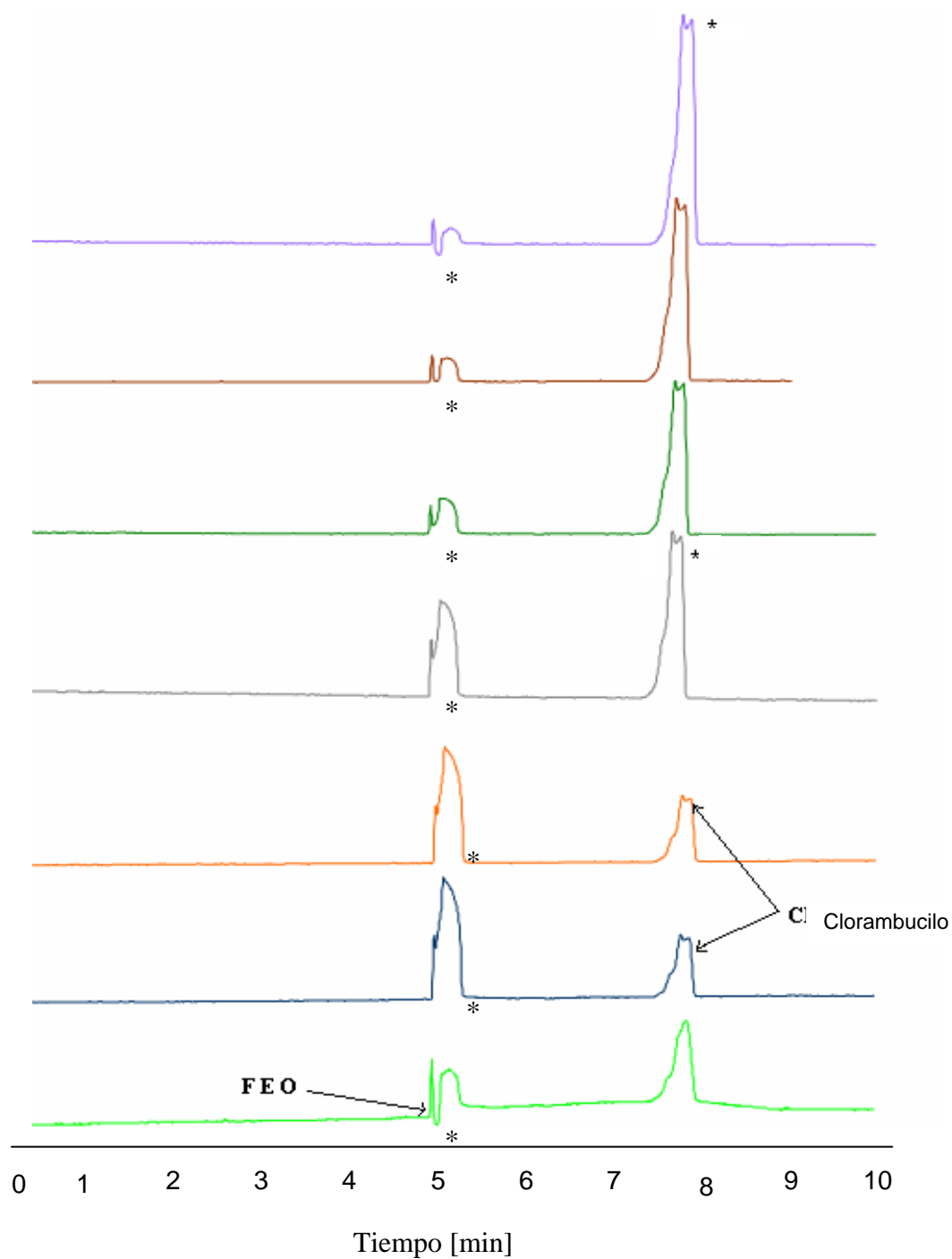
Los resultados obtenidos que se reportan en los electroferogramas de la figura 18, muestran que con el tiempo de migración del FEO que es de 5.2 minutos (tabla 6) aparece una señal que es un producto de descomposición del clorambucilo, como se puede apreciar en los electroferogramas el área no es reproducible ya que está es una señal grande al inicio y conforme transcurre el tiempo esta señal va desapareciendo, después de las dos horas se aprecia un cambio significativo.

Las condiciones del sistema en las que se encuentra el fármaco en esta parte experimental son en un medio básico, lo cual provoca que se forme el anión, por lo tanto, el pico de este saldrá después del FEO; por esta razón, la señal que se veía con el FEO disminuye y aumenta el pico del producto desconocido así como el del clorambucilo, los cuales salen en un tiempo de 7.8 y 8.0 (tabla 6) minutos respectivamente incrementándose el área de los dos picos, pero sin que estos se separen por completo.

Al aumentar la temperatura la reacción es más rápida, lo cual provoca que se formen los productos más estables con respecto a la degradación del fármaco (en este caso el anión fig 9 C) por las condiciones del sistema.

pH 9.2 a 60°C	picos de degradación desconocidos				picos del CHL			C.V
	t de migración FEO [min]	t migración pico desc [min]	área pico desc	mov efect pico desc [cm <sup>2</sup> / V·min]	t migración CHL [min]	desvest del CHL	mov efect CHL [cm <sup>2</sup> / V·min]	tm <sub>CHL</sub> /tm <sub>FEO</sub> [min]
<b>t inicial</b>	5.2	-	-	-	7.9	0.0343	-0.0099	1.5258
<b>10 min</b>	5.2	7.9	27476.0	-0.0097	8.0	0.0325	-0.0100	1.5256
<b>20 min</b>	5.2	7.9	31889.0	-0.0097	8.0	0.0120	-0.0101	1.5281
<b>30min</b>	5.2	7.8	35607.5	-0.0098	7.9	0.0410	-0.0099	1.5271
<b>1 Hr</b>	5.1	7.6	47752.7	-0.0098	7.7	0.2838	-0.0100	1.5137
<b>2 Hr</b>	5.0	7.5	71400.7	-0.0099	7.6	0.4237	-0.0103	1.5134
<b>3Hrs</b>	5.0	7.6	85037.3	-0.0098	7.6	0.4463	-0.0104	1.5125
<b>4 Hrs</b>	5.0	7.6	99578.3	-0.0099	7.6	0.4475	-0.0104	1.5141
<b>5 Hrs</b>	5.1	7.6	109930.0	-0.0099	7.7	0.4521	-0.0099	1.5161
<b>6Hrs</b>	5.1	7.6	121262.7	-0.0099	7.7	0.4740	-0.0099	1.5218
<b>8 Hrs</b>	5.0	7.6	130710.0	-0.0100	7.7	0.4771	-0.0105	1.5269
<b>10 Hrs</b>	5.0	7.6	153182.3	-0.0101	7.7	0.4870	-0.0105	1.5280
								prom 1.5211
								desvest 0.0065
								C.V 0.4302

Tabla 6. Resultados de pH 9.2 a 60°C. En donde; (FEO) es el flujo electrosmótico y (CHL) es el clorambucilo.



<span style="color: green;">█</span> Tiempo inicial	<span style="color: darkgreen;">█</span> 4 horas
<span style="color: blue;">█</span> 10 minutos	<span style="color: brown;">█</span> 6 horas
<span style="color: orange;">█</span> 20 minutos	<span style="color: grey;">█</span> 10 horas
<span style="color: grey;">█</span> 2 horas	

Fig 18. Electroferogramas del clorambucilo de pH 9.2 a 60°C. En donde \* flujo electrosmótico (FEO).

---

A pH 9.2, el clorambucilo está completamente ionizado, ya que sus grupos funcionales (la amina y el carboxilo) adquieren carga, por esta razón el analito llega a un equilibrio, a causa de esto se puede conocer la consecuencia directa que tiene la temperatura sobre el fármaco.

Se puede observar que a 60°C el pico mostró un doblete, el cuál indicó el inicio de la descomposición del clorambucilo; pero debemos recordar que la temperatura a la cual se descompone es a partir de 8°C, es muy probable que la señal que se observa no es del analito en estudio, hay un incremento en el FEO, en su área y forma del pico que nos muestra la descomposición del clorambucilo.

En esta parte experimental la temperatura, es un factor primario para la formación de los diferentes productos de descomposición.

---

---

## 9.0 CONCLUSIONES

Los objetivos planteados para este trabajo se llevaron a cabo ya que se pudo determinar la descomposición del clorambucilo a las diferentes temperaturas y valores de pH propuestos.

A pH 5 el clorambucilo es muy inestable, recordemos que el comportamiento del mismo es muy similar en los tres casos por lo tanto, se puede decir que bajo estas condiciones la temperatura es un factor secundario y el clorambucilo es muy inestable.

Los resultados obtenidos a pH 7 y las diferentes temperaturas nos demuestran que en el clorambucilo no hay una descomposición muy notable ya que los picos que presenta a las tres diferentes temperaturas oscilan entre 7 y 8 minutos, siendo más reproducibles a 20°C.

De acuerdo con los resultados experimentalmente obtenidos, podemos afirmar que el clorambucilo presenta la menor descomposición a un pH de 9.2 y una temperatura de 20°C, ya que después de 10 horas no se observó ningún producto de descomposición del mismo.

Con el presente trabajo se aporta conocimiento del comportamiento de la degradación del fármaco, además de plantear una alternativa más para la determinación analítica de este compuesto que servirá de base para la cuantificación de éste fármaco en muestras biológicas.

Estos resultados nos demuestran la versatilidad y la capacidad de la EC de analizar diversas sustancias en tiempo muy cortos y ante la necesidad actual de métodos de análisis rápidos representa una opción adecuada para el análisis del clorambucilo.

---

---

## 10.0 REFERENCIAS.

1. ACD Labs.
2. Aldrich. **2007-2008**. Avanzando la ciencia. Sigma Aldrich México. pp. 72, 1600.
3. Alison R. G., Erik S. M. J., Keith G. Physical properties of the complex formed between heptakis (2, 6-di-o-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin and chlorambucil.
4. Altria, K. D., *Analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis*. Vieweg Publishing, Wiesbaden. **1998**. pp. 1-176
5. Altria, K. D., Chapman and Hall. **1996**. *Capillary electrophoresis guidebook: Principles, operations, and applications*. Londres. pp. 1-349
6. Baker, D. R. **1995**. *Capillary Electrophoresis. Techniques in Analytical Chemistry Series*. John Wiley & Sons. N. Y.
7. Bioquímicos. Reactivos y Kits. p. 1921.
8. Blanc, T., Schaufelberger, D. E. and Guzman, N.A. **1997**. Analytical Instrumentation Handbook. 2<sup>nd</sup> ed., Galen Wood Edwing, Marcel Dekker, Inc. Las Vegas.
9. Bohinski, R. C. **1998**. *Bioquímica*. 5<sup>a</sup> ed. Pearson Educación. México. pp. 56-59.
10. Budavari, S., J. O'Nerl, M., Smith, A., **1989**. *The Merck Index*. 11<sup>a</sup> ed. Merck and Co. Rahway, N. J., USA. p. 318, 344, 735, 1188.
11. Camillery, P. **1997**. *Capillary electrophoresis: theory and practice*. 2<sup>a</sup> ed. CRC Press, Boca Ratón. Fl. pp. 1-576
12. Chao, J., Meng, D., Li, Xu. H. and Huang, S. **2004**. Spectrochimica Acta Part A. (60): 729–734.
13. Chatterji, D. R., Yeager, J. G. **1982**. Kinetics of Chlorambucil Hydrolysis Using High-Pressure Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. (71):50-54.
14. Davies, I. D., Allanson, J. P., Causon, R. C., **1999**. Rapid determination of the anti-cancer drug chlorambucil (Leukeran) and its phenyl acetic acid mustard metabolite in human serum and plasma by automated solid-phase extraction and liquid chromatography –tandem mass spectrometry. *J. chrom.* , (732): 173 – 184.

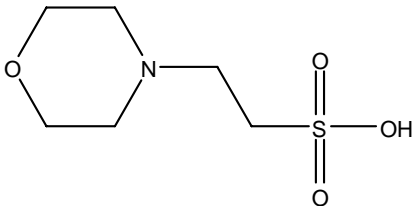
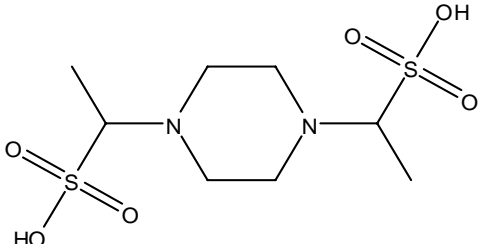
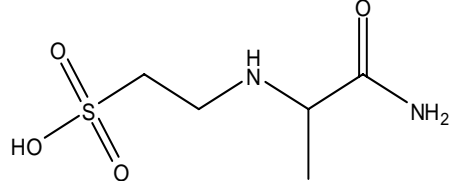
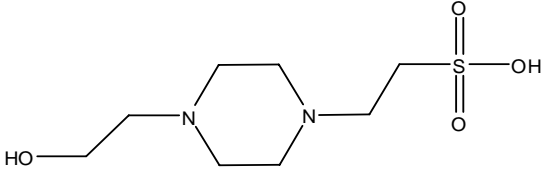
- 
15. Dulal C., Russell L., Joseph F. **1982**. Kinetics of Chlorambucil Hidrolysis Using High-Pressure Liquid Chromatography Pharmacy Department. *Journal of Pharmaceutical Science*. (71) No 1: 50-54.
  16. Foret, F et al., **1993**. Capillary Zone Electrophoresis. pp. 1-395.
  17. Funasaki, N., Sumiyoshi, T., Ishikawa, S. And Neya, S. **2004**. Molecular Pharmaceutics. (1) No. 2:166-172.
  18. Gopal C. Kundu., Schullek J. R. and Wilson. **1994**. The Alkylating Properties of Chlorambucil. *Irwin Department of Chemistry and Biochemistry*, University of Colorado. (49) No. 3:621-624.
  19. Grossman, Paul D. and Colburn, J. C. **1992**. *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*. Academic Press. N. Y.
  20. Guzmán, N. A. **1993**. Capillary electrophoresis technology. *Chromatographic Science Series*. (64) Marcel Dekker. N. Y. pp. 1-83.
  21. Helger, D. **1992**. High Performance Capillary Electrophoresis: An Introduction. Hewlett Packard. France.
  22. Jandik, T et al., **1993**. Capillary zone electrophoresis of small molecules and ions. *VCH Publishers*, Cambridge. pp. 1-425.
  23. Jorgenson, J. W., Lukacs, K., D. **1981**. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal. Chem.* (53):1298-1302
  24. *Journal of pharmaceutical science*. Vol. 80, Issue 2, pp. 186-189.
  25. Khaledi, M. G., Wiley and Sons. **1998**. High performance capillary electrophoresis: Theory, techniques and applications, *Chemical analysis series*. (146):1-878.
  26. Kuhn, R. and Hoffstetter-Kuhn, S. **1993**. *Capillary electrophoresis: Principles and practices*. Edit. Springer-Verlag. Berlin. pp. 1-439.
  27. Laidler, K. J., Meiser, J. H. **2005**. *Fisicoquímica*. 2ª ed. Editorial Continental. D. F. pp. 353-395.
  28. Landers, J. P et al., **1994**. *Handbook of capillary electrophoresis*. Edit. CRC Press, Boca Ratón. pp. 147-206.
  29. Levine, I. **1996**. *Fisicoquímica*. 4ª ed. Vol II. Brooklyn College City University of N. Y. Mc Graw Hill. pp. 560-625.



- 
30. Li N., Duan, J., Chen, H. G. Chen. **2003**. Determination of the binding constant for the inclusion complex between procaine hydrochloride and  $\beta$ -cyclodextrin by capillary electrophoresis. *Talanta*. (59):19- 499.
  31. Li, S. F. Y. **1993**. Capillary electrophoresis: principles, practice and applications. *Journal of Chromatography Library*. (52):1-608.
  32. Löf, K., Hovinen, J., Reinikainen, P., Vilpo, L. M., Seppälä E. **1997**. Kinetic of Chlorambucil in vitro: effects of fluid matrix, human gastric juice, plasma proteins and red cell. *Chemico-Biological Interactions*. pp. 187-198
  33. Loftsson T., S. Bjornsdóttir, G. P., N. Bodor. **1989**. The effects of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on the solubility and stability of chlorambucil and melphalan in aqueous solution. *International Journal Pharmaceutics*, (57):63-72.
  34. Loukas, Y.L., **1997**. Evaluation of the methods for the determination of the stability constant of cyclodextrin-chlorambucil inclusion complexes. pp. 16, 275-280.
  35. Maron S. H., Lando J. B. **1987**. *Fisicoquímica Fundamental*. Ed Limusa. México. pp. 555-600.
  36. Másson, M., Loftsson, T., Jónsdóttir, S., Fridriksdóttir, H. And Petersen, D.S. **1998**. *International Journal of Pharmaceutics*. (164):45 -55.
  37. Nianbing, Li., Jianping, D., Hongqing, C., Guonan, C. **2003**. Determination of the binding constant for the inclusion complex between procaine hydrochloride and  $\beta$ -cyclodextrin by capillary electrophoresis. *Talanta* (59): 493-499.
  38. Ostergaard, J., Heegaard, N.H. **2003**. Capillary electrophoresis frontal analysis. *Electrophoresis*. (24): 2903-2914.
  39. Righetti, P. G., William, H. **1996**. Capillary electrophoresis in analytic biotechnology. CRC Press, Boca Ratón. pp. 1-576.
  40. Saavedra R. A et al., **2007**. *Determinación Analítica de complejos de inclusión por Electroforesis Capilar de Zona*. UNAM. pp. 1-60.
  41. Skoog, D. W., Holler, J. D., Crouch S. **2005**. *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª ed. Thomson. pp. 1016-1024.
  42. Terabe, S et al., **1984**. Electrokinetic separation with micellar solution and open-tubular-capillaries. *Anal. Chem.* (56):111-113.

- 
- 
43. Vindevogel, J. and Sandra, Pat. **1992**. Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography. *Chromatographic. Methods* Huthig Verlag. Germany.
  44. Weinberger, R. **2000**. Practical capillary electrophoresis. 2<sup>a</sup> ed., *Academic press*, San Diego, Sea. pp. 1-462.
  45. En: <http://www.advance-scientific.com/getfamilies>. **2007**
  46. En: <http://www.ceandcec.com>. **2007**
  47. En: <http://wwwjaveriana.edu.co/facultades/neurobioquimicas.html>. **2007**
  48. En: [http://www.matematicas.udea.co/~carlopez/cnq533/CE\\_Basics.pdf](http://www.matematicas.udea.co/~carlopez/cnq533/CE_Basics.pdf). **2007**
  49. En: <http://www.neolab.com.ar/buffer.htm>. **2007**
  50. En: <http://www.sigma-aldrich.com>. **2007**

Soluciones amortiguadoras de tipo biológico.<sup>2, 10</sup>

 <p>Ácido-2-(N-morfolino)etanosulfónico</p> <p><b>MES</b></p>	<p><b>C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>S·xH<sub>2</sub>O</b></p> <p>P.M 195.24 g/mol            pKa 6.1            rango 5.5-6.7            CAS 4432-31-9            Merck 13,5929</p>
 <p>Ácido-N,N-bis(etanensulfónico)piperazina</p> <p><b>PIPES</b></p>	<p><b>C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub></b></p> <p>P.M 302.36 g/mol            pKa 6.1            rango 6-8.5            CAS 5625-37-6            Merck 7450</p>
 <p>Ácido-N-(carbamoyl)etanosulfónico</p> <p><b>ACE</b></p>	<p><b>C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S</b></p> <p>P.M 182.20 g/mol            pKa 6.8            rango 6.1-7.5            CAS 7365-82-4            Merck 13,37</p>
 <p>Ácido-N-(etanensulfónico)-N-(hidroxi)etilpiperazina</p> <p><b>HEPES</b></p>	<p><b>C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S</b></p> <p>P.M 238.37 g/mol            pKa 6.1            rango 6-8.5            CAS 7365-45-9            Merck 4573</p>