

Trabajo Fin de Grado

Optimización y validación de metodología analítica para la determinación de principios activos en quimioterapia

Iliana Vizcaíno López



Curso 2017-2018

ELADIA PEÑA MENDEZ Y JOSÉ ELÍAS CONDE GONZÁLEZ, PROFESORES
TITULARES DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

AUTORIZAN: La presentación de la memoria adjunta titulada “Optimización y validación
de metodología analítica para la determinación de principios activos en
quimioterapia” que presenta la alumna Dña. Iliana Vizcaíno López como
proyecto de fin de grado en Química realizado durante el curso académico
2017-2018.

Y para que conste, expiden la presente autorización en La Laguna, a 10 de septiembre de
2018.



Eladia Peña Méndez



José Elías Conde González

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Introducción al tema	1
1.2 Mercaptopurina como medicamento.....	2
1.2.1 Características de la 6-MP.....	4
1.2.2 Administración del fármaco.....	5
1.3 Control de la administración del medicamento.....	6
1.4 Contaminación de las aguas.....	7
1.4.1 Legislación.....	9
1.5 Contaminantes emergentes.....	10
1.5.1 6-Mercaptopurina como contaminante emergente.....	11
1.6 Eliminación de las aguas.....	12
1.6.1 Estudio de adsorción.....	13
1.6.2 CuBTC como adsorbente.....	17
1.7 Metodologías utilizadas.....	19
2. OBJETIVO.....	24
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	26
3.1 Reactivos, disolventes y disoluciones.....	26
3.2 Material.....	26
3.3 Equipo.....	27
3.4 Reactivos.....	28
3.5 Programas informáticos.....	29
3.6 Procedimientos experimentales.....	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1 Separación cromatográfica.....	32
4.2 Calibración.....	34
4.3 Repetibilidad y reproducibilidad.....	35
4.4 Estudio de la concentración.....	36
4.5 Calibración a niveles bajos de concentración.....	37
4.6 Estudio de adsorción.....	39
4.7 Estudio de desorción.....	46
4.8 Aplicabilidad de la metodología utilizada. Muestras reales.....	47
5. CONCLUSIONES.....	51

Resumen

En el presente Trabajo de Fin de Grado se ha propuesto y optimizado una metodología analítica simple, rápida y precisa para la determinación de 6-Mercaptopurina presente en preparados farmacéuticos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). La importancia de este analito radica en el hecho de ser el componente integral del medicamento utilizado para el tratamiento de la Leucemia Linfocítica Aguda, siendo esta la neoplasia más frecuente que afecta a la población infantil.

La obtención de las condiciones óptimas para llevar a cabo la separación cromatográfica, así como la detección, es lo que ha permitido realizar un análisis cuantitativo del analito mediante HPLC. De la misma manera, se han obtenido las rectas de calibrado correspondientes y se ha realizado un estudio de repetibilidad intra e interdía.

Además, se ha considerado la 6-Mercaptopurina como un posible contaminante emergente, por lo que, se han estudiado una serie de compuestos adsorbentes que pudiesen ser útiles para solventar este problema de contaminación de las aguas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción al tema

Los tumores malignos o cancerosos se definen como una proliferación excesiva e incontrolada de células que limitan la función del organismo como consecuencia de la invasión local de órganos y tejidos. Las células consideradas “normales” dejan de dividirse al entrar en contacto con otras similares, mecanismo denominado como inhibición por contacto. Mientras que en las células cancerosas esto no ocurre, produciendo un desequilibrio en el sistema de autorregulación que limita y controla la división de las células. En consecuencia, el resultado de las alteraciones genéticas que regulan el crecimiento y la muerte celular provoca mutaciones sucesivas que conllevan a la transformación neoplásica de la célula, dando lugar a lo que se conoce comúnmente como cáncer.

La leucemia es el término utilizado para denominar a los distintos tipos de cáncer que afectan a la sangre. La leucemia linfoblástica aguda, también denominada leucemia linfocítica aguda o LLA, es uno de los cuatro tipos principales de leucemia que afecta a la sangre y a la médula ósea. Se caracteriza por producir un aumento anormal de los linfoblastos, los cuales no evolucionan a linfocitos maduros, impidiendo la fabricación de las principales células de la sangre: glóbulos rojos, glóbulos blancos o leucocitos y plaquetas, dando lugar a un sistema inmunológico vulnerable y en consecuencia incompetente frente a ciertos virus e infecciones.

A pesar de que en la infancia el cáncer presenta una baja incidencia, en los niños, la leucemia es el principal tipo de cáncer que les afecta, suponiendo el 30% de los cánceres pediátricos, siendo el 80% correspondiente, leucemias linfoblásticas agudas, seguido de tumores del sistema nervioso central y linfomas.

En España, la incidencia anual estandarizada es de 155,5 casos nuevos al año por cada millón de niños de 0-14 años, lo que supone 1100 casos nuevos al año (Losa Frías, Herrera López, Cabello García, Navas Alonso, 2016). Los avances médicos con relación a los tratamientos oncológicos infantiles han permitido una supervivencia o curación global libre de enfermedad en torno al 80% en los países más desarrollados, a pesar de ser la segunda causa de muerte infantil desde el primer año de vida hasta la

adolescencia (González Meneses, 2016). En torno al 10-20% de los pacientes fracasan en el tratamiento, por lo que resulta necesario desarrollar nuevas técnicas o estrategias que permitan conocer y seleccionar a los pacientes con un mayor riesgo de recaída.

La LLA es por tanto la neoplasia más frecuente en la infancia, caracterizada por alteraciones moleculares y traslocaciones de los cromosomas que generan una variación del pronóstico y en consecuencia del tratamiento del paciente. Un seguimiento riguroso de la enfermedad y una adaptación terapéutica continuada han permitido controlar la enfermedad de manera favorable, evitando recaídas y una vida libre de la enfermedad.

1.2. Mercaptopurina como medicamento

La mayoría de las terapias utilizadas para el tratamiento del cáncer en general, y de la LLA en particular, se basan en el principio de que las células propias del cáncer se reproducen de la misma manera que las células sanas, pero con una de las partes de su estructura modificada. Es por ello, que el objetivo del tratamiento consiste en interferir en el ciclo de reproducción celular, atacando a las células malignas de manera que no puedan continuar reproduciéndose ni tampoco recuperarse.

La capacidad de un fármaco para destruir las células cancerosas dependerá de su capacidad para detener la división celular. Generalmente, actúan provocando daños en el ADN o ARN, los cuales indican a la célula como copiarse a sí misma durante el proceso de división celular.

En 1954, fue descubierto y utilizado experimentalmente un fármaco conocido como 6-mercaptopurina en combinación con otro fármaco, el metrotexato, para el tratamiento de la leucemia, ambos diseñados a la carta. Los resultados obtenidos fueron esperanzadores, ya que supuso un aumento considerable de la esperanza de vida. Pero, antes de diseñar cualquier fármaco fue necesario conocer con rigurosa exactitud los componentes y el funcionamiento de una célula, y no fue hasta 1953 cuando se dejó clara la manera en la que se desencadenaba el ADN para que fuera posible su lectura y copia, y dado que las células requieren de ADN para dividirse, si se conseguía generar bases nuevas de ADN o procurar que las células no incluyesen bases defectuosas, entonces las células cancerosas no podrían reproducirse.

Tras un largo período de investigación y numerosos ensayos con más fracasos que victorias, en 1948 se desarrolló una variante del ácido fólico, el metrotexato, que había tenido como resultado una remisión temporal en varios casos de leucemia, pero los efectos secundarios eran devastadores.

El antimetabolito correcto fue creado cuando se sustituyó un átomo de oxígeno del anillo de purina por uno de azufre, el compuesto obtenido, 6-mercaptopurina, consiguió que la enfermedad remitiera sin causar una gran toxicidad. La combinación del metrotexato y la 6-MP supuso un gran éxito en este campo, aumentando la esperanza de vida de los casos de leucemia infantil. Sin embargo, se observó que por sí solos ningún tratamiento es suficiente para tratar la enfermedad, es por ello, que tras continuar realizando pruebas y ensayos, se llegó a la conclusión de que la combinación de diferentes tratamientos y fármacos es lo que ha permitido llegar a un índice de curación que alcanza el 80%.

La 6-Mercaptopurina o su abreviación 6-MP, es por tanto, un medicamento inmunosupresor utilizado para tratar diversas enfermedades tales como la colitis ulcerosa, un trastorno que causa inflamación y úlceras en el revestimiento del colon, la enfermedad de Crohn, una afección en la que el propio cuerpo ataca a el revestimiento interno del aparato digestivo provocando dolor, diarrea, fiebre y pérdida de peso, y ciertos tipos de cáncer, siendo el principal la leucemia linfocítica aguda.

Es un fármaco perteneciente al grupo farmacoterapéutico de las tiopurinas, siendo un componente integral del tratamiento de LLA en las fases de inducción, consolidación y mantenimiento.

Concretamente, es un profármaco que actúa como antimetabolito de las bases púricas, el cual una vez llega al interior celular da lugar a un compuesto llamado tioinosina monofosfato (TIMP) que a su vez da lugar a la tioguanosina monofosfato (TGMP). Este compuesto activo es convertido en nucleótido difosfato y trifosfato de tioguanina, los cuales son incorporados al ADN y ARN dando lugar al efecto citotóxico del fármaco.

Tal y como se ha descrito, los antimetabolitos son sustancias que guardan gran similitud con las células que se encuentran naturalmente en el interior de una célula, cuyo funcionamiento se basa en que cuando las células incorporan estas sustancias a su metabolismo, pierden la capacidad de dividirse.

Es por todo ello, que el tema principal que atañe a esta presentación es la utilización de la 6-Mercaptopurina como agente activo de un medicamento utilizado para el tratamiento de la leucemia infantil. Se describirá el modo de preparación del medicamento, el método de control de administración del fármaco y el método utilizado para detectar y cuantificar la 6-MP. Asimismo, se abordará a la 6-MP como un contaminante emergente, los posibles métodos para su eliminación de las aguas residuales y la utilización de los MOF's como compuestos adsorbentes.

1.2.1. Características de la 6-MP

Tal y como ya se ha enunciado previamente, la Mercaptopurina es un medicamento inmunosupresor de origen sintético utilizado para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, especialmente la leucemia linfocítica aguda.

Es un antimetabolito análogo al nucleósido natural hipoxantina, y al igual que ocurre con la mayoría de los análogos de la purina, la 6-MP es un profármaco, cuya estructura química se muestra en la Ilustración 1, y debe convertirse en un nucleótido a través de unas enzimas intracelulares para poder ejercer su efecto citotóxico. Dicha conversión, después de la administración oral sigue tres rutas diferentes que compiten entre sí dando como productos, ácido tiourico, nucleótidos activos tales como la 6-tioguanina y 6-metilmercaptopurina.

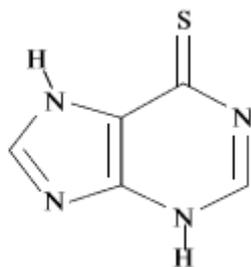


Ilustración 1. Estructura de la 6-Mercaptopurina

Se dice que presenta efecto citotóxico porque actúa predominantemente sobre las células que se dividen rápidamente, como es el caso de los linfocitos T.

Entre las características físicas que presenta este compuesto se encuentran:

Características 6-MP	
Nombre	1,7-Dihydro-6H-purine-6-thione
Fórmula	C ₅ H ₄ N ₄ S
PM(g/mol)	152,18
Pto.fusión(°C)	313
Solubilidad	Soluble en álcalis, insoluble en agua

Tabla 1. Características de la 6-Mercaptopurina

1.2.2. Administración del fármaco

El medicamento se trata de un antimetabolito no nucleosídico, que actúa como falso sustrato en la fase S del ciclo celular de los ácidos nucleicos provocando la inhibición del ARN y ADN.

En España únicamente hay comercializadas formas orales sólidas de 6-mercaptopurina bajo el nombre de Purinéthol, cuyas tabletas vienen en dosis de 50 mg. Sin embargo, dado que el medicamento está destinado principalmente al tratamiento de la LLA con fines pediátricos, la forma más común de administrarlo es mediante vía oral en forma de jarabe, aunque también puede ingerirse en forma de comprimidos.

Existe un gran problema con la administración del fármaco ya que, tal y como se ha enunciado, el medicamento viene en forma de comprimido y dado que la enfermedad afecta principalmente a la población infantil, esto genera graves problemas para los padres en el momento de la toma del medicamento. Es por ello, que para facilitar la administración del medicamento, se prepara una suspensión oral de mercaptopurina que se obtiene al mezclar los comprimidos triturados de Purinéthol con los vehículos Ora-Sweet y Ora-Plus, los cuales son utilizados como medio de disolución para preparar los jarabes pediátricos.

Las dosis habituales tanto para adultos como para niños es de 2,5 mg/kg/día o de 50 a 75 mg/m² al día. Sin embargo, la dosis y duración del tratamientos dependerá de otros factores como la naturaleza de la patología y de los administración combinada con otros agentes citotóxicos empleados simultáneamente con Purinéthol.

1.3. Control de la administración del medicamento. Estudio de la concentración

La farmacotecnia se define como “la ciencia que estudia las diversas manipulaciones a las que deben someterse las distintas materias primas, con el fin de darles la forma adecuada para poder ser suministradas a los seres vivos, según las dosis e indicaciones preestablecidas por la experimentación clínica o prescritas por el personal cualificado”.

De acuerdo con esta definición, la manera en la que sea suministrado un medicamento en general, y la suspensión oral de 6-mercaptopurina en particular, conllevará a una correcta dosificación del fármaco y posteriormente una correcta individualización del tratamiento.

Se sospecha que uno de los posibles problemas por los que el tratamiento no esté dando resultados positivos en algunos pacientes, radica en el sencillo hecho de no estar siendo suministrado correctamente. El aspecto del producto acabado es el de un líquido ligeramente viscoso, opaco, de color amarillo e inodoro. Es una suspensión homogénea con partículas finas repartidas de manera uniforme en los vehículos, con un tiempo de suspensión superior a un minuto, cuyas partículas se resuspenden con agitación ligera. Es por ello, que tras pasado el tiempo de suspensión, debido a la a las características que presentan los vehículos utilizados para la preparación del jarabe, se formarán diferentes fases en el interior del recipiente que contiene el preparado, dando lugar a una muestra heterogénea en la que la concentración de 6-MP variará según el caso. Es por ello, que uno de los puntos a tratar en este estudio ha consistido en comprobar si las sospechas que se tenían eran o no ciertas, es decir, si realmente la concentración de mercaptopurina será diferente en diferentes puntos de la muestra, realizando un estudio a altas y bajas concentraciones.

Además, muchos estudios sugieren que la administración vespertina reduce el riesgo de recaídas en comparación con la administración matutina. Es por todo ello que, la individualización de las dosis mediante la monitorización de las concentraciones contribuirá de manera directa a la eficacia y la seguridad de los tratamientos.

1.4. Contaminación de las aguas

Según la Organización Mundial de la Salud, un agua contaminada se define como “aquella cuya composición haya sido modificada de modo que no reúna las condiciones para el uso que se le hubiera destinado en su estado natural”.

Aunque la contaminación del agua puede provenir de fuentes naturales, como puede ser por ejemplo la ceniza de un volcán, la principal contaminación del agua es consecuencia de las actividades humanas.

El desarrollo y la industrialización suponen un mayor uso de las aguas, y en consecuencia una mayor contaminación. Las aguas producto de las actividades domésticas contribuyen a la inclusión de residuos fecales, detergentes, microorganismos, etc. Los desagües industriales, por su parte, son aguas portadoras de la mayor parte y variedad de agentes contaminantes, los hidrocarburos, ciertos metales (Pb, Cd, Se, Hg, entre otros) y los detergentes son los principales responsables. Los abonos, pesticidas e insecticidas utilizados en la agricultura moderna, así como los residuos de animales contribuyen también en este sentido. Además, se le deben sumar los residuos procedentes de las industrias pesqueras, la radiactividad y lo que se conoce como “marea negra”, lo cual se corresponde con el petróleo que es eliminado al mar por las embarcaciones. Se puede decir por tanto que, los contaminantes del agua, introducidos por vía doméstica, industrial o agrícola, pueden ocasionar numerosos tipos de efectos que se estudian en función del uso que se le quiera dar al agua, con el fin de preservar la vida acuática, o bien con fines recreativos u estéticos.

En consecuencia, en términos generales, los efectos negativos causados por la contaminación de las aguas se ven reflejados en los siguientes aspectos:

- Desaparición de ecosistemas acuáticos y envenenamiento de especies
- Generación de enfermedades humanas.

- Efectos nocivos en el desarrollo de especies en base a su debilitación inmunológica.
- Lluvia ácida.

Es por ello, que la Química Verde supone un paso mayor de lo que sería un tratamiento correcto de los residuos o contaminantes que se pudieran generar. En este contexto, la *Química Verde* plantea una serie de fundamentos basados en un nuevo enfoque para prevenir la contaminación. “Los 12 principios de la Química Verde” se detallan a continuación:

1. *Prevención de los residuos.* Es preferible disminuir la generación de residuos que tratar los formados.
2. *Economía atómica.* Se deben diseñar métodos de síntesis que maximicen la incorporación, en el producto final, de todos los materiales usado en el proceso, minimizando la formación de subproductos.
3. *Realización de síntesis menos peligrosas.* Siempre que sea posible, diseñar métodos de síntesis que utilicen y generen sustancias menos tóxicas, tanto para el ser humano como en el Medio Ambiente.
4. *Diseño de productos químicos más seguros.* Los productos químicos se deben diseñar para mantener su eficacia de funcionamiento a la vez que se reduce su toxicidad.
5. *Disolventes y materiales auxiliares más seguros.* Se debe reducir en la medida de lo posible el uso de sustancias auxiliares, como disolventes o agentes de separación, y cuando sean necesarios, que sean lo más inertes posibles.
6. *Eficacia energética.* Reducir al mínimo los requisitos de energía de los procesos químicos y si es posible realizar los métodos de síntesis en condiciones ambientales de presión y temperatura.
7. *Uso de materias primas renovables,* siempre que sea posible técnica y económicamente.
8. *Reducción de los derivados.* Reducirlos en la medida de lo posible o evitar la derivatización innecesaria, pues requiere reactivos adicionales y genera residuos.
9. *Potenciación de la catálisis.* Empleo de catalizadores lo más selectivos posible en lugar de reactivos estequiométricos.
10. *Diseño de productos degradables.* Diseño de productos químicos que se transformen, tras su función, en productos no persistentes en el Medio Ambiente y que se descompongan en productos inocuos.

11. *Realizar análisis en tiempo real para prevenir la contaminación.* Desarrollo de las metodologías analíticas necesarias para permitir el seguimiento y control de la contaminación durante el proceso en tiempo real, para prevenir la formación de sustancias peligrosas.
12. *Procesos intrínsecamente más seguros para la prevención de accidentes.* Elección de las sustancias y las condiciones de operación con el fin de conseguir reducir los potenciales accidentes, como por ejemplo los incendios o las fugas de materiales al ambiente.

1.4.1. Legislación

El agua que nos proporciona, en sus distintas formas, la naturaleza, no reúne los requisitos necesarios para ser consumida directamente por el ser humano, debido a la contaminación que contiene.

- Hoy en día, se llevan a cabo controles exhaustivos para asegurar que el agua que llega a nuestras casas cumple con los requisitos que establece la ley (Ley Orgánica 60/2011, BOE, 22 de enero de 2011).

Con este objetivo, la legislación española actualizada de acuerdo con el Real Decreto 60/2011 a fecha 21 de enero, y recogida en el BOE, referida a las normas de calidad ambiental de las sustancias preferentes, seleccionadas por presentar un riesgo significativo para las aguas superficiales españolas debido a su especial toxicidad, persistencia y bioacumulación o por la importancia de su presencia en el medio acuático, establece que:

A efectos del real decreto se entiende por:

- “Buen Estado Ecológico”: estado de una masa de agua superficial cuyos indicadores de calidad biológicos muestran valores bajos de distorsión causada por la actividad humana, desviándose sólo ligeramente de los valores normalmente asociados a condiciones inalteradas en el tipo de masa correspondiente. Los indicadores hidromorfológicos son coherentes con la consecución de dichos valores y los indicadores fisicoquímicos cumplen con los rangos o límites que garantizan el funcionamiento del ecosistema específico del tipo y la consecución de los valores de los indicadores biológicos. Además las concentraciones de contaminantes, distintos a

los recogidos en la tabla 1 (Ley Orgánica 60/2011, BOE, 22 de enero de 2011), cumplen las NCA (normas de calidad ambiental) y en particular las sustancias preferentes cumplen las NCA establecidas en la tabla 2 (Ley Orgánica 60/2011, BOE, 22 de enero de 2011) de este real decreto.

-“Buen Estado Químico de las Aguas Superficiales”: el estado de una masa de agua superficial que cumple las NCA establecidas en la tabla 1 (Ley Orgánica 60/2011, BOE, 22 de enero de 2011) de este real decreto, así como otras normas comunitarias pertinentes que fijen normas de calidad ambiental.

-“Contaminación”: la introducción directa o indirecta, como consecuencia de la actividad humana, de sustancias o energía en la atmósfera, el agua o el suelo, que puedan ser perjudiciales para la salud humana o para la calidad de los ecosistemas acuáticos, o de los ecosistemas terrestres que dependen directamente de ecosistemas acuáticos, y que causen daños a los bienes materiales o deterioren o dificulten el disfrute y otros usos legítimos del medio ambiente”.

1.5. Contaminantes emergentes

En la actualidad existe un creciente interés por los contaminantes emergentes (CE) ya que son contaminantes de diferente origen, previamente desconocido o no reconocido como tal y de naturaleza química variada, cuya presencia en el medio ambiente o cuyas posibles consecuencias debido a su presencia han pasado en gran parte inadvertidas generando problemas medioambientales y de salud.

Estos compuestos se encuentran presente en el ambiente, además de en fuentes de abastecimiento, llegándose a encontrar incluso en aguas para el consumo humano. No se tiene demasiada información actualmente acerca de ellos, siendo esto en gran medida debido a que la disponibilidad de métodos para su análisis sea nula o limitada, y en la mayoría de los casos se trata de contaminantes no regulados pero que podrán ser propuestos para su regulación en un futuro, en función de los datos que se vayan obteniendo con relación a su incidencia sobre la población y su entorno.

Generalmente se liberan en pequeñas cantidades, pero con el paso del tiempo y debido a su uso intensivo y generalizado, pueden generar efectos negativos a largo plazo, sobre todo en los seres vivos.

Han llegado a ser contaminantes emergentes porque se acumulan ocasionando la pérdida de biodiversidad en el ecosistema acuático, de igual manera que producen la aparición de microorganismos patógenos que son resistentes a los antibióticos. Es por ello por lo que son un gran foco de preocupación porque incluso a bajas concentraciones, debido a su elevada producción y consumo y a su continua introducción en el medio, no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos nocivos.

Entre los principales contaminantes emergentes o también llamados micro-contaminantes, cuyo estudio se encuentra entre las líneas prioritarias de investigación de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental (OMS, EPA o la Comisión Europea) se encuentran, los productos de uso personal, productos de limpieza, drogas de abuso, cosméticos, compuestos perfluorados y medicamentos, entre otros. Incluso los virus y bacterias son considerados un tipo particular de contaminante emergente. Además, la industria relacionada con la producción de nanomateriales basados en carbono y basados en metales, han presentado un gran auge en los últimos años, lo cual se ha visto de igual manera reflejado en las aguas residuales. En el caso de los detergentes perfluorados o de los fármacos, la toma de conciencia del riesgo que supone su presencia en el medio ambiente es relativamente reciente y no se dispone de datos suficientes para realizar una valoración concreta de su impacto, aunque ha supuesto un objeto de estudio constante durante los últimos años.

1.5.1. 6-Mercaptopurina como contaminante emergente

Las datos obtenidos a partir de las revisiones bibliográficas muestran que los CE que han levantado un mayor interés en los últimos años han sido los fármacos y más concretamente, los antibióticos, ocupando el tercer puesto en volumen de uso de todos los fármacos empleados en la medicina para el tratamiento de las dolencias humanas.

Estos fármacos no son detectados en las depuradoras cuando llegan a las plantas de tratamiento de las aguas y en muchos casos no se conocen procedimientos para tratarlos, pero su presencia puede ocasionar daños en el medio ambiente y en la salud humana.

De acuerdo con los datos aportados por la Web del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, el número de envases de medicamentos consumidos en los Hospitales de la red pública del Sistema Nacional de Salud en España, así como el coste real de fármacos o medicamentos, muestran valores de 61.775.338 y 6.093.234.726 respectivamente, correspondientes al acumulado de enero a diciembre durante el año 2017, lo cual se traduce en un peligroso abuso de los antibióticos que ingerimos y en consecuencia que arrojamos al medio ambiente, especialmente a las aguas.

A pesar de que los valores mostrados son referidos al año 2017 en España, en muchos países pertenecientes a la UE, el consumo de fármacos se cifra en toneladas, cantidades similares a las encontradas para los pesticidas en el caso de los antibióticos. Los fármacos que se han detectado en el medio ambiente acuático, de manera directa o en forma de metabolitos, incluyen analgésicos, antiinflamatorios, antibióticos, antiepilépticos, bloqueantes, reguladores de lípidos, medios de contraste en rayos X, anticonceptivos orales, esteroides, tranquilizantes, etc.

Tal y como se ha descrito, la 6-MP es un profármaco de quimioterapia anticanceroso (“antineoplásico” o “citotóxico”), que se clasifica como “antimetabolito” ya que es una sustancia muy similar a la que se encuentra en el interior celular la cual es incorporada al metabolismo provocando la pérdida de la capacidad de división de las células. Es por tanto que, la utilización de la 6-MP como principio activo de los medicamentos utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades, principalmente la LLA, implica la ingesta de un fármaco, concretamente un antibiótico, que tras realizar su acción farmacológica en el organismo, es excretado al exterior a través de la orina y de las heces, ingresando de manera continua a las aguas residuales y por lo tanto provocando la contaminación de las aguas, clasificándose como contaminante potencialmente peligroso y de esta manera como contaminante emergente.

1.6. Eliminación de las aguas

La reducción de los productos contaminantes presentes en las aguas tanto de consumo humano como residuales representa uno de los retos ambientales de prioridad a nivel mundial. Por ello, se han desarrollado estudios de toxicidad y costos para la implementación de sistema de remoción de fármacos presentes en las aguas.

Los productos farmacéuticos pueden ser eliminados de las aguas a través de diferentes procesos. Los procesos naturales por ejemplo, fotodegradación solar, adsorción sobre sedimentos y degradación biológica, disminuyen en gran medida la concentración de estos en las aguas. Por otro lado, aquellos compuesto cuyas concentraciones no se hayan visto minimizadas o no hayan sido eliminados completamente, podrían ser erradicados durante los posteriores procesos de tratamiento de aguas potables y residuales.

Los procedimientos convencionales llevados cabo para el tratamiento de las aguas comprenden por ejemplo, cloración, desinfección y filtración convencional, dando un porcentaje de reducción de estos compuestos en las aguas de en torno al 50%. Sin embargo, procedimientos más avanzados como: filtración con arena, filtración con carbón activo, ozonólisis, filtración con membranas, luz UV, ósmosis inversa, entre otros, permiten reducir hasta un 90% la presencia de los fármacos.

A pesar de ello, el enfoque más adecuado para minimizar la presencia de estos productos en las aguas sería el de reducir la exposición humana, es decir, prevenir o reducir el paso de los productos farmacéuticos al medio acuático en la medida de lo posible.

En el caso que atañe a este trabajo, el objetivo ha sido buscar y con suerte poder encontrar un medio por el que poder eliminar la 6-MP, ya que tal como se ha indicado, es considerado un contaminante emergente.

1.6.1. Estudio de adsorción

La tendencia de una especie a ser adsorbida de su solución se puede modificar eligiendo adsorbentes y disolventes de diferente polaridad que puedan interaccionar con el analito de interés. Es por ello, que se han considerado diferentes compuestos sólidos en función de sus características y de su naturaleza de manera que se ha podido conocer cuál de ellos presentaba una mayor capacidad para retener sobre su superficie a la 6-mercaptapurina, presente en este caso en un medio líquido.

Los adsorbentes se clasifican en función de su naturaleza, existiendo dos tipos de adsorbentes, los de carácter inorgánico, entre los que destacan las Zeolitas y los de

carácter orgánico, los cuales vienen representados por materiales adsorbentes carbonosos.

En cualquier caso, las características principales que debe presentar un buen adsorbente son:

- Alta capacidad de adsorción.
- Propiedades físicas y tamaño de partículas adecuados.
- Bajo coste.
- Fácil regeneración, por desorción.

Los adsorbentes estudiados en este caso, para su posible aplicación, se dividen en tres tipos principales: MOF's, Grafenos y Zeolitas.

MOF's

Son compuestos de coordinación de naturaleza cristalina generados por la asociación de iones metálicos, que se enlazan a través de moléculas orgánicas que generalmente dan lugar a estructuras tridimensionales. Se basan en cavidades que puede llegar a ser de dimensiones moleculares, teniendo tamaños que pueden clasificarse como microporos (porosidad de tamaño inferior a 2 nm) o mesoporos (porosidad entre 2-50 nm). Se caracterizan por tener gran estabilidad química y térmica. Presentan muchas aplicaciones en diversas áreas como resultado de variaciones en sus componentes/estructura, entre las que se incluyen la adsorción de gases, la catálisis heterogénea, magnetismo, entre otras.

Bajo ciertas condiciones de síntesis y combinando ciertos elementos metálicos con los grupos funcionales de los ligandos, se generan clústeres con una determinada conectividad y geometría, permitiendo de esta manera tener un cierto control estructural sobre los MOF's para darle las posteriores aplicaciones deseadas.

Con respecto a los componentes de los MOF's, los iones metálicos más utilizados son el Zn^{2+} y el Cu^{2+} , aunque también se utilizan otros metales de transición o lantánidos. En el caso de los ligandos orgánicos suelen ser di-, tri- o tetradentados, donde los ligandos más utilizados son los ácidos carboxílicos y los ligandos heterocíclicos con átomos de nitrógeno.

Los MOF's utilizados en este trabajo han sido el FeBTC y CuBTC.

Grafenos

La utilización de formas alotrópicas de carbono para adsorber contaminantes mediante la utilización de grafeno, así como la encapsulación de fármacos radioactivos por medio de fullerenos y la utilización de nanotubos para almacenar combustibles, es una línea de investigación que actualmente se está siguiendo y desarrollando con el fin de limpiar o mejorar un determinado ambiente.

El grafeno es un nanomaterial bidimensional que consiste en una capa de átomos de carbono unidos por enlaces estables en una superficie uniforme formando una estructura cristalina.

Presenta muchas y variadas características, además de propiedades que han hecho que sea uno de los materiales más estudiados en la naturaleza, destacando en este caso el hecho de que presenta una gran superficie específica y además, puede reaccionar químicamente con otras sustancias para formar compuestos nuevos con diferentes propiedades, lo que abre un abanico muy amplio en diferentes campos de aplicación.

En este caso se ha utilizado grafeno polar y grafeno apolar para el estudio de adsorción.

Zeolitas

Durante muchos años, las zeolitas han sido materiales muy útiles como ablandadores de aguas intercambiando cationes, así como tamices moleculares para separar moléculas de diferente tamaño y forma. Últimamente, la investigación a cerca de estos materiales se ha centrado en su uso como catalizadores en muchas reacciones, siendo este el motivo por el que cada vez esté más extendido su uso en procesos industriales.

Este término nace en 1756 cuando un geólogo sueco descubre un nuevo mineral que perdía agua al calentarse, la stilbita. Más tarde, en 1858, se observó que estos minerales eran aluminosilicatos que, además contenían metales que podían ser intercambiados por otros iones, lo cual sugería una estructura abierta.

Posteriormente, se impuso la necesidad de buscar zeolitas sintéticas, lo cual no tardó mucho en llegar, en 1862 y en 1882 se obtuvieron las primeras zeolitas sintéticas, dando lugar a los primeros ablandadores de agua.

Se identificaron nuevas especies hasta 1925, y fue en ese mismo año donde se observó que la chabazita absorbía agua, metanol y etanol pero no acetona, benceno y éter etílico, introduciendo por tanto el término de tamiz molecular.

En 1930, se publicaron diversos artículos que mostraban que las zeolitas estaban formadas por tetraedros de $[\text{SiO}_4]^{4-}$ y $[\text{AlO}_4]^{5-}$ unidos de forma que comparten los vértices, dando lugar a una red tridimensional muy abierta atravesada por canales. Es esta arquitectura molecular regular y reproducible la que confiere a las zeolitas unas propiedades únicas y de gran atractivo industrial. El interés por estos materiales aumenta cada día, de manera que en la actualidad se conocen más zeolitas sintéticas que naturales.

Las zeolitas se definen como minerales aluminosilicatos hidratados microporosos con una alta cristalinidad, con una estructura basada en una red tridimensional de canales y cavidades. Consta de tetraedros formados por un catión y cuatro átomos de oxígeno, en los cuales el catión suele ser aluminio, germanio o silicio, siendo este último el predominante. Basándonos en esta definición, no pueden considerarse zeolitas aquellas que no estén constituidas por silicio y aluminio, de modo que, los metaloaluminatos, metalosilicatos, aluminofosfatos o la silicalita, no pueden incluirse en esta definición, recibiendo el nombre de zeotipos.

Su estructura forma cavidades que se encuentran ocupadas por iones grandes y moléculas de agua con libertad de movimiento, que permiten el intercambio iónico y la deshidratación reversible. La estructura cristalina está basada en las tres direcciones de la red cristalina con SiO_4 en forma tetraédrica de manera que los cuatro oxígenos están compartidos con los tetraedros adyacentes.

Las zeolitas naturales tienen un tamaño de poro limitado y todas son hidrofílicas, mientras que algunas zeolitas sintéticas se parecen al carbón adsorbente, dado que ambas pueden considerarse hidrofóbicas y pueden adsorber vapores orgánicos con moléculas de menor tamaño que el de sus poros. Tanto el carbón como la zeolita pueden adsorber agua y moléculas orgánicas, sin embargo aquello por lo que presente mayor afinidad, desplazará a las demás moléculas. En el caso de la zeolita, cuanto mayor sea la razón silicio-aluminio, más hidrofóbica será la zeolita. Tal y como se enunció, las zeolitas hidrofóbicas no se encuentran en la naturaleza, por lo que deben ser sintetizadas.

La importancia de la síntesis de las zeolitas radica en que permite predecir las propiedades de las zeolitas, producir zeolitas con tamaño de poro más grande y producir zeolitas hidrofóbicas.

Presentan variadas aplicaciones debido a sus propiedades, estructuras y características, entre las que destacan la catálisis, adsorción e intercambio selectivo de iones, y en esta ocasión, la aplicación que resulta más interesante es su capacidad de adsorción, pudiendo adsorber moléculas en su gran área interna, siempre que puedan pasar por las ventanas que forman su estructura.

Las zeolitas deshidratadas tienen estructuras porosas muy abiertas, dando lugar a un área superficial interna muy elevada, por lo que son capaces de absorber una gran cantidad de moléculas. Las moléculas huésped penetran en el interior del cristal de la zeolita a través de unas ventanas de dimensión variable, por lo que estos materiales resultan selectivos al tamaño de los adsorbatos. Se caracterizan por presentar una capacidad tamizante muy alta y específica, por lo que pueden utilizarse en procesos de separación y purificación.

1.6.2. CuBTC como adsorbente

Debido a las grandes posibilidades que presentan los MOFs, en la actualidad se están comercializando materiales de esta familia, los cuales reciben el nombre de Basolite® o Basosiv®. Sigma Aldrich ofrece cinco MOFs de diferentes familias, como son: Basolite® C300, Basolite® F300, Basolite® A100, Basolite® Z1200 y Basolite® M050.

El MOF comercial que suscita un mayor interés en este trabajo es el Basolite C300, el cual está constituido por el ligando orgánico 1,3,5-benceno tricarboxílico (1,3,5-BTC) y utiliza como ion metálico el Cu^{2+} , cuyo MOF original es el HKUST-1.

EL HKUST-1 o también llamado MOF-199 presenta una estructura compuesta por dos grupos de iones de cobre, los cuales se encuentran coordinados con cuatro grupos carboxílicos, que forman una unidad de construcción secundaria con forma de “rueda de paletas”, $\text{Cu}_2(\text{CO}_2)_4$, de acuerdo con la figura 2, los cuales están unidos al ligando orgánico, el ácido 1,3 5-benceno tricabroxílico.

La estructura contiene centros metálicos abiertos o insaturados coordinativamente accesibles, que se han formado tras la eliminación del agua presente en el SBU, pero conservando su cristalinidad. En consecuencia, se generan iones Cu^{2+} insaturados que se caracterizan por contribuir en gran medida a la característica de compuesto adsorbente que presenta este material. Se caracteriza por ser una estructura de electricidad neutra con cargas parciales positivas en los átomos de cobre y cargas negativas localizadas en las unidades de los carboxilatos.

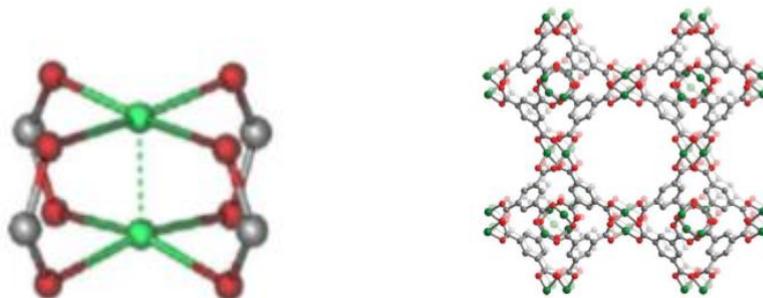


Ilustración 2. Representación del SBU en forma de rueda de paleta. Esferas verdes: Cu y grises: C

Ilustración 3. Estructura del HKUST-1. Esferas verdes, grises y rojas representan los átomos de Cu, C y O respectivamente

La Basolite C300 también conocida como $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ o $\text{Cu}_3(\text{C}_9\text{H}_3\text{O}_6)_2$, presenta una estructura (Ilustración 3) que se corresponde con el HKUST-1. Se caracteriza por presentar una gran estabilidad, microporosidad y un área superficial considerablemente mayor a la observada para la Basolite F300, lo cual se debe a la microporosidad de su estructura. Además, la descomposición térmica que presenta el Basolite C300 se divide en dos etapas características la primera asociada a la desorción del agua absorbida en su estructura, cuyo paso se reconoce fácilmente por un cambio de color de azul turquesa a azul oscuro, y una segunda en la que se produce una pérdida de masa lo cual se corresponde con la descomposición de la estructura dando lugar al CuO .

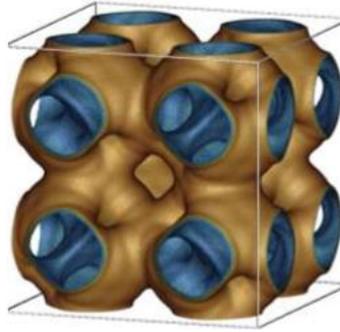


Ilustración 4. Celda unidad de la estructura del CuBTC omitiendo los oxígenos axiales ligados a los Cu

La principal aplicación que presenta este MOF (Basolite C300), al igual que con el resto de los MOFs comercializados, se corresponde con la adsorción de diferentes analitos. A continuación se citan diversos tipos de adsorción llevados a cabo utilizando los MOFs comerciales C300 y F300 mediante la realización de un ensayo a través de un análisis termogravimétrico (Bondia Roig, José D.):

- Adsorción de hidrógeno.
- Adsorción de dióxido de carbono.
- Adsorción de metano.

1.7. Metodologías utilizadas

1.7.1. HPLC

En el año 1906 comenzaron a realizarse las primeras separaciones cromatográficas, cuando un botánico ruso consiguió separar algunos pigmentos coloreados de las hojas de las plantas utilizando una columna de alúmina. Pero no fue hasta 1931 cuando se produjo un gran desarrollo de esta técnica, comenzando a utilizarse de manera sistemática. Hacia el año 1952, la cromatografía de gases fue la que se llevó toda la atención, dejando de lado a la cromatografía líquida, a pesar de que las muestras a analizar para esta técnica presentaban mayores limitaciones(sustancias volátiles o sus derivados). En consecuencia, se comenzó a retomar el uso de la cromatografía líquida, cuya única limitación residía en la forma de disolver la muestra a analizar y la búsqueda de columnas con mayores eficacias.

Al cabo de los años y con la suma de experiencias adquiridas con la CG y la CL, se fueron desarrollando cada una de las partes de los equipos cromatográficos, tales como, sistemas de inyección, sistemas de detección, bombas, sistemas de circulación del eluyente, entre otros, dando lugar a lo que se conoce actualmente como cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE).

La cromatografía líquida de alta eficacia se incluye dentro de la cromatografía de elución. Consiste en que un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con otro líquido u sólido inmisible (fase estacionaria), de modo que al introducir una mezcla de analitos en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente, que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. De manera que, después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, por lo tanto, separadas.

Existen diferentes tipos de cromatografía líquida que se pueden clasificar en base a la naturaleza de la fase estacionaria, ya que ésta es la que define el mecanismo de separación:

-Cromatografía de adsorción (líquido-líquido): la fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.

-Cromatografía de reparto/adsorción (fases ligadas químicamente): la separación en este caso se basa en un reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

-Cromatografía de intercambio iónico: la fase estacionaria presenta en su superficie grupos ionizados capaces de retener selectivamente a iones de signo contrario que circulan en la fase móvil.

-Cromatografía de exclusión molecular: la fase estacionaria es un material poroso de tamaño de poro controlado que permite la entrada de ciertas moléculas de manera selectiva, dejando fuera moléculas de mayor tamaño.

A su vez, los dos primeros tipos de cromatografía se subdividen en dos tipos en función de la polaridad de la fase estacionaria:

-Cromatografía de fase normal.

-Cromatografía de fase reversa.

De acuerdo con esta clasificación, el tipo de cromatografía que presenta una mayor interés para el estudio en cuestión es la cromatografía de adsorción en fase reversa, que presenta una fase estacionaria apolar y las interacciones que se producen son inespecíficas.

La fase estacionaria en este tipo de cromatografía generalmente es un sólido que presenta grupos funcionales capaces de interactuar con los compuestos a separar y con la fase móvil. Las interacciones que se producen en esta cromatografía de adsorción se pueden explicar mediante la teoría de mecanismo de desplazamiento, la cual propone la existencia de una competencia entre el soluto y la fase móvil por los puntos activos de la fase estacionaria. De manera que, cuando el eluyente puro atraviesa la columna, se produce un equilibrio en el que las moléculas de la fase móvil quedan adsorbidas sobre la superficie del sólido formando una monocapa. Cuando se introduce el sólido en la columna, éste compite por los puntos activos de la superficie de la fase estacionaria ocupados por la monocapa de fase móvil, llegándose a nuevos equilibrios de adsorción-desorción, entre fase móvil, fase estacionaria y soluto.

La representación gráfica del proceso que se produce en una cromatografía de adsorción es la que sigue:

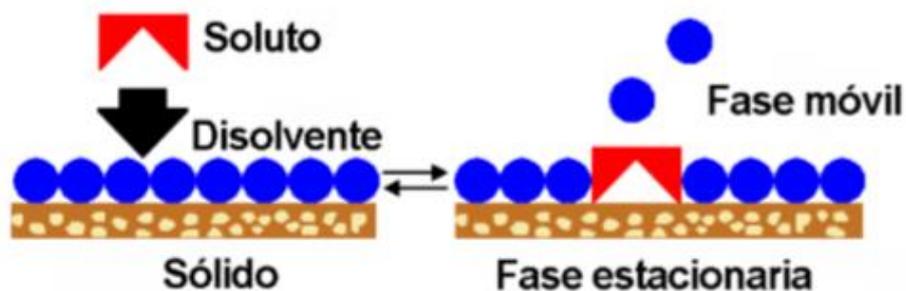


Ilustración 5. Mecanismo de retención HPLC

Las fases estacionarias más utilizadas son la sílice y la alúmina, cuya característica principal reside en su elevada actividad superficial, en función de su superficie específica y del tamaño de poro de la partícula.

En cromatografía de adsorción se utilizan como fase móvil disolventes orgánicos de polaridad baja o media, o bien mezclas de disolventes de variadas polaridades. Los

eluyentes generalmente utilizados son; n-hexano, iso-octano, acetonitrilo, metanol, cloruro de butilo, cloroformo, cloruro de metileno, tetrahidrofurano, y 2-propanol, o bien una mezcla de disolventes con diferentes polaridades.

Este tipo de técnica presenta gran aplicación, por lo que se ha utilizado para la separación, detección y cuantificación de diversos analitos a lo largo del tiempo. Entre algunos de los ejemplos se encuentra: la determinación de compuestos orgánicos (Brega, A; Prandini, P; Amaglio, C y Pafumi, E (1990). *Journal of Chromatography*, 535, 311-316), detección de analitos (Kim, KK; Escobedo, JO; St. Luce, NN; Rusin, O; Wong, D y Strongin, RM (2003). *Organic letters*, 5, 5007-5010), realización de análisis clínicos (Bottai, T; Hue, B; Hillairebuys, D; Barbe, A; Alric, R; Puget, R y Petit, P (1995). *Journal of affective disorders*, 36, 21-27), realización de análisis de alimentos (Demirci, MA; Ipek, Y; Gul, F; Ozen, T y Demirtas, I(2018). *Food chemistry*, 269, 111,117), entre otros.

2. OBJETIVO

Puesta a punto de una metodología analítica para la determinación de 6-Mercaptopurina como principio activo para el tratamiento con quimioterapia de diferentes tipos de leucemia.

Para lograr este objetivo principal, se han establecido otros objetivos específicos:

- Aplicación de manera práctica de los conocimientos y las habilidades adquiridas a lo largo del grado en Química.
- Realización de una revisión bibliográfica de diferentes metodologías utilizadas para la determinación de la 6-Mercaptopurina.
- Selección de una técnica analítica válida para la detección y cuantificación del analito.
- Obtención de un método válido para su aplicación en muestras reales de preparados farmacéuticos utilizados en el tratamiento de diversos tipos de leucemia.
- Validación de la metodología analítica utilizada a través de los correspondientes estudios de repetibilidad y precisión, así como con la obtención de los parámetros de calibración LOD y LOQ establecidos.
- Estudio de las interferencias principales derivadas del excipiente que acompaña al preparado farmacéutico.
- Estudio de la estabilidad del medicamento en condiciones forzadas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos, disolventes y disoluciones

- Basolite® C300 (CuBTC), $C_{18}H_6Cu_3O_{12}$, (Sigma Aldrich).
- Basolite® F300 (FeBTC), $C_9H_3FeO_6$, (Sigma Aldrich).
- Grafeno apolar (lipofílico).
- Grafeno polar.
- Zeolita (Clinoptilolite), pureza 88-95% (Distribuido por DC Minerals).
- Metanol, MeOH, G CHROMASOLV® para elución de gradiente LC, ACS, pureza 99,9% (Sigma Aldrich).
- Acetonitrilo, CH_3CN , LiChrosolv ® para para elución de gradiente LC, pureza 99,9% (Merck Millipore).
- Dimetil sulfóxido (DMSO), $(CH_3)_2SO$, para espectroscopía, pureza 99,8% (Merck Millipore).
- Hidróxido sódico, NaOH, 0,1M, preparado el 8/11/2016.
- Tetrahidrofurano (THF), $CH_2(CH_2)_2CH_2O$, purísimo (Panreac).
- Etanol, EtOH, calidad p.a y pureza superior al 99.8% (Sigma Aldrich).
- Disolución reguladora Britton-Robinson que se prepara mezclando:
 - 2,3 mL de AcH.
 - 2,7 mL de H_3PO_4 .
 - 2,48 g de H_3BO_3 en un matraz de 1 L.

A continuación, se añade NaOH hasta alcanzar un pH 4.

- Fase móvil, agua al 0.2% en H_3PO_4 . Para preparar 1 L de fase móvil se mezclan 2.3 mL de ácido fosfórico y se enrasa hasta llegar a 1 L con agua Milli-Q.

3.2. Material

- Vasos de precipitado de 25 y 50 mL.

- Matraces aforados de 10,25 y 100 mL clase A.
- Microtubos eppendorf de 1,5 mL.
- Tubos de ensayo.
- Pipetas Pasteur.
- Tubos de centrifuga Pyrex con base cónica y tapa de rosca de polietileno.
- Botes de vidrio con tapa de rosca.
- Filtros de membrana para jeringas.
- Viales de vidrio transparente con tapa de rosca de 2 mL.
- Barra magnética.
- Sistema de filtración a vacío.

3.3. Equipo

3.3.1. Instrumentos y dispositivos

- Balanza analítica modelo AW-224 de precisión 0,1 mg y capacidad máxima de pesada de 220 g (AW-224, Sartorius).
- Micropipetas Gilson de volumen variable con puntas de plástico desechables.
- pH-metro Mettler Toledo.
- Papel universal indicador de pH.
- Para la detección y cuantificación de la 6-Mercaptopurina se ha utilizado un sistema HPLC de la marca Varian 920-LC, que consta de una bomba de gradiente cuaternaria, un detector PDA de diodo array, con lámpara de Deuterio para UV, un automuestreador y una columna C18 (920-LC, Varian Inc., Australia).
- Columna termostatzada C18 de 250 x 4,6 mm de d.i y 8µm de tamaño de partícula.
- Precolumna Phenomenex C-18.

3.3.2. Aparatos

- Campana extractora.
- Sistema de purificación de agua modelo Milli-Q gradient A10.
- Agitador de vaivén.
- Centrífuga con control de tiempo y velocidad.
- Agitador Vórtex de velocidad variable.
- Baño de ultrasonidos.
- Agitador magnético con control de temperatura.

3.4. Reactivos

- Medicamento comercial, Purinéthol® 50 mg en comprimidos secos, composición 50 mg de 6-Mercaptopurina.
- Vehículo 1 Ora Sweet (para preparados pediátricos). Es un vehículo utilizado para jarabes que no incluye alcohol ni azúcar, pero si contiene sorbitol, glicerina y sacarina sódica.
- Vehículo 2 Ora Plus (para preparados pediátricos). Es un vehículo para jarabes que contiene diferentes agentes suspensores como celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa sódica, goma xantan y carragenanos, entre otros.

El medicamento, la muestra real, se prepara mezclando 15 comprimidos de Purinéthol® con 30 mL de vehículos, 15 mL de Ora Sweet y 15 mL de Ora Plus.

Con relación a la conservación del medicamento, los comprimidos y la suspensión puede conservarse a temperatura ambiente en un lugar fresco y protegido de la luz solar.

Se han analizado muestras reales de medicamentos en forma de suspensiones orales que han sido preparados por el personal sanitario, además de muestras que han sido elaboradas a nivel laboratorio.

3.5. Programas informáticos

-Programa Galaxie Chromatography Data System Connection versión 1.9 en conjunto con el equipo HPLC.

-Programa Microsoft® Office Excel 2016 para la elaboración de las hojas de cálculo y tratamiento de los datos.

-Programa Microsoft® PowerPoint 2016 para la representación de los cromatogramas obtenidos.

3.6. Procedimientos experimentales

-Preparación de la suspensión oral

El medicamento consiste en una suspensión oral de mercaptopurina de 25 mg/mL.

-Preparación del jarabe para el tratamiento:

La suspensión oral se prepara mezclando 15 comprimidos triturados, los cuales contienen 50 mg de 6-mercaptopurina cada uno de ellos. A continuación se mezclan con 30 mL de vehículos, es decir, 15 mL de Ora-Sweet y 15 mL de Ora-Plus. Posteriormente se agita bien y se envasa sin dejar reposar.

-Preparación del jarabe en el laboratorio:

La suspensión se prepara mezclando 1 comprimido triturado, el cual contiene 50 mg de 6-mercaptopurina. A continuación se mezcla con 2 mL de vehículos, es decir, 1 mL de Ora-Sweet y 1 mL de Ora-Plus. Posteriormente se agita bien y se deja reposar.

Este último aspecto tiene gran importancia dado que en el bote debe figurar la indicación “agitar antes de usar”, de no ser así, la posterior administración del medicamento no sería regular ni homogénea ya que con el paso del tiempo se forman distintas fases en el interior del recipiente.

-Tratamiento de la muestra

Se toma una alícuota de 200 μ L de una muestra clínica con una micropipeta y se diluye con metanol hasta un volumen de 25 mL en un matraz volumétrico. La mezcla se homogeniza durante 5 min en un baño de ultrasonidos. A continuación, se toma una

alícuota de 1 mL y se pasa a un eppendorf para llevar a centrifugar durante 5 min a 3000 rpm. Se toman 800 μ L del sobrenadante y se transfiere a un vial para ser analizado por HPLC.

En el caso de la muestra preparada en el laboratorio el procedimiento sería el mismo, con la diferencia de que hay un paso previo que consiste en pesar la cantidad de Purinéthol deseada en un vaso de precipitado y disolver en 2 mL de vehículo. Posteriormente se lleva al vortex para homogenizar para luego tomar la alícuota de 200 μ L y disolver en MeOH.

-Separación cromatográfica mediante HPLC

Las condiciones optimizadas establecidas para llevar a cabo la separación y cuantificación de la 6-mercaptopurina para diferentes condiciones de la muestra se obtuvieron aplicando un régimen isocrático de concentración y temperatura, empleando como fase móvil una disolución formada por la combinación de agua al 0.2% de H_3PO_4 y MeOH al 70 y 30% respectivamente, con un flujo constante de fase móvil de 1 mL/min. El tiempo de análisis de cada cromatograma fue de 5 min.

La detección del analito se llevó a cabo mediante un detector PDA de diodo array, a una longitud de onda de 322 nm.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se expondrán los resultados obtenidos tras haber llevado a cabo la parte experimental para cada una de las variables de estudio, además de una breve discusión acerca de los mismos.

4.1. Separación cromatográfica

Antes de comenzar, se realizó un estudio para optimizar las condiciones de la separación cromatográfica del analito de interés (6-Mercaptopurina). El método que sirvió de inspiración y que finalmente fue llevado a cabo, a modo de adaptación, para realizar la separación cromatográfica fue el expuesto en el artículo Keerti, M; Naik y Sharanappa T. Nandibewoor (2012). RP-HPLC Method for the Estimation of 6-Mercaptopurine in Spiked Human Plasma and Pharmaceutical Formulations. *Journal of analytical chemistry*, 68, 1085-1088. En dicho trabajo se desarrolla y valida un método simple, rápido y preciso para la determinación de 6-MP, al igual que ocurre en el presente trabajo, pero con la diferencia de que las muestras a analizar en ese caso son formulaciones farmacéuticas y muestras de plasma humano.

La fase móvil utilizada es una combinación de agua-metanol en un proporción 70:30, con régimen isocrático durante todo el muestreo. Los compuestos orgánicos presentan una retención muy grande cuando se utiliza agua como eluyente, es por ello, que el aumento de la concentración de solventes orgánicos en la fase móvil acelerará la elución de los compuestos orgánicos, favoreciendo la salida de la columna de la 6-MP. La realización de varios ensayos con diferentes solventes tales como acetonitrilo, agua, alcohol y metanol, entre otros, es lo que ha permitido escoger la combinación de fase móvil que más se adapta a este proceso cromatográfico, y posteriormente la relación más adecuada entre ambos solventes. Además, esta elección permite mantener un pH constante durante la separación y así evitar ensanchamiento de picos, así como asegurar la presencia de la 6-MP en su forma neutra, resultando más adecuada para su cuantificación.

La separación del analito en el fármaco se realizó en una CLC C18, con un tiempo de retención promedio característico de 3,2 min.

La velocidad de flujo seleccionada ha sido de 1 mL/min ya que, caudales más bajos conllevaron a un aumento en el tiempo de resolución y más altos condujeron a un aumento de la presión. El caudal seleccionado proporcionó un tiempo de separación óptimo, y una buena relación señal/ruido.

La longitud de onda que proporcionó las condiciones cromatográficas más satisfactorias fue 322 nm, región UV en la cual el MeOH muestra transparencia en conjunto con el agua.

Se ha seleccionado un rango de concentración adecuado de trabajo con el fin de optimizar la separación, siendo estas concentraciones escogidas en torno al punto de concentración de interés (200 ppm). Ese punto es considerado punto de interés dado que el medicamento suministrado a los pacientes presenta una concentración en Mercaptopurina de 200 ppm.

En la Ilustración 6 se muestra el cromatograma correspondiente a la separación en régimen isocrático con flujo de fase móvil de 1 mL/min y composición 70:30 en Agua/MeOH, para el nivel de concentración de interés de 6-MP para el preparado farmacéutico.

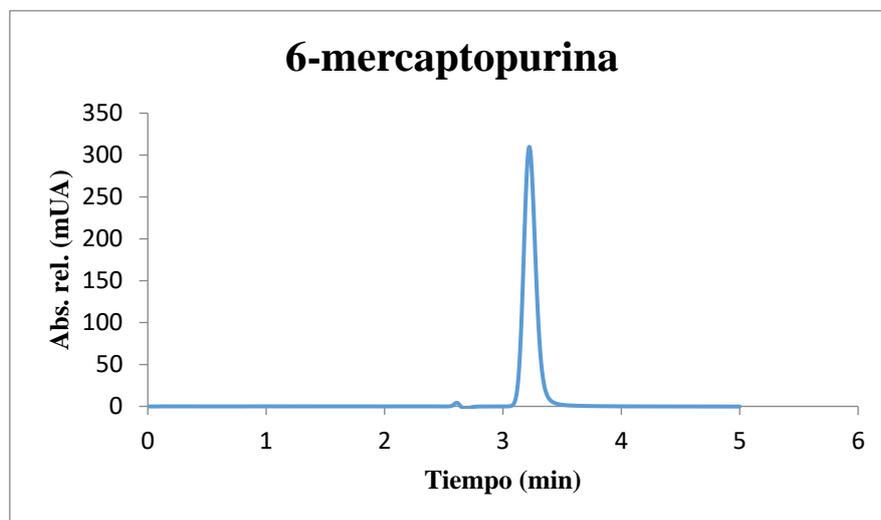


Ilustración 6. Cromatograma 6-Mercaptopurina (200 ppm)

4.2. Calibración

La curva de calibración se construyó utilizando seis patrones de calibración de concentraciones crecientes de 50-300 ppm, a partir de una disolución estándar de 1000 ppm, representando el área de pico frente a las concentraciones correspondientes de 6-MP.

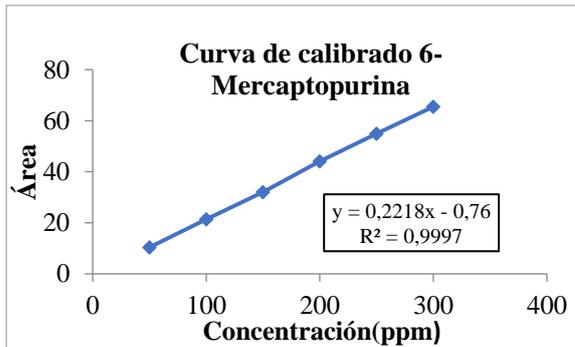


Ilustración 7. Curva de calibrado 6-Mercaptopurina

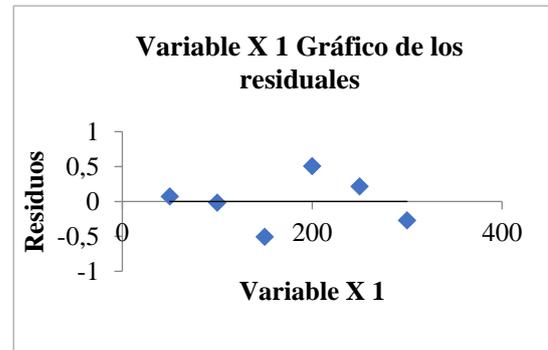


Ilustración 8. Gráfico de residuos 6-Mercaptopurina

La curva fue lineal en el rango de 50-300 mg/L ($R^2 = 0,9997$), generando una ecuación de la recta por análisis de regresión lineal (Ilustración 7).

El análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados dio lugar al gráfico de residuos adjunto (Ilustración 8), el cual muestra una distribución aleatoria de los residuos, a pesar de que pueda suponerse una ligera tendencia no es así ya que los residuos en torno a cero no se tienen en consideración.

Las tablas 2 y 3 muestran los parámetros asociados a la recta de calibrado y los parámetros de calidad del calibrado obtenidos para el analito seleccionado respectivamente.

Nivel de calibración	6
a ± s_a · t(0,05;4)	0,7599 ± 1,032
b ± s_b · t(0,05;4)	0,2218 ± 0,0053
R²	0,9996
S_{y/x}	0,3993

Tabla 2. Parámetros asociados a la recta de calibrado

LOD (ppm)	0,1056
LOQ (ppm)	0,3521
Intervalo útil	0,3521 - 300,0
Sensibilidad de calibrado	0,2218
Sensibilidad analítica	116,2

Tabla 3. Parámetros de calidad del calibrado

Las tablas incluyen los valores referidos a, los intervalos de confianza asociados a los parámetros de la ecuación de la recta para una nivel de confianza del 95%, el coeficiente de determinación (R^2) con un valor de 0,9997, la desviación estándar de los residuos ($S_{y/x}$), el LOD y LOQ instrumental, calculado como la concentración capaz de proporcionar una relación S/R de 3 y 10 respectivamente, así como el intervalo útil de trabajo, la sensibilidad asociada a la recta de calibrado y la sensibilidad analítica del método. Los valores de LOD y LOQ fueron calculados por duplicado, a partir de los parámetros de la recta y a partir de la relación señal ruido, escogiendo finalmente los valores que mostraban resultados más positivos desde el punto de vista de su sensibilidad.

Los excelentes resultados obtenidos muestran la linealidad a nivel instrumental del método analítico utilizado en el intervalo de concentraciones estudiado, así como una adecuada sensibilidad, que permite la determinación a niveles bajos de concentración, del orden de $\mu\text{g/L}$.

4.3. Repetibilidad y reproducibilidad

Una vez optimizada la separación cromatográfica y realizada la calibración del método a punto, se ha realizado un estudio de la repetibilidad intra (en el mismo día) e interdía (en diferentes días), es decir, reproducibilidad y repetibilidad respectivamente. En el primer caso, se realizaron seis inyecciones para 6 niveles de concentración diferentes, destacando el valor de 200 mg/L como punto de interés, con el objetivo de estudiar la reproducibilidad o precisión intradía. Mientras que en el segundo caso, se realizaron seis inyecciones durante seis días consecutivos para el punto de concentración seleccionado, 200 mg/L, con el fin de estudiar la precisión interdía.

Generalmente, el estudio de la reproducibilidad se realiza para dos niveles de concentración diferentes, uno alto y otro bajo, para de esta manera poder tener una idea global de la precisión que muestra el método. Sin embargo, en este caso, se desea conocer cuan reproducible y repetible es el método en torno a la concentración de interés, por lo que el estudio se centra en el valor de concentración de 200 mg/L.

Los cromatogramas obtenidos permitieron realizar una correcta integración de los picos para posteriormente calcular las desviaciones estándar relativas (RSD) para las áreas de los picos asociadas a cada medida.

Los resultados se muestran en las siguientes tablas (Tablas 4 y 5).

Patrón 200(mg/L)	Repetibilidad intradía (n=6, %RSD)				
	Área				
Analito	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
6-MP	0,742	1,82	0,830	0,724	1,26

Tabla 4. Estudio reproducibilidad

Patrón 200(mg/L)	Repetibilidad interdía (n=6, %RSD)
	Área
Analito	Día 1
6-MP	0,74

Tabla 5. Estudio repetibilidad

Los valores obtenidos de los RSDs correspondientes a las áreas de pico en el estudio de la precisión en diferentes días fueron inferiores al 1,82%, mientras que para un mismo día se obtuvo un valor de 0.74%.

Entre y dentro del día la precisión fue aceptable, ya que los valores obtenidos son inferiores al 2%, mostrando una adecuada repetibilidad instrumental y del método cromatográfico.

4.4. Estudio de la concentración

Se ha realizado un estudio que ha consistido en preparar tres muestras con valores de concentración diferente, una de ellas con la concentración de interés (200 mg/L), otra con un valor de concentración por encima de dicho valor y otra de concentración inferior.

Sabiendo que el medicamento suministrado a los pacientes debe tener una concentración de 200 mg/L, el objetivo del estudio ha sido conocer si el medicamento administrado seguía siendo eficiente a niveles de concentración variables, en este caso, a niveles superiores e inferiores al indicado para el preparado farmacéutico. Para ello, se han preparado tres muestras con diferentes cantidades de Purinéthol, con el fin de obtener las concentraciones de 120, 200 y 240 mg/L, es decir, pesando 72, 120 y 144 mg. A continuación, se han realizado 6 inyecciones para cada una de las muestras y posteriormente se ha realizado una media de las áreas de los picos obtenidos que han permitido cuantificar cada una de las muestras, y de esta manera

comprobar que las concentraciones obtenidas coincidían con las concentraciones teóricas que debía presentar cada preparado.

Las tabla 6 muestra los resultados correspondientes a las concentraciones teóricas y las concentraciones reales que presentaban cada una de las muestras.

Masa pastilla(mg)	Masa de MP(mg)	Concentración teórica(mg/L)	Método 2
			Concentración real(mg/L)
72,30	30,13	120,50	122,63
123,10	51,29	205,17	201,60
146,20	60,92	243,67	236,91

Tabla 6. Concentraciones teóricas y reales de 6-MP referidas al estudio de concentración

Las concentraciones recogidas en la tabla han sido calculadas mediante una relación matemática de las concentraciones teóricas y las áreas obtenidas, en relación al punto de interés, en cuyo caso las concentraciones obtenidas presentan valores muy próximos a los calculados teóricamente.

Los resultados de la tabla están referidos a una supuesta muestra heterogénea cuya concentración se desvía del valor deseado, ya sea más concentrada o más diluida. El objetivo por lo tanto ha consistido en comprobar que el método de extracción es igualmente válido para concentraciones que difieran de la concentración a la que se prepara la suspensión. A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir con que el método sigue siendo eficiente en la determinación de 6-Mercaptopurina para valores de concentraciones variables, ya que se ha comprobado que las concentraciones obtenidas muestran valores muy próximos a los valores previstos, asegurando de esta manera la eficiencia del método extractivo.

4.5. Calibración a niveles bajos de concentración

El siguiente estudio ha consistido en ir disminuyendo la concentración desde el valor de interés (200 mg/L) hasta el nivel de concentración del LOQ (0,35 mg/L), con el fin de obtener una nueva curva de calibrado que permita trabajar a niveles bajos de concentración de manera que se pueda realizar un posterior estudio que consistirá en la búsqueda de un adsorbente adecuado para la 6-MP. La nueva curva de calibración se construyó utilizando doce patrones de calibración con concentraciones crecientes de 6-Mercaptopurina de 0,5-244 mg/L, de los cuales nueve de los patrones utilizados

fueron preparados a partir de una disolución estándar de 121 (mg) de MP, es decir, 200 mg/L y fueron inyectados en el cromatógrafo 3 veces, de manera que la media de las áreas de los picos obtenidas frente a las concentraciones correspondientes permitieron construir la nueva curva.

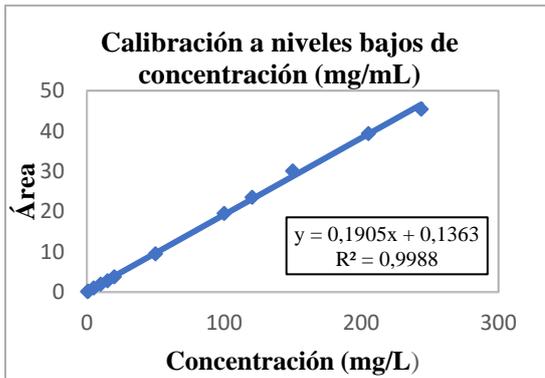


Ilustración 9. Calibración de 6-MP a niveles bajos de concentración.

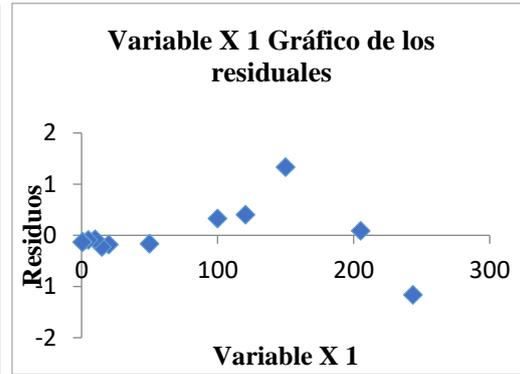


Ilustración 10. Gráfico de residuos 6-MP para niveles bajos de concentración

La curva fue lineal en el rango de 0,5-244 mg/L ($R^2 = 0,9988$), generando una ecuación de la recta por análisis de regresión lineal (Ilustración 9).

El análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados dio lugar al gráfico de residuos adjunto (Ilustración 10), el cual muestra una distribución aleatoria de los residuos, a pesar de que pueda suponerse una ligera tendencia en los primeros puntos de la curva de calibrado, no es así ya que los residuos en torno a cero no se tienen en consideración.

Las tablas 7 y 8 muestran los parámetros asociados a la recta de calibrado y los parámetros de calidad del calibrado obtenidos para el analito seleccionado, respectivamente.

Nivel de calibración	12
a ± s_a · t(0,05;4)	0,1363 ± 0,5262
b ± s_b · t(0,05;4)	0,1905 ± 0,0046
R²	0,9988
S_{y/x}	0,5974

Tabla 7. Parámetros asociados a la recta de calibrado

LOD (ppm)	0,1056
LOQ (ppm)	0,3521
Intervalo útil	0,3521-244
Sensibilidad de calibrado	0,1905
Sensibilidad analítica	91,1480

Tabla 8. Parámetros de calidad del calibrado

Las tablas incluyen los valores referidos a, los intervalos de confianza asociados a los parámetros de la ecuación de la recta para una nivel de confianza del 95%, el coeficiente de determinación (R^2) con un valor de 0,9988, la desviación estándar de los residuos ($S_{y/x}$), el LOD y LOQ instrumental, calculado a partir del método establecido por la IUPAC, así como el intervalo útil de trabajo, la sensibilidad asociada a la recta de calibrado y la sensibilidad analítica del método.

Los resultados muestran un excelente linealidad del método analítico en el intervalo de concentraciones estudiado, así como una adecuada sensibilidad lo cual permite la determinación a niveles de concentración bajos.

4.6. Estudio de adsorción

Con el fin de conocer las posibilidades que permitan evitar una contaminación de las aguas, se ha llevado a cabo un procedimiento para estudiar el comportamiento que presentan diferentes compuestos con acción adsorbente frente al analito a adsorber, en este caso, 6-Mercaptopurina. Para ello, se han estudiado cinco adsorbentes diferentes de naturaleza y características variadas entre sí, de manera que el estudio abarque un campo amplio de posibilidades, permitiendo conocer cuál de ellos presenta una mayor capacidad para retener sobre su superficie al analito.

Se han preparado cinco disoluciones producto de la mezcla de 10 mg de adsorbente con 10 mL de disolución de 10 mg/L en mercaptopurina, tomados a partir de una disolución patrón de 100 mg/L preparada sobre medio acuoso. Se ha realizado una única inyección de cada muestra, de manera que conociendo el valor del área obtenida y haciendo uso de la ecuación de la recta de calibrado, se ha podido cuantificar la cantidad de mercaptopurina que seguía quedando presente en la disolución tras haber llevado a cabo el proceso de adsorción.

La tabla 9 muestra los valores de las concentraciones reales obtenidas para cada adsorbente, así como la eficacia extractiva asociada a cada proceso de adsorción.

Adsorbente	Concentración real de 6-MP(ppm)	Eficacia(%)
Fe BTC(F300)	6,632	19,186
Cu BTC(C300)	< LOQ	107,440
Grafeno apolar(32)	2,433	70,348
Grafeno polar(30)	7,682	6,395
Zeolita	7,682	6,395
Muestra	8,207	

Tabla 9. Concentraciones de 6-MP obtenidas tras el proceso de adsorción

El diagrama de barras siguiente (Ilustración 11) muestra de forma visual los resultados obtenidos referidos a la eficacia extractiva que presentan los compuestos adsorbentes utilizados, de acuerdo con los resultados recogidos en las tablas 11 y 12.

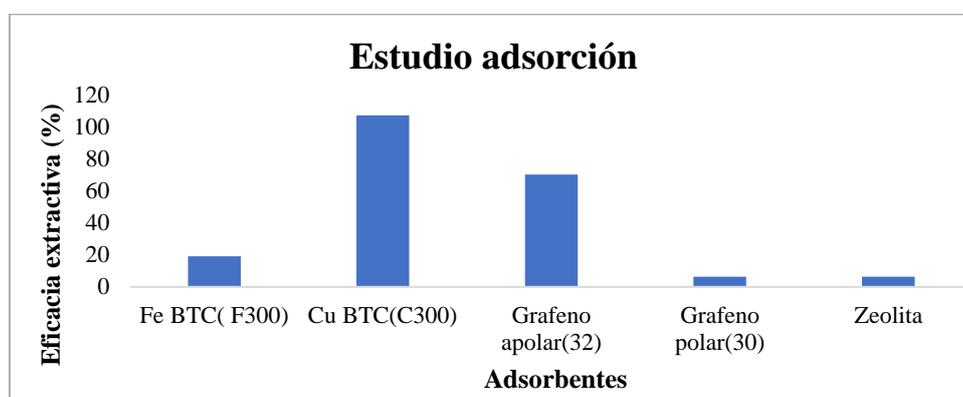


Ilustración 11. Diagrama de barras referido a estudio de adsorción

Una concentración alta de MP respecto a la concentración inicial (10 mg/L) indica que el compuesto no ha cumplido con su acción como adsorbente frente a este analito, mientras que una concentración de MP baja indicará que el analito ha quedado retenido sobre el compuesto adsorbente, cumpliendo así con el objetivo del estudio.

En consecuencia, de acuerdo con los valores obtenidos, el compuesto que mejor cumple con su acción como adsorbente es el CuBTC. El proceso de adsorción se ve afectado por otras variables, además del tipo de adsorbente utilizado, que determinan que la retención del analito sea máxima. Entre ellas se puede destacar, el pH, la cantidad de adsorbente y la velocidad del proceso de adsorción.

- **pH**

Para determinar que compuesto presentaban una mejor capacidad de adsorción sobre el analito, se han variado las condiciones ácido-base del proceso de adsorción. Para ello, se ha utilizado una disolución reguladora Britton-Robinson como medio de disolución, lo cual ha permitido ajustar el pH al valor deseado y decidir en qué condiciones el proceso adsorptivo proporcionaba mejores resultados.

Al igual que en el caso anterior, se han mezclado 10 mg de adsorbente con 10 mL de disolución de 10 mg/L en mercaptopurina, tomados de una disolución patrón de 100 mg/L, con la diferencia de que en este caso ha sido preparada utilizado como medio de disolución una reguladora. Nuevamente, se ha realizado una única inyección para cada caso y se ha cuantificado la cantidad de mercaptopurina que quedaba en la muestra (haciendo uso de la ecuación de la curva de calibrado) tras superar el proceso de adsorción.

Las tablas 10, 11 y 12 recogen los valores de las concentraciones reales obtenidas para cada adsorbente correspondiente a cada valor de pH (3, 7 y 10 respectivamente) así como las eficacias extractivas asociadas a cada proceso.

pH = 3 (Ácido)		
Adsorbente	Concentración real de 6-MP(ppm)	Eficacia(%)
Fe BTC(F300)	7,682	12,02
Cu BTC(C300)	< LOQ	106,5
Grafeno apolar(32)	3,483	60,11
Grafeno polar(30)	10,31	0
Zeolita	9,781	0
Muestra	8,732	

Tabla 10. Estudio de adsorción a pH ácido

pH = 7 (Neutro)		
Adsorbente	Concentración real de 6-MP(ppm)	Eficacia(%)
Fe BTC(F300)	8,732	0
Cu BTC(C300)	< LOQ	107,782
Grafeno apolar(32)	2,958	55,395
Grafeno polar(30)	4,008	39,568
Zeolita	5,582	15,827
Muestra	6,632	

Tabla 11. Estudio de adsorción a pH neutro

pH = 10 (Básico)		
Adsorbente	Concentración real de 6-MP(ppm)	Eficacia(%)
Fe BTC(F300)	7,157	22,680
Cu BTC(C300)	< LOQ	105,797
Grafeno apolar(32)	5,582	39,690
Grafeno polar(30)	8,732	5,670
Zeolita	8,207	11,340
Muestra	9,256	

Tabla 12. Estudio de adsorción a pH básico

En general, el proceso de adsorción se mantiene lineal frente a las variaciones de pH, generando porcentajes referidos a eficacias extractivas bajos para la mayoría de los casos. En cualquier caso, el pH escogido para realizar el proceso adsorptivo es el pH neutro, es decir, en medio acuoso.

- **Cantidad de adsorbente**

De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio de adsorción y posteriormente comprobados en el estudio de pH, el CuBTC ha sido escogido como el adsorbente por excelencia para este proceso adsorptivo. En consecuencia, el objetivo fijado en este apartado ha consistido en variar la cantidad de CuBTC que se hace reaccionar con la 6-MP con el fin de determinar la cantidad mínima necesaria de adsorbente para que se produzca la adsorción.

Para llevar a cabo el procedimiento las condiciones establecidas han sido, utilizar CuBTC como adsorbente y llevar a cabo la retención del analito en un medio a pH neutro. Tal y como se describió con anterioridad, se han mezclado cantidades crecientes de CuBTC de 5-25 mg con 10 mL de disolución de 10 mg/L en mercaptopurina, tomados a partir de una disolución patrón de 100 mg/L preparada en medio acuoso. De nuevo, se realizó una única inyección para cada caso y se cuantificó la concentración real que quedaba de mercaptopurina en la muestra final ,haciendo uso de la ecuación de la recta.

La tabla 13 muestra la concentración real obtenida de 6-MP para cada cantidad de CuBTC empleada en el proceso de adsorción.

	Cantidad(mg)	Concentración de 6-MP(mg/L)
CuBTC	5	< LOQ
	10	< LOQ
	15	< LOQ
	20	< LOQ
	25	< LOQ

Tabla 13. Estudio de adsorción en función de la cantidad de adsorbente

Los resultados obtenidos muestran que la mercaptopurina es adsorbida en todos los casos, lo cual se traduce en que el adsorbente sigue siendo eficiente incluso a niveles bajos de concentración.

▪ Cinética

Con el fin de conocer el tiempo de agitación mínimo necesario para que se produzca la adsorción del compuesto sobre la superficie del adsorbente, se ha llevado a cabo un procedimiento que ha consistido en variar el tiempo de exposición del analito frente al adsorbente.

Para llevar a cabo el procedimiento se han establecido ciertas condiciones fijadas anteriormente, se ha utilizado como adsorbente principal el CuBTC, se ha fijado el medio a pH neutro y la cantidad de adsorbente utilizada para que se produzca la reacción ha sido 10 mg, a falta únicamente de conocer la cinética de la reacción. Al igual que ocurría anteriormente, se ha mezclado 10 mg de CuBTC, con 10 mL de disolución de 10 mg/L en mercaptopurina, tomados a partir de una disolución de 100 mg/L preparada en medio acuoso, y se ha variado el tiempo de agitación de la mezcla analito-adsorbente de 5-60 min. De nuevo, se realizó una única inyección para cada caso y se cuantificó la concentración real que quedaba de mercaptopurina en la muestra final ,haciendo uso de la ecuación de la recta.

La tabla 14 muestra las concentraciones reales obtenidas de 6-MP tras haber llevado a cabo la adsorción del analito a diferentes tiempos de agitación.

	Tiempo agitación(min)	q (mg/g)
CuBTC	60	7,489
	30	9,248
	15	8,886
	10	8,207
	5	8,517

Tabla 14. Estudio de adsorción en función de la velocidad del proceso

Una vez realizado el estudio cinético, conocido el tiempo mínimo necesario para que se produzca la adsorción, se desea saber si dicho estudio se adapta a un modelo cinético de pseudo primer orden o de pseudo segundo orden.

-Modelo cinético de pseudo primer orden. El modelo cinético de pseudo primer orden ha sido ampliamente utilizado para predecir la cinética de adsorción. El modelo dado por Lagergren es definido como:

$$\frac{dq}{dt} = k_1(q_e - q)$$

Integrando la ecuación con respecto a las condiciones límites $q=0$ a $t=0$ y $q=q_e$ a $t=t$ se obtiene:

$$\log(q_e - q) = \log(q_e) - \frac{k_1}{2,303} t$$

-Modelo cinético de pseudo segundo orden. La ecuación de pseudo segundo orden basada en la adsorción de equilibrio se expresa como:

$$\frac{dq}{dt} = k_2(q_e - q)^2$$

Integrando la ecuación con respecto a las condiciones límites $q=0$ a $t=0$ y $q=q_e$ a $t=t$:

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t$$

Se calcula el valor de todos los parámetros que aparecen en las ecuaciones para poder determinar a qué modelo se adapta mejor el proceso de adsorción llevado a cabo en este procedimiento. En un modelo cinético de pseudo primer orden, se representa el $\log(q_e - q)$ vs t , mientras que en uno de pseudo segundo orden se representa t/q vs t , de modo que aquella representación gráfica que genere una curva lineal con un valor de R^2 aceptable, determinará el modelo cinético que mejor se adapta al proceso.

Las ilustraciones 12 y 13 muestran las representaciones obtenidas para los procesos de pseudo primer y segundo orden.

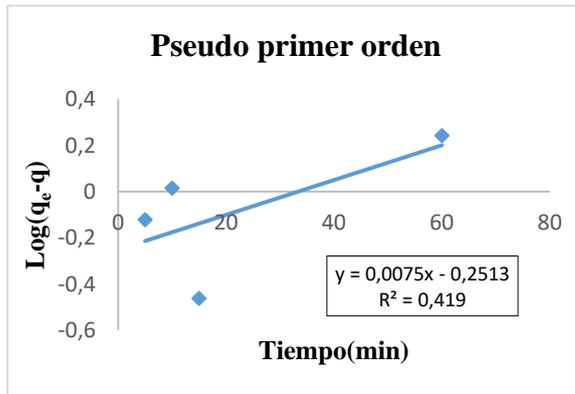


Tabla 12. Modelo cinético 6-MP de pseudo primer orden

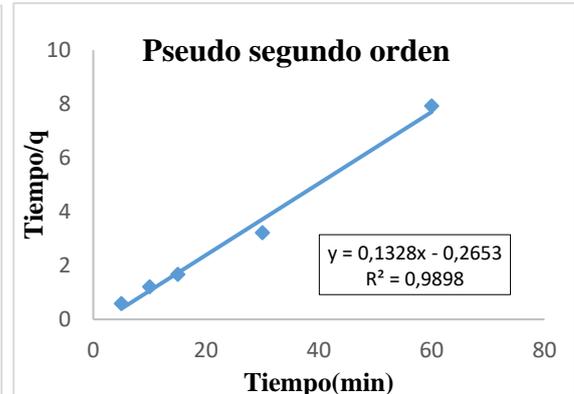


Tabla 13. Modelo cinético 6-MP pseudo segundo orden

La representación correspondiente al modelo de pseudo segundo orden muestra una curva lineal en el rango 0-60 con un valor de $R^2=0,989$, llegándose por tanto a la conclusión de que la cinética del proceso de adsorción del equilibrio se adapta mejor a un modelo de pseudo segundo orden.

4.6.1. Aplicabilidad de adsorción

En este apartado se ha realizado un ensayo que ha consistido en preparar una disolución con la misma cantidad de mercaptopurina (1 mL), diluida en un volumen de agua mayor (1L), obteniendo una concentración menor de mercaptopurina (1 g/L) para posteriormente mezclarlo con la misma cantidad de adsorbente (10 mg), con el fin de comprobar si el adsorbente continúa siendo eficaz en cantidades de agua mayores para finalmente comprobar si tendría aplicabilidad, por ejemplo, en el tratamiento de aguas residuales.

Se realizó única inyección para cada caso y se cuantificó la concentración real que quedaba de mercaptopurina en la muestra final, haciendo uso de la ecuación de la recta.

La tabla 15 muestra las concentración real de 6-MP que quedaba tras llevar a cabo la adsorción del compuesto.

Adsorbente	Área	Concentración(mg/L)
CuBTC	0,0064	< LOQ

Tabla 15. Concentración de la 6-MP referida al estudio de adsorción a niveles bajos de concentración

Los resultados muestran que el CuBTC sigue siendo eficaz en su acción como adsorbente sobre la 6-MP incluso a niveles bajos de concentración del analito, llegándose a la conclusión de que presenta gran aplicabilidad en el tratamiento de aguas, con el fin de evitar la contaminación de la misma por la presencia de fármacos y medicamentos.

4.7. Estudio de desorción

El estudio de adsorción se ha centrado en la búsqueda de un compuesto que pueda retener sobre su superficie al analito de interés, con vistas a una posterior aplicabilidad en lo referido a evitar una contaminación de las aguas. El estudio complementario por tanto, ha consistido en analizar una serie de disolventes que generen la desorción de la mercaptopurina del CuBTC debido a la mayor afinidad que presentan estos nuevos disolventes con el analito (6-MP).

Las condiciones fijadas para llevar a cabo la adsorción han sido las establecidas anteriormente, pH neutro, 5 min de tiempo de agitación y 10 mg de CuBTC, mezclados con 10 mL de disolución de 10 mg/L en mercaptopurina, tomados a partir de una disolución de 100 mg/L preparada en medio acuoso. Para llevar a cabo la desorción, se ha añadido 1 mL de cada disolvente a los tubos que contenían al sólido que contenía al analito adsorbido, de manera que la mercaptopurina que había quedado retenida, podrá desorberse en ese nuevo disolvente añadido. De nuevo, se realizó una única inyección para cada caso y se cuantificó la concentración de 6-MP que quedaba en disolución en dos momentos diferentes del procedimiento, tras haber realizado el proceso de adsorción y tras realizar la desorción posteriormente.

La tablas 16 y 17 muestran las concentraciones obtenidas de 6-MP tras llevar a cabo la adsorción y desorción respectivamente.

	Disolvente	Concentración 6-MP muestra problema(mg/L)
CuBTC	1	-0,6631
	2	-0,6893
	3	-0,6946
	4	-0,6946
	5	-0,6893
	6	-0,6946

	Disolvente	Concentración 6-MP muestra problema(mg/L)
CuBTC	MeOH	< LOD
	AcN	< LOD
	Tetrahidrofloruro	< LOD
	NaOH	< LOD
	DMSO	< LOD
	EtOH	< LOD

Tabla 16. Concentración de 6-MP tras el proceso de adsorción Tabla 17. Concentración de 6-MP tras el proceso de desorción

En todos los casos se ha añadido 1 mL de disolvente para que ejerzan su acción desorbente, excepto en el caso del NaOH en donde se ha añadido 0,5 mL y posteriormente, antes de pinchar la disolución en la columna, se han añadido otros 0,5 mL de HCl para neutralizar la mezcla.

Se concluye con que ninguno de los disolventes utilizados son útiles pueden utilizarse para desorber la 6-MP, ya que las concentraciones de las disoluciones resultantes son claramente inferiores a las esperadas.

4.8. Aplicabilidad de la metodología utilizada. Muestras reales

Un vez ha sido validada la metodología propuesta para la determinación de 6-Mercaptopurina, el objetivo principal de este trabajo, y la aplicación real que se le da a la metodología consiste en hacer dos comprobaciones. Por un lado, se desea conocer si el medicamento suministrado a los pacientes presenta realmente la concentración que debe presentar el preparado farmacéutico, mientras que por otro lado, se desea conocer la concentración que presenta el medicamento de retorno tras haber sido ingerido por los pacientes. El objetivo final de todo esto es determinar el motivo por cual el medicamento no es efectivo para todos los casos, de modo que las dos opciones posibles que se plantean son, o bien que el jarabe no esté siendo preparado correctamente, o bien que no esté siendo bien agitado antes de cada toma, de manera

que se formen distintas fases dentro del recipiente dando lugar a una muestra heterogénea y en consecuencia una incorrecta dosificación del fármaco.

Este estudio por tanto, ha consistido en analizar cuatro muestras reales que han sido suministradas por el Hospital Universitario, de las cuales dos de ellas se corresponden con el medicamento preparado por el personal sanitario, y las otras dos se corresponden con el jarabe de retorno enviado por los pacientes tras haber finalizado el tratamiento, cuya concentración debería ser en ambos casos de 200 mg/L en mercaptopurina.

Las tablas 18 y 19 muestran los valores de concentraciones de mercaptopurina presente en las dos muestras de jarabe preparadas por el personal sanitario. Se han realizado 6 inyecciones para cada una de las muestras y posteriormente se ha cuantificado la mercaptopurina presente en ellas, para de esta manera poder comprobar que las concentraciones obtenidas coincidían con la concentraciones teóricas que debía presentar cada preparado.

Muestra 1 HUC	Concentración 6-MP (mg/L) en 25(mL)	Concentración 6-MP (mg/L) en 2(mL)
Inyección 1	196,3	24531
Inyección 2	194,2	24271
Inyección 3	203,0	25378
Inyección 4	193,6	24206
Inyección 5	195,2	24401
Inyección 6	195,2	24401
Inyección 7	193,6	24206
Inyección 8	196,3	24531
Inyección 9	195,2	24401
Inyección 10	194,2	24271

Tabla 18. Concentración de 6-MP en los jarabes preparados en el HUC(muestra 1)

Muestra 2 HUC	Concentración 6-MP (mg/L) en 25(mL)	Concentración 6-MP (mg/L) en 2(mL)
Inyección 1	202,5	25313
Inyección 2	202,0	25247
Inyección 3	202,5	25313
Inyección 4	203,5	25443
Inyección 5	203,0	25378
Inyección 6	211,4	26419
Inyección 7	210,8	26354
Inyección 8	210,3	26289
Inyección 9	208,8	26094
Inyección 10	202,0	25247

Tabla 19. Concentración de 6-MP en los jarabes preparados en el HUC(muestra 2)

Las tablas 20 y 21 muestran los valores de concentraciones de mercaptopurina presente en las dos muestras de jarabe que han sido retornadas al hospital por los pacientes. Se han realizado 2 inyecciones para cada una de las muestras y posteriormente se ha cuantificado la mercaptopurina presente en ellas ,para de esta manera comprobar que las concentraciones obtenidas coincidían con la concentraciones teóricas que debía presentar cada preparado.

Muestra 2 HUC	Concentración 6-MP (mg/L) en 25(mL)	Concentración 6-MP (mg/L) en 2(mL)
Inyección 1	188,4	23555
Inyección 2	190,0	23750

Tabla 20. Concentración de 6-MP en los jarabes de retorno (muestra 1)

Muestra 2 HUC	Concentración 6-MP (mg/L) en 25(mL)	Concentración 6-MP (mg/L) en 2(mL)
Inyección 1	200,9	25117
Inyección 2	201,5	25182

Tabla 21. Concentración de 6-MP en los jarabes de retorno (muestra 1)

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir con que las concentraciones obtenidas presentan valores muy próximos a los esperados y en consecuencia, tanto el jarabe había sido preparado correctamente, como la administración del medicamento había sido suministrada de manera adecuada, asegurando de esta manera la correcta elaboración y dosificación del fármaco. Como resultado, se deduce que el hecho de que el medicamento no sea efectivo para todos los pacientes no está directamente relacionado con una incorrecta elaboración del fármaco o una mala administración del medicamento por parte de los pacientes.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los datos obtenidos en el presente Trabajo de Fin de Grado se puede hacer las siguientes conclusiones:

- Se ha realizado una búsqueda bibliográfica de diferentes metodologías con el fin de obtener un método adecuado para llevar a cabo la determinación de la 6-Mercaptopurina, encontrándose que las técnicas cromatográficas son las que mejor se adaptan a este tipo de separación, concretamente HPLC.
- Se ha seleccionado a la 6-Mercaptopurina como analito de interés dada su importancia en el tratamiento de la Leucemia Linfocítica Aguda y se ha desarrollado un método para su determinación con fines terapéuticos.
- La separación y determinación del analito seleccionado ha sido llevada a cabo con éxito mediante el uso de HPLC, con tiempos de análisis inferiores a 5 min, utilizando unas condiciones cromatográficas optimizadas con un régimen isocrático de concentración y temperatura, empleando como fase móvil una disolución formada por la combinación de agua al 0.2% de H₃PO₄ y MeOH al 70 y 30% respectivamente, con un flujo constante de fase móvil de 1 mL/min. El tiempo de análisis de cada cromatograma fue de 5 min.

La detección del analito se llevó a cabo mediante un detector PDA de diodo array, a una longitud de onda de 322 nm.

- La metodología se validó satisfactoriamente a través de los estudios de repetibilidad, así como a través de los valores obtenidos para los parámetros de calibración correspondientes a las dos rectas de calibrado.
- Se ha seleccionado al CuBTC como el adsorbente más adecuado para retener al analito de interés entre una serie de compuestos propuestos en base a sus propiedades y características físico-químicas.
- Se han establecido las condiciones de máxima adsorción tras evaluar el pH, la cantidad de adsorbente y la cinética que mejor se adapta al proceso de adsorción.
- Se ha demostrado que el CuBTC sigue presentando acción adsorbente incluso a niveles bajos de concentración del analito, pudiendo presentar aplicabilidad en procesos de descontaminación de las aguas.
- El estudio de desorción no ha presentado resultados satisfactorios ya que no se ha encontrado ningún disolvente adecuado para llevar a cabo la remoción del analito.

Glosario

A

AcH

ACN

Acetonitrilo

ADN

Ácido desoxirribonucleíco

ARN

Ácido ribonucleíco

B

BOE

Boletín Oficial del Estado

C

CE

Contaminantes emergentes

CG

Cromatografía de gases

CL

Cromatografía líquida

CLAE

Cromatografía líquida de alta eficacia

CLC

Columna de cromatografía líquida

D

DMSO

Dimetil sulfóxido

E

EtOH

Etanol

EPA

Agencia de Protección del Medio Ambiente

H

HCl

Ácido clorhídrico

HPLC

Cromatografía líquida de alta eficacia

I

IUPAC

Unión internacional de Química Pura y Aplicada

L

LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación

M

MeOH	Metanol
MOF	Estructura organo-metálica
MP	Mercaptopurina

N

NaOH	Hidróxido sódico
NCA	Normas de Calidad Ambiental

O

OMS	Organización Mundial de la Salud
-----	----------------------------------

P

PDA	Detector de diodo array
-----	-------------------------

R

RP-HPLC	Cromatografía de alta eficacia en fase reversa
RSD	Desviación estándar relativa

S

S/R	Relación señal/ruido
-----	----------------------

T

TGMP	Tioguanosina monofosfato
THF	Tetrahidrofluoruro
TIMP	Tioinosina monofosfato

U

UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta

Referencias

A

- Armost Zikal; Maksym Opanasenko; Miroslav Rubes; Petr Nachtigall y Jacek Jagiello (2015). *Catalysis today*, 243, 69-75.

B

- Bondia Roig, José D. Tesis final de Master. Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente .*Universidad Politécnica de Valencia*.
- Bottai, T; Hue, B; Hillairebuys, D; Barbe, A; Alric, R; Puget, R y Petit, P (1995). *Journal of affective disorders*, 36, 21-27.
- Brega, A; Prandini, P; Amaglio, C y Pafumi, E (1990). *Journal of Cromatography*, 535, 311-316.

D

- Demirci, MA; Ipek, Y; Gul, F; Ozen, T y Demirtas, I(2018). *Food chemistry*, 269, 111,117.

E

- España. Ley Orgánica 60/2011, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas. BOE, 22 de enero de 2011, núm 19,p. 5-15.

G

- González Meneses-López (2016). *Pediatría integral*, 6, 359-366.
- Gutiérrez Sevillano, Juan José (2011). *Revista del grupo especializado de adsorción de la RSEQ*, 1.

J

- Janet Gil, Miriam; Soto, Adriana María; Usma, Jorge Iván y Gutiérrez, Omar Darío (2012). *Producción + Limpia*, 7, 52-73.

K

- Kerti, M. Naik y Sharanappa T. Nandibewoor (2013). *Journal of Analytical Chemistry*, 68, 1085-108.
- Kim, KK; Escobedo, JO; St. Luce, NN; Rusin, O; Wong, D y Strongin, RM (2003). *Organic letters*, 5, 5007-5010.

L

- Losa Frías, V; Herrera López, M; Cabello García, I y Navas Alonso, PI (2016). *Pediatría integral*, 6, 367-379.

T

- Tejada, Candelaria; Quiñonez, Edgar; Peña, Margaret (2014). *Facultad de Ciencias Básicas*, 10, 80-101.

