

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



Facultad de Química
Departamento de Química Analítica

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
REGISTRE GENERAL
ENTRADA

14 JUL. 2005

N.º 99279 (3443)
HORA 11:37
OFICINA AUXILIAR NÚM. 15

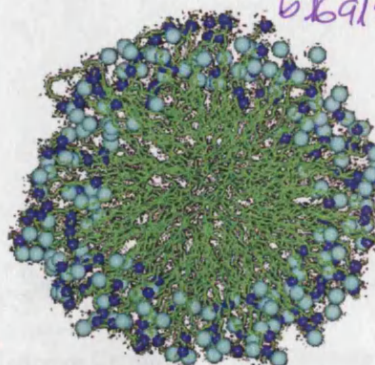
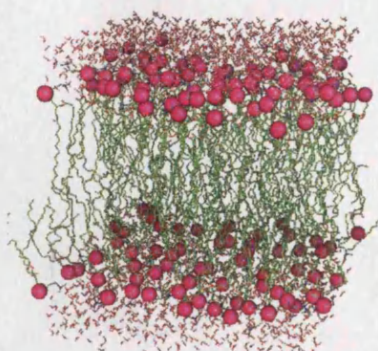


**Estimación de la hidrofobicidad de
compuestos orgánicos mediante
cromatografía líquida micelar.
Implicaciones en los procesos
biológicos de reparto**

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

Nº Registre 24.510
DATA 17-I-06
SIGNATURA
TD-Q 628
Nº LIBIS: i19257077

b.6915306 30cm



TESIS DOCTORAL

Laura Escuder Gilabert

Valencia, 2005

UMI Number: U603154

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U603154

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

D^a. MARÍA JOSÉ MEDINA HERNÁNDEZ, D^a. ROSA MARÍA VILLANUEVA CAMAÑAS y D.
SALVADOR SAGRADO VIVES, Profesores Titulares de Universidad del Departamento de Química
Analítica de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria titulada *"Estimación de la hidrofobicidad de compuestos orgánicos mediante cromatografía líquida micelar. Implicaciones en los procesos biológicos de reparto"*, realizada en el Departamento de Química Analítica de la Universitat de València, constituye la Tesis Doctoral de D^a. LAURA ESCUDER GILABERT.

Asimismo, certifican haber dirigido y supervisado los distintos aspectos del presente trabajo así como su redacción.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Valencia, a 30 de junio de dos mil cinco.

D^a. María José Medina Hernández

D^a. Rosa María Villanueva Camañas

D. Salvador Sagrado Vives

PUBLICACIONES

Los resultados recogidos en esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- L. Escuder Gilabert, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernández. *"Quantitative retention-structure and retention-activity relationship studies of local anesthetics by micellar liquid chromatography"*. Analytical Chemistry, 70/1 (1998) 28-34.
- L. Escuder Gilabert, J.M. Sanchis Mallols, S. Sagrado, M.J. Medina Hernández, R.M. Villanueva Camañas. *"Chromatographic quantitation of the hydrophobicity of ionic compounds by the use of micellar mobile phases"*. Journal of Chromatography A, 823/(1-2) (1998) 549-559.
- L. Escuder Gilabert, Y. Martín-Biosca, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernández, S. Sagrado. *"The chromatographic quantification of hydrophobicity using micellar mobile phases"*. Chromatographia, 50/(5-6) (1999) 325-332.
- L. Escuder Gilabert, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernández. *"Development of predictive retention-activity relationships models of non-steroidal anti-inflammatory drugs by micellar liquid chromatography: comparison with immobilized artificial membrane columns"*. Journal of Chromatography B, 740/1 (2000) 59-70.
- L. Escuder Gilabert, Y. Martín Biosca, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernández. *"Biopartitioning micellar chromatography to predict ecotoxicity"*. Analytica Chimica Acta, 448/(1-2) (2001) 173-185.
- Y. Martín Biosca, L. Escuder Gilabert, M.L. Marina, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernández. *"Quantitative retention- and migration-toxicity relationships of phenoxy acid herbicides in micellar liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography"*. Analytica Chimica Acta, 443/2 (2001) 191-203.
- L. Escuder Gilabert, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernández. *"Quantitative structure-retention relationships for ionic and non-ionic compounds in biopartitioning micellar chromatography"*. Biomedical Chromatography, 19/2 (2005) 155-168.
- L. Escuder Gilabert, Y. Martín Biosca, M. Molero Monfort, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernández. *"Biopartitioning Micellar Chromatography: an in vitro technique for predicting drug permeability"* en *"Recent Research Developments in Medicinal Chemistry"* (ISBN: 81-7895-029-4). Transworld Research Network (editorial), 1 (2001) 93-107.

- L. Escuder Gilabert, J.J. Martínez Pla, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camañas, M.J. Medina Hernández. *"Biopartitioning micellar separation methods: modelling drug absorption"*. Journal of Chromatography B, 797/(1-2) (2003) 21-35.

Esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de los objetivos planteados en los siguientes proyectos de investigación:

- **Proyecto SAF96-1709:** *"Estimación de la hidrofobicidad de fármacos por Cromatografía Líquida Micelar. Implicaciones en los procesos biológicos de reparto"*. Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT). Plan Nacional de Salud y Farmacia.
Duración: 26 / 04 / 1996 - 26 / 04 / 1999.
- **Proyecto SAF99-0110:** *"Aplicación de la Cromatografía Líquida Micelar como una técnica in vitro para la predicción de propiedades farmacocinéticas y actividad biológica de fármacos que actúan en el sistema nervioso central"*. Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT). Plan Nacional de Salud y Farmacia.
Duración: 01 / 06 / 1999 - 01 / 06 / 2002.
- **Proyecto SAF2002-01330:** *"Desarrollo de sistemas cromatográficos y electroforéticos micelares como técnicas in vitro para el estudio de la permeabilidad de xenobióticos. Implicaciones farmacológicas y toxicológicas"*. Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT) y Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Plan Nacional de Biomedicina.
Duración: 01 / 12 / 2002 - 01 / 12 / 2005.

Esta Tesis Doctoral se ha realizado gracias a una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI99-02-99) concedida por la Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana. Duración: 01 / 03 / 1999 – 28 / 02 / 2003.

AGRADECIMIENTOS

Llegado este momento, culminación de una etapa clave para mi formación y ante todo de una ilusión personal, quiero expresar mi más sincera gratitud a todas las personas que han contribuido a que esta Tesis Doctoral sea una realidad.

A mis Directores de Tesis, las Doctoras D^ª. Rosa María Villanueva Camañas y D^ª. María José Medina Hernández y el Doctor D. Salvador Sagrado Vives. Por toda la formación que me han dado y los conocimientos que me han transmitido. Por sus valiosos e instructivos consejos, su incommensurable ayuda, su apoyo incondicional y la confianza depositada en mí. Por la atención prestada en todo momento sin reparar en el menor esfuerzo y por su infinita paciencia y minuciosidad a fin de obtener el mejor resultado posible e incrementar la valía de esta Tesis Doctoral. Por transmitirme y "empaparme" de ese buen hacer y esa ilusión en el trabajo. Por sus ánimos constantes, su sonrisa y buen humor en todo momento y por todo su sustento, interés e implicación personal que me han mostrado. Por una infinidad de cosas más por las que siempre les estaré agradecida, pero ante todo por sus excepcionales cualidades profesionales y humanas, su sincero aprecio y su amistad. Ha sido para mí un verdadero un placer conocerlos y un gran honor haber contado con vosotros como Directores de esta Tesis Doctoral. GRACIAS.

A la Doctora D^ª. Yolanda Martín Biosca por toda la ayuda que me ha prestado, el tiempo que me ha brindado y su valiosa colaboración en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Por ser una compañera excepcional y una amiga incondicional, incluso en esas situaciones un poco más complicadas en las que siempre me ha escuchado, me ha apoyado y me ha ayudado. Por la serenidad que transmite y su carácter tan afable lo que siempre contribuye a crear un clima de trabajo agradable, ameno y consecuentemente más fructífero. Por las risas que hemos compartido y los buenos momentos que juntas hemos disfrutado.

A todos mis compañeros del laboratorio durante estos años: Clara, Fernando, Irene, Mónica Cuenca, Juan, José María Sanchis, José Luis, Carla, Juanjo, Nancy, Mónica Molero, Carmen, José María Bermúdez, María Amparo, Sagrario y Raquel. Todos vosotros me habéis ayudado durante este tiempo y de todos vosotros he aprendido algo de uno u otro modo, por lo que os estoy profundamente agradecida. También quiero daros las gracias por el clima de compañerismo vivido en el laboratorio y por los divertidos momentos que hemos disfrutado, lo que siempre repercute en un día a día más ameno y hace más llevadera y grata la a veces ardua tarea de investigar. En todos vosotros he encontrado compañeros de trabajo y en algunos verdaderos amigos y "compañeros de fatigas" con los que sé que siempre podré contar y que siempre podréis contar conmigo. Ha sido y es un verdadero placer trabajar y compartir el día a día con vosotros.

A todo el personal de administración y servicios, docente e investigador del Departamento de Química Analítica de la Universitat de València, por su acogida en el Departamento y por la ayuda prestada durante todos estos años. Quisiera hacer una mención especial a las Doctoras D^ª. Pilar Campins, D^ª. Adela Sevillano, D^ª. Carmen Pascual y D^ª. Amparo Salvador por todo el interés que han mostrado durante el transcurso de mi doctorado, por la ayuda que me han dado cuando se la he solicitado y por las agradables conversaciones que hemos compartido.

A la Fundación Aguas de Valencia quisiera agradecer la oportunidad que me dio para mi estancia en la empresa GAMASER, S.L. La experiencia vivida fue realmente instructiva, me sirvió para desarrollar y poner en práctica parte del potencial y conocimientos adquiridos durante la licenciatura y ganar en autoconfianza y me proporcionó una visión y un primer contacto con el mundo empresarial. Todo ello, sin lugar a dudas, junto con mi experiencia vivida durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, ha repercutido en mi forma de trabajo en el laboratorio, en la forma de enfrentarme a los problemas planteados, en mi formación y en mi futuro como profesional. Quisiera hacer extensivo este agradecimiento al Doctor D. Emilio Bonet Domingo, persona responsable del área de Física y Química de GAMASER, por todo el tiempo que me dedicó y todos los conocimientos que me transmitió en el manejo del ICP y en Sistemas de Calidad. Por su excelente carácter, su buen humor, su amabilidad y el haberme brindado su amistad. También quisiera agradecerle la cesión de los patrones de plaguicidas utilizados en esta Tesis Doctoral.

En estas líneas no me puedo olvidar de mi familia, por ello quiero agradecer a mis padres toda su lucha y los sacrificios desinteresados que han realizado para que yo, entre otras muchas cosas, pudiera llegar a este momento. Sin su aliento constante, su amor, su ternura, sus consejos, su confianza ciega en mí, su protección, su respeto, los valores que me han transmitido y la felicidad que me han proporcionado, hoy no sería la persona que soy y esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible. Papá y Mamá, me faltan palabras para expresar mi eterna gratitud y los sentimientos que me embargan en estos instantes, sólo puedo decirlos que os quiero muchísimo y que estoy muy orgullosa de mis padres.

A Antonio Luis, mi marido, mi compañero y mi amigo. Por su comprensión, por no hacerme jamás ningún tipo de reproche y por haberme soportado con inagotable paciencia. Por su amor desprendido, por anteponer mi bienestar a todo, por haberme protegido, mimado y haber celado mi felicidad y no permitir que nada ni nadie pudieran hacer mella en ella, incluso en esas situaciones tan duras en las que parece que "la vida nos pone a prueba o nos reta". Por todos los acontecimientos felices que juntos hemos vivido y porque a su lado los duros momentos son más llevaderos y todos los obstáculos parecen superables. Gracias por haber estado siempre ahí, por haberme escuchado y haberme ayudado a seguir adelante día a día.

A toda mi familia a la que tanto quiero, respeto, admiro y que me han dado tanto sin esperar nada a cambio. A mi abuela y mis tíos que siempre han estado tan orgullosos de "su Laura", que nunca me han fallado y siempre han estado a mi lado. A mis primos, mis "primos del alma", que han sido siempre para mí mis hermanos. A mis suegros y mis cuñados que me acogieron desde el primer momento como una hija o una hermana, gracias por vuestro sincero afecto, vuestro respeto y vuestros ánimos para seguir siempre adelante. Tengo la inmensa satisfacción de ser "tía numerosa", gracias a todos mis sobrinos a los que adoro, que me han proporcionado momentos de tanta ternura y que siempre han sido capaces de dibujarme la mejor de mis sonrisas. A mis abuelitos y mis tíos Baldo y Pepe, a los que siempre tengo en mi pensamiento y en mi corazón.

Gracias a todos y cada uno de vosotros que me habéis hecho sentir una persona muy afortunada. Esta Tesis no es más que una muestra de los conocimientos que todos y cada uno de vosotros me habéis transmitido, del trabajo y la ilusión diaria que juntos hemos compartido y de los logros que juntos hemos alcanzado. ¡Sois excepcionales!. ¡GRACIAS!.

A mis padres

A Antonio Luis



Índice

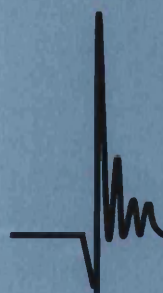
I.- Introducción	1
I.1.- Visión global sobre los métodos alternativos al uso de animales de experimentación	3
I.2.- Relaciones (cuantitativas) estructura-actividad ((Q)SAR)	5
I.2.1.- Perspectiva histórica de los estudios (Q)SAR	5
I.2.2.- Objetivos de los estudios QSAR	8
I.2.3.- Variables	10
I.2.4.- Los estudios (Q)SAR en la actualidad	11
I.3.- Métodos para la estimación de la hidrofobicidad de compuestos	17
I.3.1.- Métodos experimentales directos para la determinación de la relación de reparto o de distribución <i>n</i> -octanol/agua	19
I.3.2.- Métodos indirectos para la estimación de la relación de reparto <i>n</i> -octanol/agua basados en las relaciones lineales de la energía de solvatación	23
I.3.3.- Métodos para la estimación de la relación de reparto <i>n</i> -octanol/agua a partir de la estructura molecular de los compuestos	24
I.4.- Relaciones cuantitativas estructura-retención (QSRR). Métodos cromatográficos para la estimación de la hidrofobicidad	25
I.4.1.- Cromatografía de capa fina (TLC)	27
I.4.2.- Cromatografía líquida en fase inversa (RP-HPLC) convencional	29
I.4.2.1.- Fases estacionarias	30
I.4.2.2.- Modo isocrático de RP-HPLC	32
I.4.2.3.- Elución por gradiente en RP-HPLC	36
I.4.3.- Cromatografía líquida micelar (MLC)	37
I.4.3.1.- Estimación de la hidrofobicidad de compuestos mediante MLC	41
I.4.4.- Cromatografía electrocinética (EKC)	49
I.4.4.1.- Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)	50
I.4.4.2.- Cromatografía electrocinética con microemulsiones (MEEKC)	51
I.4.4.3.- Cromatografía electrocinética con vesículas (VEKC) y con liposomas (LEKC)	53
I.5.- Relaciones (cuantitativas) retención-actividad ((Q)RAR)	55
I.5.1.- Membranas artificiales inmovilizadas (IAM)	57
I.5.2.- Cromatografía con biomembranas inmovilizadas (IBC)	62
I.5.3.- Cromatografía líquida micelar (MLC)	63
I.5.3.1.- Cromatografía micelar de bio-reparto (CMB)	64
I.5.4.- Nuevas fases estacionarias para la evaluación de las interacciones xenobiótico-biomacromolécula	73
I.5.5.- Cromatografía electrocinética (EKC)	74

II.- Objetivos	75
III.- Experimental y metodología general	79
III.1.- Reactivos	81
III.2.- Instrumentación	82
III.3.- Acondicionamiento de los sistemas cromatográficos y electroforéticos	84
III.4.- Cálculo de los factores de retención y de los factores de afinidad	85
III.5.- Evaluación estadística de los modelos	88
III.6.- Programas informáticos utilizados.....	91
III.7.- Nomenclatura utilizada	93
IV.- Relaciones cuantitativas retención-hidrofobicidad en cromatografía líquida micelar.	
I.- Compuestos neutros	99
IV.1.- Introducción	101
IV.2.- Experimental y metodología	103
IV.2.1.- Experimental	103
IV.2.2.- Datos	104
IV.2.3.- Procedimiento	104
IV.2.4.- Capacidad de descripción y predicción de los modelos	105
IV.3.- Resultados y discusión	111
IV.3.1.- Modelos para la predicción de $\log P$ para diferentes series de compuestos	111
IV.3.2.- Modelos para la predicción de $\log P$ de nuevos compuestos a partir de una serie de calibración independiente	120
IV.4.-Conclusiones	124
V.- Relaciones cuantitativas retención-hidrofobicidad en cromatografía líquida micelar.	
II.- Compuestos iónicos	125
V.1.- Introducción	127
V.2.- Experimental y datos	129
V.3.- Resultados y discusión	136
V.3.1.- Relaciones retención – hidrofobicidad	136
V.3.2.- Relaciones $\log k$ - hidrofobicidad para catecolaminas	138
V.3.3.- Relaciones $\log k$ - hidrofobicidad para diuréticos	141
V.3.4.- Relaciones $\log k$ - hidrofobicidad para derivados OPA-NAC de aminoácidos	145
V.3.5.- Relaciones $\log k$ - hidrofobicidad para anestésicos locales	147
V.3.6.- Relaciones $\log k$ - hidrofobicidad para antiinflamatorios no esteroideos	150
V.4.-Conclusiones	153

VI.- Relaciones cuantitativas retención-hidrofobicidad en cromatografía líquida micelar.	
III.- Modelos generales en cromatografía micelar de bio-reparto	155
VI.1.- Introducción	157
VI.2.- Experimental y metodología	159
VI.2.1.- Experimental	159
VI.2.2.- Cálculo de los factores de retención	160
VI.2.3.- Capacidad de descripción y predicción de los modelos	160
VI.3.- Resultados y discusión	164
VI.3.1.- Interacciones que gobiernan la retención en CMB. Estudio univariante	171
VI.3.2.- Variables para la descripción de la retención en CMB. Estudio multivariante	177
VI.3.3.- Modelos de retención	179
VI.3.3.1- Modelos MLR	179
VI.3.3.2- Modelos no lineales alternativos	183
VI.4.-Conclusiones	187
VII.- Relaciones cuantitativas actividad-retención en cromatografía micelar de bio-reparto.	
I.- Farmacología: anestésicos locales y antiinflamatorios no esteroideos	189
VII.1.- Introducción	191
VII.1.1.- Farmacología de anestésicos locales	193
VII.1.2.- Farmacología de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	196
VII.2.- Datos y metodología	199
VII.3.- Resultados y discusión	199
VII.3.1.- Comportamiento de retención de los anestésicos locales y de los AINEs en cromatografía micelar de bio-reparto	199
VII.3.2.- Relaciones actividad - retención para los anestésicos locales en CMB	201
VII.3.3.- Relaciones actividad - retención para los AINEs en CMB	207
VII.3.4.- Modelos CMB-QRAR frente a IAM-QRAR	213
VII.3.5.- Ventajas e inconvenientes de los sistemas CMB e IAM en la obtención de modelos QRAR	217
VII.4.- Conclusiones	219
VIII.- Relaciones cuantitativas actividad-retención en cromatografía micelar de bio-reparto.	
II.- Modelos generales de ecotoxicidad	221
VIII.1.- Introducción	223
VIII.2.- Experimental y metodología	226
VIII.2.1.- Experimental	226
VIII.2.2.- Programas	227
VIII.2.3.- Capacidad de descripción y predicción de los modelos QRAR y QSAR	228

VIII.3.- Resultados y discusión	228
VIII.3.1.- Análisis exploratorio de los datos	228
VIII.3.2.- Relaciones ecotoxicidad-retención	238
VIII.3.3.- Comparación con los modelos QSAR clásicos	242
VIII.4.- Conclusiones	244
IX.- Relaciones cuantitativas actividad-retención en cromatografía micelar de bio-reparto. III.- Ecotoxicidad de fenoxiácidos. Comparación con cromatografía electrocinética micelar	245
IX.1.- Introducción	247
IX.2.- Experimental y datos	248
IX.2.1.- Experimental	248
IX.2.2.- Datos	249
IX.2.3.- Capacidad de descripción y predicción de los modelos	249
IX.3.- Resultados y discusión	250
IX.3.1.- Comportamiento de retención de fenoxiácidos en MEKC y CMB	250
IX.3.2.- Relaciones ecotoxicidad-retención	253
IX.3.3.- Modelos MEKC-QRAR <i>versus</i> CMB-QRAR de ecotoxicidad de fenoxiácidos	263
IX.4.-Conclusiones	265
X.- Conclusiones	267
XI.- Bibliografía	271
XII.- Anexos	311
XII.1.- Anexo I: Nomenclatura	313
XII.1.1.- Siglas	313
XII.1.2.- Descriptores estructurales y propiedades fisico-químicas	315
XII.1.3.- Parámetros cromatográficos	316
XII.1.4.- Parámetros electroforéticos	317
XII.1.5.- Actividades biológicas	318
XII.1.6.- Parámetros estadísticos	319
XII.2.- Anexo II: Compendio de estructuras moleculares, valores del logaritmo de las relaciones de reparto <i>n</i> -octanol/agua y de las constantes de protonación de los compuestos estudiados.....	320
XII.2.1.- Anestésicos locales	321
XII.2.2.- Antiepilépticos	322
XII.2.3.- Antidepresivos tricíclicos	323
XII.2.4.- Antihistamínicos	325
XII.2.5.- Antiinflamatorios no esteroideos	326

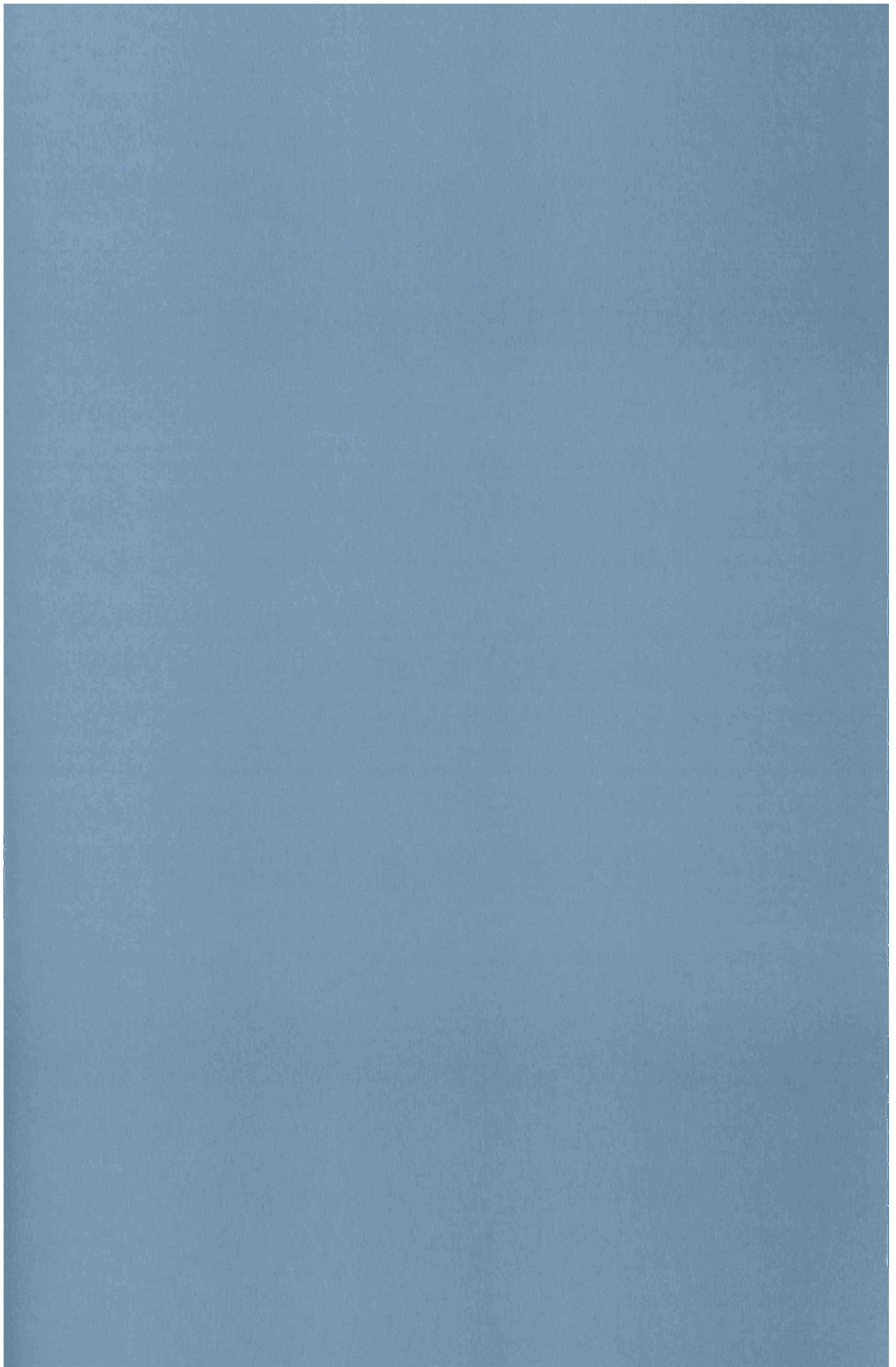
XII.2.6.- Antipsicóticos	328
XII.2.7.- Barbitúricos	330
XII.2.8.- Benzodiazepinas	331
XII.2.9.- β -Bloqueantes	332
XII.2.10.- Catecolaminas	333
XII.2.11.- Derivados del benceno mono- y di- sustituidos	334
XII.2.12.- Derivados OPA-NAC de aminoácidos	335
XII.2.13.- Diuréticos	336
XII.2.14.- Fenilureas	337
XII.2.15.- Fenoles	338
XII.2.16.- Fenoxiácidos	339
XII.2.17.- Hidrocarburos aromáticos	340
XII.2.18.- Otros plaguicidas	341
XII.2.19.- Otros compuestos orgánicos	343
XII.3.- Anexo III: Propiedades de los surfactantes utilizados	344



CAPÍTULO I

Introducción

I.1.- Visión global sobre los métodos alternativos al uso de animales de experimentación	3
I.2.- Relaciones (cuantitativas) estructura-actividad ((Q)SAR)	5
I.2.1.- Perspectiva histórica de los estudios (Q)SAR	5
I.2.2.- Objetivos de los estudios QSAR	8
I.2.3.- Variables	10
I.2.4.- Los estudios (Q)SAR en la actualidad	11
I.3.- Métodos para la estimación de la hidrofobicidad de compuestos	17
I.3.1.- Métodos experimentales directos para la determinación de la relación de reparto o de distribución <i>n</i> -octanol/agua	19
I.3.2.- Métodos indirectos para la estimación de la relación de reparto <i>n</i> -octanol / agua basados en las relaciones lineales de la energía de solvatación	23
I.3.3.- Métodos para la estimación de la relación de reparto <i>n</i> -octanol/agua a partir de la estructura molecular de los compuestos	24
I.4.- Relaciones cuantitativas estructura-retención (QSRR). Métodos cromatográficos para la estimación de la hidrofobicidad	25
I.4.1.- Cromatografía de capa fina (TLC)	27
I.4.2.- Cromatografía líquida en fase inversa (RP-HPLC) convencional	29
I.4.2.1.- Fases estacionarias	30
I.4.2.2.- Modo isocrático de RP-HPLC	32
I.4.2.3.- Elución por gradiente en RP-HPLC	36
I.4.3.- Cromatografía líquida micelar (MLC)	37
I.4.3.1.- Estimación de la hidrofobicidad de compuestos mediante MLC	41
I.4.4.- Cromatografía electrocinética (EKC)	49
I.4.4.1.- Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)	50
I.4.4.2.- Cromatografía electrocinética con microemulsiones (MEEKC)	51
I.4.4.3.- Cromatografía electrocinética con vesículas (VEKC) y con liposomas (LEKC)	53
I.5.- Relaciones (cuantitativas) retención-actividad ((Q)RAR)	55
I.5.1.- Membranas artificiales inmovilizadas (IAM)	57
I.5.2.- Cromatografía con biomembranas inmovilizadas (IBC)	62
I.5.3.- Cromatografía líquida micelar (MLC)	63
I.5.3.1.- Cromatografía micelar de bio-reparto (CMB)	64
I.5.4.- Nuevas fases estacionarias para la evaluación de las interacciones xenobiótico – biomacromolécula	73
I.5.5.- Cromatografía electrocinética (EKC)	74



I.1.- Visión global sobre los métodos alternativos al uso de animales de experimentación

Uno de los proyectos de continua vigencia entre la comunidad científica es el estudio del modo en que los compuestos orgánicos interaccionan y afectan a los organismos vivos o a partes de ellos (p. ej., enzimas, orgánulos, etc.). Así, la toxicología medioambiental tanto de productos industriales como naturales suscita cada vez un interés mayor, debido en primer lugar al gran número de moléculas capaces de inducir un efecto tóxico y en segundo lugar a que el número de formas de vida existentes es desconocido (plantas, mamíferos, aves, insectos, bacterias, virus, etc.) y conforman un número muy elevado de sistemas bioquímicos. Es un hecho que cada año las compañías farmacéuticas y químicas invierten del orden de miles de millones de euros en el desarrollo de nuevos fármacos o plaguicidas. A modo de ejemplo, se ha estimado que el tiempo necesario para la puesta en el mercado de un fármaco nuevo es de diez años y el coste económico de más de 600 millones de euros.

Como consecuencia del desarrollo de la química combinatoria, la industria química y farmacéutica se encuentra ante un gran reto, la necesidad de evaluar un gran número de compuestos con actividad biológica potencial. Los estudios para la selección de las moléculas candidatas incluyen, en el campo de la farmacología, la evaluación de sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas y en el campo medioambiental de su ecotoxicidad. Estos estudios se han realizado tradicionalmente mediante una serie de ensayos "*in vivo*" que generalmente son muy laboriosos y costosos desde el punto de vista experimental y económico, respectivamente. Actualmente, debido a razones tanto económicas como éticas, se está realizando un gran esfuerzo en el desarrollo de métodos alternativos a los tradicionales "*in vivo*" que proporcionen información rápida acerca de las posibilidades de nuevas moléculas. Los métodos alternativos incluyen procedimientos que reemplazan o reducen el uso o la necesidad de animales en un ensayo particular, o que refinan una técnica a fin de reducir el sufrimiento de los animales. En 1959, Russell y Burch introdujeron el concepto de 3Rs/3ERRES: reemplazo, reducción y refinamiento de las técnicas de experimentación con animales (*Festing M.F.W. y col., 1998*).

En la Tabla I.1 se muestran algunos de los métodos alternativos utilizados en la actualidad. Entre ellos se encuentran los que utilizan organismos inferiores no protegidos por la legislación, vertebrados en las primeras etapas de desarrollo. De particular interés resulta el uso de métodos "*in vitro*" que emplean material de estos organismos (*Repetto G., 1995; Balls M., 1998*). En términos prácticos, los experimentos "*in vivo*" o "*in vitro*" innecesarios deberían evitarse mediante el uso de modelos matemáticos de predicción y la disponibilidad e intercambio de información preexistente y de resultados experimentales. Dentro de los modelos matemáticos de predicción se enmarcan las áreas conocidas como relaciones cuantitativas estructura-actividad cuyas siglas

inglesas son QSAR ("*quantitative structure-activity relationships*") y las relaciones cuantitativas retención-actividad (QRAR, siglas inglesas de "*quantitative retention-activity relationships*").

El objetivo del área QSAR es relacionar cuantitativamente las actividades biológicas de los compuestos con las propiedades físico-químicas y/o descriptores estructurales de los mismos; mientras que en los estudios QRAR se utiliza como variable de predicción de las actividades biológicas de los compuestos, parámetros cromatográficos de los mismos obtenidos bajo unas condiciones cromatográficas adecuadas que permitan emular las interacciones responsables de los procesos de bio-reparto. Los aspectos concretos de ambas áreas (QSAR y QRAR) se exponen en los apartados siguientes de esta introducción.

Tabla I.1.- Métodos alternativos al uso de animales de experimentación.

Métodos alternativos	Ejemplos
Modelos matemáticos de predicción	Relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) Relaciones cuantitativas retención-actividad (QRAR)
Organismos inferiores no protegidos	Bacterias Hongos Protozoos Algas Plantas Animales invertebrados
Vertebrados en las primeras etapas del desarrollo	Peces Anfibios Reptiles Aves Mamíferos
Métodos " <i>in vitro</i> "	Órganos Líneas celulares

I.2.- Relaciones (cuantitativas) estructura-actividad ((Q)SAR)

Para que la molécula de un xenobiótico exhiba una determinada actividad biológica, debe interactuar con un cierto componente celular o con un receptor particular en el sitio de acción. Los sistemas biológicos están compuestos por un número elevado de fases heterogéneas, y el lugar donde el xenobiótico se administra o se introduce en el organismo vivo está normalmente separado de su sitio de acción. Por tanto, la molécula de xenobiótico es transportada a través de diferentes fases acuosas y membranas donde experimenta diferentes procesos de reparto antes de alcanzar el sitio donde ejerce su acción. La potencia de la respuesta biológica observada depende de todo el proceso global, que incluye el transporte y la interacción con el receptor. Tanto el proceso de transporte como el grado de interacción xenobiótico-receptor están gobernados por las propiedades físico-químicas del xenobiótico, y éste es el fundamento de las relaciones estructura-actividad (*Hansch C., 1990-a*). Así pues, tal y como su nombre indica, en las relaciones estructura-actividad, ya sean cualitativas (SAR) o cuantitativas (QSAR), se pretende describir y/o predecir una actividad biológica de un xenobiótico a partir de su estructura. El término estructura no hace referencia específica a su fórmula estructural, sino a las propiedades físico-químicas y/o descriptores estructurales inherentes a la misma.

Los modelos QSAR son una aplicación extratermodinámica, que no tienen una estructura termodinámica formal, de las relaciones lineales de energía libre (LFER, siglas inglesas de "*linear free energy relationship*"). Las propiedades termodinámicas de un sistema dado son propiedades que reflejan las interacciones netas en dicho sistema. La magnitud de los parámetros termodinámicos representa la combinación de interacciones individuales que tienen lugar a un nivel molecular. Según LFERs, las diferencias en la magnitud en la que un determinado fenómeno tiene lugar para una serie de compuestos, están relacionadas con las diferencias en los valores de los parámetros termodinámicos resultantes, las cuales, a su vez, están linealmente relacionadas con las diferencias en las propiedades físico-químicas de los compuestos (*Kalishan R., 1993; Grover M. y col., 2000*).

I.2.1.- Perspectiva histórica de los estudios (Q)SAR

El primer indicio de lo que se puede considerar un intento de relacionar las respuestas biológicas de una serie de compuestos con sus propiedades físico-químicas se remonta a mediados del siglo XIX, concretamente a 1863 cuando A.F.A. Croas en su Tesis Doctoral, realizada en la Universidad de Estrasburgo, observó que la toxicidad en mamíferos de ciertos alcoholes aumentaba de forma inversamente proporcional a su solubilidad en agua (*Croas A.F.A., 1863*). En 1868, Crum-Brown y Fraser (*Crum-Brown A. y col., 1868*) observaron que la actividad paralizante muscular de

una serie de sales de amonio cuaternario de ciertos alcaloides dependía del tipo de sustituyente, por lo que sugirieron que la actividad fisiológica de los compuestos dependía de lo que denominaron la "constitución" de los mismos. En 1869, Richardson (*Richardson B.J., 1869*) mostró que el efecto narcótico de alcoholes primarios era proporcional a su peso molecular. Años después, Richet (*Richet M.C., 1893*) demostró que la toxicidad de una serie de compuestos orgánicos sencillos (alcoholes, éteres y cetonas) estaba inversamente relacionada con su solubilidad en agua.

Prácticamente de forma simultánea a las experiencias de Richet, Meyer (*Meyer H.H., 1899*) y Overton (*Overton E., 1901*), de forma independiente, mostraron la existencia de una correlación entre las relaciones de reparto aceite/agua y la potencia de ciertos narcóticos. Overton en concreto experimentó con renacuajos y observó un aumento sistemático en la potencia narcótica al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada de los compuestos, la cual estaba correlacionada con la relación de reparto aceite/agua.

Años más tarde, surgieron los primeros estudios en los se hacía mención a la importancia del grado de ionización de compuestos con propiedades ácido-base. Albert (*Albert A. y col., 1945*) realizó un estudio cuantitativo de la actividad antimicrobiana de las aminoacridinas que reveló que su actividad dependía de su grado de ionización.

Durante los años 1930-1940, mientras que algunos expertos en química médica estudiaban la influencia de la ionización en la actividad de los fármacos, algunos químico-físicos desarrollaron parámetros para cuantificar los efectos electrónicos de los sustituyentes sobre las reacciones químicas. En particular fue muy importante la contribución de Hammett, quien en el periodo 1937-1940 desarrolló un sistema de constantes (σ) para cuantificar los efectos electrónicos de los sustituyentes del anillo bencénico a través de una expresión que definía una relación lineal de energía libre (*Hammett L.P., 1937; 1940*). Años más tarde, Taft continuando con el trabajo de Hammett y basándose en estudios LFER introdujo el primer parámetro estérico (E_s) y un parámetro electrónico de polaridad (σ^*) para los sustituyentes de estructuras alifáticas (*Taft R.W., 1952; 1956*). Pocos años después, varios grupos de investigación consiguieron las primeras aplicaciones QSAR de la ecuación de Hammett. Así por ejemplo, se obtuvieron modelos QSAR para explicar la inhibición del crecimiento de cultivos de bacterias por ácidos benzoicos sustituidos, derivados fenil-sustituidos de la penicilina G y análogos del cloramfenicol (*Hasen O.R., 1962*).

En 1962, Hansch (*Hansch C. y col., 1962*) publicó la primera de sus muchas contribuciones brillantes que establecieron el QSAR multiparamétrico moderno. Hansch y col. habían intentado durante 15 años desarrollar el SAR de fenoxiácidos y observaron que el carácter hidrófobo relativo de los sustituyentes era determinante de su actividad reguladora del crecimiento de las plantas. En la búsqueda de un descriptor adecuado de la hidrofobicidad, empezaron a realizar medidas de la relación de reparto en el sistema *n*-octanol/agua (concretamente en su forma logarítmica, $\log P$)

que escogieron como sistema de referencia. De este modo y basándose en la ecuación de Hammett, establecieron la escala de constantes hidrófobas de los sustituyentes (π , constante de Hansch) para un grupo de derivados del benceno.

Fujita y Hansch (*Fujita T. y col., 1964; Hansch C. y col., 1964*) basándose en la teoría LFERs, sugirieron que las variables π y σ debían combinarse de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\log(1/C) = k_1\pi + k_2\sigma + k_3 \quad (\text{I.1})$$

donde C es la concentración de compuesto que produce una cierta actividad en un intervalo constante de tiempo y k_1 , k_2 y k_3 son los coeficientes de ajuste de la ecuación.

Desde entonces, el grupo de investigación de Hansch empezó el análisis de gran número de conjuntos de datos biológicos. En algunos casos obtuvieron muy buenos resultados pero en otros casos la ecuación I.1 no resultaba adecuada, especialmente para explicar la varianza de datos que cubrían un amplio intervalo de $\log P$. Hansch intuitivamente sugirió que el reparto de los compuestos muy hidrófilos del agua al lípido de una membrana debía ser mínimo y por tanto tendrían muy poca probabilidad de alcanzar al receptor situado en o más allá de la membrana. En cambio, las moléculas muy hidrófobas, con altas relaciones de reparto membrana/agua, quedarían retenidas en las diferentes membranas retrasando su llegada al receptor. Por tanto, debía existir un valor óptimo de $\log P$ (o de π) que correspondería a la probabilidad máxima de alcanzar el receptor en un intervalo de tiempo dado. La forma más simple de expresar matemáticamente esta idea era postular que $\log(1/C)$ dependía parabólicamente de $\log P$ (ecuación I.2). Hansch demostró la utilidad de esta ecuación y de algunas variantes, en particular de la ecuación I.3 cuyos términos incluyen las constantes de los sustituyentes y la ecuación I.4 que incluye el parámetro estérico de Taft (*Hansch C., 1969*).

$$\log(1/C) = k_1(\log P) - k_2(\log P)^2 + k_3\sigma + k_4 \quad (\text{I.2})$$

$$\log(1/C) = k_1\pi - k_2\pi^2 + k_3\sigma + k_4 \quad (\text{I.3})$$

$$\log(1/C) = k_1\pi + k_2\sigma + k_3E_s + k_4 \quad (\text{I.4})$$



Los parámetros $\log P$ y π tienen en cuenta las interacciones hidrófobas de los xenobióticos con las membranas lipídicas, que mayoritariamente gobiernan a los procesos de transporte. El parámetro σ representa las interacciones de tipo polar y E_s estima características estéricas que pueden impedir el acoplamiento de los xenobióticos a los sitios de unión. Hansch con la ecuación I.2, que se conoce como ecuación de Hansch, inició a gran escala el desarrollo de los estudios QSAR que se extendieron a la industria farmacéutica y a los departamentos de química médica teórica y computacional.

También cabe destacar las aportaciones de Free y Wilson (*Free S.M. Jr. y col., 1964*) cuyo principio básico es el carácter aditivo de las actividades biológicas (ecuación I.5). Así estos autores postularon que la actividad biológica, expresada en su forma logarítmica ($\log(1/C)$), de una serie de compuestos congéneres que comparten una estructura base, puede calcularse como la suma del valor de la actividad biológica de dicha estructura base (μ) y la contribución de cada sustituyente de la estructura base (a_i):

$$\log(1/C) = \sum a_i + \mu \quad (I.5)$$

La ecuación I.5, conocida como análisis de Free Wilson, es muy sencilla de emplear, no requiere el uso de propiedades físico-químicas, simplemente la construcción de matrices con los valores 1 ó 0 para indicar la presencia o la ausencia de un sustituyente dado en una posición dada de la estructura base. Sin embargo, aunque se han publicado numerosas aplicaciones del análisis de Free Wilson, éste no ha recibido tanta atención ni se ha extendido tanto como el análisis de Hansch debido al gran número de parámetros que requiere y la correspondiente disminución del número de grados de libertad en su análisis estadístico. Por otro lado, en los casos favorables el análisis de Hansch proporciona conclusiones generales y un mejor entendimiento de la acción de los xenobióticos a escala molecular, mientras que el análisis de Free Wilson sólo proporciona una cuantificación de los efectos de los cambios químicos sobre la actividad biológica. No obstante, con el desarrollo de la química combinatoria y el diseño molecular asistido por ordenador (CADD, siglas de "*computer-aided drug design*"), el análisis de Free Wilson está resurgiendo (*Hansch C., 1990-a; Kubinyi H., 2002*).

I.2.2.- Objetivos de los estudios QSAR

Un modelo QSAR se puede expresar en su forma más general por la ecuación I.6. El objetivo global es la búsqueda de parámetros experimentales o teóricos que proporcionen una correlación estadísticamente significativa al utilizarlos en una de las múltiples formas posibles de la ecuación junto con una actividad biológica para una serie de moléculas.

$$\text{Actividad biológica} = f(\text{parámetros físico-químicos y/o estructurales}) \quad (I.6)$$

La bondad del modelo obtenido depende en gran medida de la calidad y cantidad de los datos analizados y del tipo de variable independiente utilizada, físico-química (ej., σ o π), estructural (ej., la frecuencia de aparición de un sustituyente) o topológica (ej., un índice de conectividad).

Los objetivos concretos que se persiguen en los estudios QSAR son (*Hansch C., 1990-a*):

- a. - Diagnos*is de mecanismos de acción*: uno de los mayores atractivos de los modelos QSAR es la elucidación de mecanismos de acción de los xenobióticos mediante la interpretación físico-química y bioquímica de los parámetros utilizados en la construcción del modelo o alternativamente se puede emplear el modelo para probar un mecanismo hipotético.
- b. - Predicción de la actividad: si se obtiene un buen modelo se puede utilizar para predecir la actividad de otras moléculas en el sistema biológico definido. En estos casos la fiabilidad de la predicción depende tanto de la calidad del modelo matemático obtenido como del grado de similitud entre los xenobióticos del conjunto de calibración y el xenobiótico ensayado.
- c. - Clasificación: con la ayuda de técnicas de clasificación es posible agrupar a las moléculas en categorías (ej., muy activos, activos e inactivos) a partir de la presencia o ausencia de ciertas propiedades físico-químicas o descriptores estructurales.
- d. - Optimización y refinamiento de las moléculas candidatas: en las primeras etapas del desarrollo de fármacos para una determinada área terapéutica, se selecciona una determinada familia de moléculas que presentan una estructura general y exhiben una determinada actividad. El siguiente paso es la selección de los derivados óptimos para una evaluación clínica más extensa. Los compuestos se pueden seleccionar y optimizar en función de los requerimientos clínicos mediante el ajuste de sus propiedades físico-químicas. El balance requerido de las propiedades estéricas, electrónicas e hidrófobas se puede predecir con un modelo QSAR apropiado del parámetro de actividad biológica.
- e. - Reducción y reemplazo de la experimentación con animales: el uso de modelos QSAR puede ser una alternativa para la reducción del uso de ensayos "in vivo". Aunque hoy en día estos modelos no pueden sustituir completamente a los ensayos con animales para la evaluación exhaustiva de nuevos xenobióticos, se pueden utilizar para establecer prioridades de síntesis y ensayo.

I.2.3.- Variables

Como se ha indicado anteriormente, la bondad de ajuste de los modelos QSAR depende de la calidad de los datos biológicos en cuestión, de la relevancia de las variables independientes respecto al proceso físico-químico a modelar y de la capacidad descriptiva del modelo.

En la actualidad, se utiliza una extensa variedad de parámetros para la construcción de los distintos modelos QSAR, pero básicamente se pueden agrupar en tres categorías: hidrófobos, electrónicos y estéricos (*Hansch C., 1990-a*).

a. - Parámetros de hidrofobicidad: desde que Hansch propuso la utilización del sistema *n*-octanol-agua, dicho sistema se estableció rápidamente como el sistema de referencia para la medida y obtención de los valores de $\log P$ y π de los compuestos. Sin embargo, puesto que el transporte de xenobióticos en los organismos vivos está determinado por la hidrofobicidad global de la molécula, $\log P$ en lugar de π se ha convertido en el parámetro utilizado de forma más amplia en los estudios QSAR. Con el fin de subsanar las dificultades e inconvenientes que presenta la medida clásica de $\log P$ mediante extracción líquido-líquido, se han desarrollado multitud de metodologías para su medida experimental o para su cálculo que se discutirán posteriormente en el apartado I.3 y I.4.

b. - Parámetros electrónicos: en los estudios QSAR se han utilizado numerosos parámetros electrónicos derivados de las constantes σ de Hammett. Puesto que σ refleja interacciones de tipo intramolecular (la influencia de un sustituyente del anillo bencénico sobre la ionización de la molécula total resultante), para caracterizar la interacción xenobiótico-receptor se introdujeron parámetros electrónicos intermoleculares (como por ejemplo, la polarizabilidad). Además, a partir de cálculos con técnicas de mecánica cuántica se han derivado multitud de parámetros electrónicos (como por ejemplo, la carga atómica y la energía de los orbitales moleculares). También se han utilizado en numerosos estudios las constantes de protonación o de acidez para los compuestos ionizables y parámetros relacionados con el carácter dador o aceptor de puentes de hidrógeno de las moléculas.

c. - Parámetros estéricos: existe mucha más incertidumbre acerca del tratamiento de los parámetros estéricos ya que dependen de efectos intra- e intermoleculares y su medida experimental es muy imprecisa. Los parámetros de tipo estérico utilizados en los modelos QSAR se pueden agrupar en las siguientes categorías:

c.1.- Descriptor topológico: se basan en la caracterización de la estructura molecular mediante la denominada teoría gráfica, en la que a partir de la supresión de los átomos de hidrógeno de la fórmula molecular y mediante una serie de cálculos matriciales se derivan

una serie de descriptores estéricos (índices topológicos) que codifican la información acerca del número de átomos restantes y el entorno estructural de cada uno de ellos.

c.2.- Descriptores geométricos: representan una clase de parámetros teóricos basados en el radio de van der Waals (r_w).

c.3.- Descriptores químicos: se basan en el efecto estérico que diferentes sustituyentes presentan sobre una reacción estándar (ej., la constante de Taft, E_s).

c.4.- Descriptores físicos: resultan de considerar la molécula como un objeto tridimensional con unas propiedades físicas determinadas por su tamaño. Como por ejemplo, la refracción molar (R_m , también utilizada como parámetro electrónico), el volumen molar (V_m), el "parachor" (P) y el peso molecular (M).

c.5.- Descriptores diferenciales: se obtienen al considerar la molécula orgánica como una estructura tridimensional que varía de una molécula orgánica de referencia.

I.2.4.- Los estudios (Q)SAR en la actualidad

Desde la gran contribución de Hansch y col., los estudios QSAR se extendieron rápidamente al campo del diseño racional de xenobióticos, tanto de fármacos como de plaguicidas. Hoy en día, miles de artículos versan sobre (Q)SAR y se publican en una gran variedad de revistas. En las Tablas I.2-I.3 se muestran, a modo de ejemplo, algunas de las publicaciones más recientes, así como algunos programas informáticos comerciales para la predicción de actividades biológicas basados en modelos QSAR.

El desarrollo de los estudios QSAR ha sido paralelo al desarrollo de la informática en dos sentidos. Por un lado, la estimación de parámetros estructurales ha supuesto la proliferación de nuevas variables. En la actualidad, existe una amplia variedad de programas informáticos comerciales de cálculo de diferentes tipos de descriptores (*Grover M. y col., 2000*). Por otro lado, el desarrollo de herramientas estadísticas multivariantes ha permitido trabajar con grandes matrices de datos de variables estructurales y correlacionarlas con la actividad biológica deseada.

De entre todos los métodos quimiométricos, la regresión lineal múltiple (MLR, siglas en inglés de "*multiple linear regression*") ha sido la técnica de regresión más utilizada en QSAR. Sin embargo, esta estrategia presenta una serie de inconvenientes, como por ejemplo el número de compuestos incluidos en el modelo debe ser suficiente para que el modelo sea estadísticamente significativo (al menos cinco compuestos por descriptor). Por otro lado, se pueden obtener correlaciones ficticias debido a problemas de colinealidad entre variables. Estos problemas se

pueden resolver haciendo una selección previa de variables o utilizando directamente otras técnicas multivariantes, como mínimos cuadrados parciales (PLS, siglas inglesas de "*partial least squares*") o regresión en componentes principales (PCR, siglas inglesas de "*principal component regression*") (Ferreira M.M.C., 2002).

Dentro de los modelos QSAR, cabe destacar los basados en las propiedades de solvatación de las moléculas. El disolvente juega un papel muy importante en los procesos físico-químicos que tienen lugar en disolución, por tanto, sus efectos resultan de gran interés en las relaciones actividad-estructura para reflejar las interacciones de tipo intermolecular. Debido a la complejidad de los efectos de los disolventes, las ecuaciones para este tipo de modelos suelen ser multiparamétricas y reciben el nombre de relaciones lineales de energía de solvatación (LSER, siglas inglesas de "*linear solvation energy relationship*") y están basadas en LFER.

Entre las ecuaciones utilizadas en LSER, la más empleada en la actualidad es la propuesta por Abraham (Abraham M.H., 1993):

$$\log SP = c + rR_2 + s\pi_2^H + a\sum \alpha_2^H + b\sum \beta_2^H + \nu V_x \quad (I.7)$$

En las últimas publicaciones se utiliza una notación simplificada de la ecuación I.7:

$$\log SP = c + eE + sS + aA + bB + \nu V \quad (I.8)$$

donde SP es una propiedad de una serie de solutos en un sistema dado (ej., actividad biológica) y las variables independientes son descriptores de los solutos también conocidos como descriptores de Abraham o solvatocrómicos y están basados en el modelo teórico de la cavidad para las interacciones soluto-disolvente (Abraham M.H. y col., 1987; 2002):

- $R_2 = E$: exceso de refracción molar del soluto. Modela las interacciones debidas a fuerzas de dispersión resultantes de la mayor polarizabilidad de los electrones de tipo n y π .
- $\pi_2^H = S$: dipolaridad/polarizabilidad del soluto (en $\text{cm}^3/10$) debida a las interacciones soluto-disolvente de tipo dipolo-dipolo y dipolo-dipolo inducido.
- $\sum \alpha_2^H = A$: acidez efectiva de los enlaces de hidrógeno del soluto. Está relacionado con la fuerza y el número de enlaces por puentes de hidrógeno formados al interaccionar grupos dadores del soluto con pares de electrones solitarios de grupos aceptores de las moléculas del disolvente.
- $\sum \beta_2^H = B$: basicidad efectiva de los enlaces de hidrógeno del soluto. Está relacionado con la fuerza y el número de enlaces por puentes de hidrógeno formados al interaccionar los pares de electrones solitarios de grupos aceptores del soluto con los grupos dadores del disolvente.
- $V_x = V$: volumen molar característico de McGowan (en $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1} / 100$).

En la actualidad los descriptores de Abraham están disponibles y validados para unos 4000 compuestos de naturaleza muy diversa, desde gases sencillos (p. ej., hidrógeno, nitrógeno) a fármacos o plaguicidas más complejos. Además, existe un programa informático (Absolv, Sirius Analytical Instruments Ltd.) que permite el cálculo de los descriptores de Abraham de los compuestos a partir de su estructura molecular y la estimación de propiedades de los solutos relacionadas con procesos de difusión pasiva o de reparto entre dos fases (p. ej., $\log P$, absorción gastrointestinal, coeficiente de permeabilidad cutánea, etc.) a partir de modelos basados en LSER publicados en la bibliografía.

Los descriptores utilizados en LSER han demostrado ser muy útiles para la descripción de las actividades biológicas de los compuestos, así como de propiedades físico-químicas relacionadas con las interacciones soluto-disolvente (p. ej., $\log P$) y de la retención cromatográfica de compuestos como se mostrará en el apartado I.3.2.

Los coeficientes de ajuste de la ecuación I.7 (o I.8) pueden considerarse como constantes del sistema considerado que permiten su caracterización en términos de interacciones soluto-disolvente.

Tabla I.2.- Publicaciones de modelos (Q)SAR en las áreas de la farmacología y de la ecotoxicidad.

Xenobióticos	Actividad	Descriptores estructurales y/o propiedades físico-químicas	Estrategia quimiométrica ^a	Modelo ^b	Referencia
84 Compuestos	Concentración narcótica en renacuajos, C_{nar} (mol dm ⁻³)	Descriptores solvatocrómicos ^c Logaritmo de la relación de reparto <i>n</i> -octanol/agua (log <i>P</i>)	MLR	$\log(1/C_{nar}) = 0.579 + 0.824 E - 0.334 S - 2.871 B + 3.097 V$ $n = 84; r = 0.9730; s_{yx} = 0.246$ $\log(1/C_{nar}) = 1.129 + 0.8331 \log P$ $n = 84; r = 0.9212; s_{yx} = 0.407$ $\log(1/C_{nar}) = 0.621 + 0.7431 \log P + 0.688 V$ $n = 84; r = 0.9400; s_{yx} = 0.359$	Abraham M.H. y col., 1995
107 Compuestos no relacionados estructuralmente	Coefficiente de permeabilidad cutánea, K_p (cm h ⁻¹)	Hidrófobo (log <i>P</i>) Estérico (peso molecular, <i>M</i>)	MLR	$\log K_p = 0.77 \log P - 0.0103 M - 2.33$ $n = 107; r^2 = 0.86; F = 317; s_{yx} = 0.39$	Cronin M.T.D. y col., 1999
119 Fenoles	Concentración de compuesto inhibitoria del crecimiento de un 50% de una población de "Tetrahymena pyriformis" tras 40 h de administración, IGC_{50} (mmol)	Hidrófobo (log <i>P</i>) Electrónico (constante de Hammett, σ)	MLR	$\log(IGC_{50})^{-1} = 0.64 (0.04) \log P + 0.61 (0.12) \sigma + 1.12 (0.13)$ $n = 119; r^2 = 0.90; r^2_{CV} = 0.89; s_{yx} = 0.265$	Garg R. y col., 2001
51 Derivados del benceno	Concentración de compuesto letal para un 50% de una población de renacuajos "Rana japonica" tras 12 h de administración, LC_{50} (mol L ⁻¹)	20 descriptores: 1 hidrófobo (log <i>P</i>) 15 electrónicos (ej. energía del orbital molecular desdoblado de menor energía, E_{UMO}). 4 estéricos (ej. volumen molecular, Vol.)	"Stepwise" MLR para la selección de las variables y obtención de los modelos. PLS para el estudio de validación cruzada	$\log(1/LC_{50}) = 0.393 \log P - 0.428 E_{UMO} + 0.0110 Vol. + 1.362$ $n = 51; r^2 = 0.834; F = 78.8; s_{yx} = 0.243; p < 0.000001$ Utilizando log <i>D</i> (logaritmo de la relación de distribución <i>n</i> -octanol/agua al pH de trabajo) en lugar de log <i>P</i> . $\log(1/LC_{50}) = 0.399 \log D - 0.453 E_{UMO} + 0.0109 Vol. + 1.394$ $n = 51; r^2 = 0.914; r^2_{CV} = 0.785; F = 167; s_{yx} = 0.175; p < 0.000001$	Huang H. y col., 2003
84 Mezclas binarias de 8 compuestos con narcosis no polar y polar	Concentración de la mezcla binaria para producir un efecto tóxico en el 50% de una población de bacterias marinas "Photobacterium phosphoreum", EC_{50M} (mol L ⁻¹)	Hidrófobo (log <i>P</i> para la mezcla, log K_{mow}) Electrónicos de puentes de hidrógeno: diferencia (A^{H}) de los logaritmos de las relaciones de reparto de las mezclas en los sistemas <i>t</i> -butileter/agua y ciclohexano/agua	MLR	$\log EC_{50M} = 1.562 + 0.723 \log K_{mow}$ $n = 84; r^2 = 0.885; F = 613.708; s_{yx} = 0.245; p = 0.000$ $\log EC_{50M} = 1.086 + 0.830 \log K_{mow} + 0.527 A^{H}$ $n = 84; r^2 = 0.948; F = 745.201; s_{yx} = 0.166; p = 0.000$	Lin Z. y col., 2003
40 Bencenos sustituidos (nitrobenzenos, anilinas y fenoles)	Concentración de compuesto inhibitoria del crecimiento del 50% de una población de algas "Scenedesmus obliquus" tras 48 h de administración, EC_{50} (mol L ⁻¹)	Hidrófobo (log <i>P</i>) Electrónico (E_{UMO})	MLR	$\log(1/EC_{50}) = 0.272 \log P - 0.659 E_{UMO} + 2.54$ $n = 40; r^2 = 0.793; F = 71.07; s_{yx} = 0.316$	Lu G.H. y col., 2001

(Continúa en la página siguiente)

Tabla I.2.- Continuación.

Xenobióticos	Actividad	Descriptorios estructurales y/o propiedades fisico-químicas	Estrategia quimiométrica ^a	Modelo ^b	Referencia
148 Compuestos no relacionados estructuralmente	Relación de distribución cerebro/sangre, BB	Descriptorios solvatocrómicos ^c Otro descriptor electrónico (I_1 : variable indicadora, $I_1=1$ para ácidos carboxílicos, $I_1=0$ para el resto de compuestos)	MLR PCR	MLR: $\log BB = 0.044 + 0.511 E - 0.886 S - 0.724 A - 0.666 B + 0.861 V$ $n = 148; r^2 = 0.710; r^2_{cv} = 0.682; F = 71; s_{yx} = 0.367$ $\log BB = 0.021 + 0.463 E - 0.864 S - 0.564 A - 0.731 B + 0.933 V - 0.567 I_1$ $n = 148; r^2 = 0.745; r^2_{cv} = 0.711; F = 69; s_{yx} = 0.343$ (Problemas de colinealidad entre variables que se investigan por comparación con PCR). Modelo PCR con 5 PCs: $\log BB = 0.062 + 0.469 E - 0.864 S - 0.586 A - 0.713 B + 0.895 V - 0.564 I_1$ $n = 148; r^2 = 0.744; r^2_{cv} = 0.715; F = 83; s_{yx} = 0.342$; (coeficientes similares a MLR, coeficientes no muy afectados por colinealidad entre variables).	Platts J.A. y col., 2001
Conjunto de calibración: 232 fármacos no relacionados estructuralmente Conjunto de predicción: 40 fármacos no relacionados estructuralmente	Biodisponibilidad oral en humanos (%)	Logaritmo del coeficiente de distribución n -octanol/agua a pH 6.5 ($\log D_{6.5}$); ($\log D_{6.5}$) ² ; $\Delta \log D = \log D_{6.5} - \log D_{7.4}$ 15 descriptorios estructurales relacionados con procesos metabólicos	ORMUCS	Modelo de tipo semicuantitativo para la clasificación de los xenobióticos en 4 clases atendiendo a su biodisponibilidad: 1 ($\leq 20\%$), 2 (20-49%), 3 (59-79%), 4 ($\geq 80\%$) Resultados: clasifica correctamente el 71% de los compuestos del conjunto de calibración y el 60% del conjunto de predicción	Yashida F. y col., 2000
169 Fármacos no relacionados estructuralmente + 11 fármacos con absorción dosis dependiente (DL)	Absorción oral en humanos (%Abs)	Descriptorios solvatocrómicos ^c Otros descriptorios: IS: % de fármaco administrado insoluble en 250 mL de agua	MLR "Stepwise" MLR	$\%Abs = 92 + 2.94 E + 4.10 S - 21.7 A - 21.1 B + 10.6 V$ $n = 169; r^2 = 0.74; r^2_{cv} = 0.72; F = 93; s_{yx} = 14; RMSEC = 14$ Reducción de variables: $\%Abs = 96 - 20.0 A - 19.8 B + 13.9 V$ $n = 169; r^2 = 0.72; r^2_{cv} = 0.71; F = 144; s_{yx} = 15; RMSEC = 14$ Inclusión de los 11 fármacos DL: $\%Abs = 93 - 21.3 A - 19.0 B + 14.6 V$ $n = 180; r^2 = 0.74; r^2_{cv} = 0.72; F = 124; s_{yx} = 15; RMSEC = 15$ No se observó una influencia significativa de la ionización	Zhao Y.H. y col., 2001

^a Estrategias quimiométricas: MLR: siglas en inglés de "multiple linear regression". Regresión lineal múltiple.
"Stepwise" MLR: MLR paso a paso.

PLS: siglas en inglés de "partial least squares". Mínimos cuadrados parciales.

PCR: siglas en inglés de "principal component regression". Regresión en componentes principales.

ORMUCS: acrónimo en inglés de "ordered multicategorical classification method using the simplex technique". Es una variante del análisis discriminante.

^b Parámetros estadísticos:

n : número de compuestos incluidos en el modelo.

r : coeficiente de correlación.

r^2 : coeficiente de determinación.

r^2_{cv} : coeficiente de determinación en validación cruzada.

s_{yx} : desviación estándar de los residuos de y .

F : cociente entre la varianza modelada y la residual.

p : probabilidad. Medida del nivel de significación estadística del modelo.

RMSEC: siglas en inglés de "root-mean-square error of calibration". Raíz cuadrada del error al cuadrado medio en calibración.

^c Descriptorios solvatocrómicos:

E : exceso de refracción molar.






S : dipolaridad / polarizabilidad.

A : acidez de los enlaces de hidrógeno.

B : basicidad de los enlaces de hidrógeno.

V : volumen característico de McGowan.

Tabla I.3.- Ejemplos de programas informáticos comerciales para la predicción de actividades biológicas basados en modelos QSAR.

Programa informático	Características	Referencia
 BCFWIN ^{TM a}	Estima el factor de bioconcentración (<i>BCF</i> , siglas inglesas de " <i>bioconcentration factor</i> ") de compuestos orgánicos según la metodología de la EPA (" <i>Environmental Protection Agency</i> ") basándose en el logaritmo de la relación de reparto <i>n</i> -octanol/agua y otros descriptores estructurales y propiedades físico-químicas que utiliza como factores de corrección.	<i>Meylan W.M. y col., 1997</i>
 PKCWIN ^{TM a}	Estima el coeficiente de adsorción en suelos (<i>K_{oc}</i>) de compuestos orgánicos a partir de índices de conectividad molecular y otros descriptores estructurales que utiliza como factores de corrección.	<i>Meylan W.M. y col., 1999-a</i>
 ECOSAR Class Program ^{TM a}	Es una versión computerizada del análisis ECOSAR (siglas inglesas de " <i>ecological structure activity relationships</i> ") actualmente utilizado por la " <i>Office of Pollution Prevention and Toxics</i> " (OPPT) de la EPA. Este análisis utiliza modelos QSAR para la predicción de diferentes parámetros de toxicidad acuática de las sustancias químicas en diferentes organismos. Hasta la actualidad, se han desarrollado más de 150 modelos QSAR para más de 50 clases químicas que utilizan el logaritmo de la relación de reparto <i>n</i> -octanol/agua como variable de predicción y otros descriptores estructurales y propiedades físico-químicas como factores de conversión de unidades y como puntos de corte.	<i>Meylan W.M. y col., 1999-b</i>
 DERMWIN ^{TM a}	Estima el coeficiente de permeabilidad cutánea (<i>K_p</i>) de compuestos orgánicos según la metodología de la EPA ^b . La versión actual de DERMWIN utiliza una ecuación general y tres específicas para alcoholes, fenoles y esteroides. La ecuación general utiliza como variables de predicción el logaritmo de la relación de reparto <i>n</i> -octanol/agua y el peso molecular, las ecuaciones específicas están basadas en log <i>P</i> .	<i>Meylan W.M. y col., 1999-c</i>
 Absolv ^c	Calcula los descriptores de Abraham de los compuestos a partir de su estructura molecular y estima 125 propiedades de los solutos relacionadas con procesos de difusión pasiva o de reparto entre dos fases (p. ej., log <i>P</i> , absorción gastrointestinal, coeficiente de permeabilidad cutánea, etc.) a partir de modelos basados en LSER publicados en la bibliografía.	<i>Abraham M.H. y col., 2002</i>

^a Propiedad de la US EPA. Desarrollados por la "*Office of Pollution Prevention and Toxics*" (OPPT) de la EPA y la "*Syracuse Research Corporation*" (SRC).

^b Referencia: (US EPA, 1992).

^c Sirius Analytical Instruments Ltd. (Forest Row, Reino Unido).

I.3.- Métodos para la estimación de la hidrofobicidad de compuestos

Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, la cuantificación de la hidrofobicidad de los xenobióticos resulta de gran interés en los estudios QSAR, ya que ésta es la propiedad más importante en el reparto entre las membranas lipídicas y los fluidos inter- e intracelulares. Desde que C. Hansch y col. propusieron el logaritmo de la relación de reparto en el sistema *n*-octanol/agua ($\log P$) como propiedad físico-química descriptora de la hidrofobicidad de los compuestos, éste se ha convertido en la variable utilizada más ampliamente para la construcción de modelos QSAR. A modo de ejemplo, se ha estimado que el 85% de los modelos QSAR de todo tipo de actividades biológicas muestran una dependencia con $\log P$ significativa (Hansch C. y col., 1996).

La relación de reparto *n*-octanol/agua (o su logaritmo) no sólo depende de la hidrofobicidad de los compuestos sino que la presencia del grupo hidroxilo del *n*-octanol le confiere cierta capacidad dadora/aceptora de puentes de hidrógeno. Precisamente es esta última propiedad la que hace que el disolvente *n*-octanol sea especialmente adecuado para modelar los procesos de distribución en las membranas biológicas, ya que éstas también contienen grupos funcionales polares capaces de formar puentes de hidrógeno. También se han utilizado otros disolventes (p. ej., cloroformo, ciclohexano, *t*-butiléter, *i*-octano) para propósitos concretos y conjuntos particulares de compuestos (Nasal A. y col., 2003).

La relación de reparto *n*-octanol/agua se define, de acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, siglas de "International Union of Pure and Applied Chemistry"), como el cociente entre las concentraciones de la forma neutra del compuesto (*A*) en las fases *n*-octanol ($[A]_{n\text{-octanol}}$) y acuosa ($[A]_{\text{agua}}$) en equilibrio:

$$P = \frac{[A]_{n\text{-octanol}}}{[A]_{\text{agua}}}$$

En la bibliografía existe cierta confusión en cuanto a la terminología utilizada para este parámetro. La IUPAC recomienda el uso del término relación de reparto y desaconseja el término coeficiente de reparto, que por el contrario es el más extendido en la bibliografía. Así mismo, la IUPAC define el término relación de distribución (no coeficiente de distribución) como la relación entre la concentración analítica o total de un soluto en el extracto y su concentración analítica o total en la otra fase (McNaught A.D. y col., 2003).

Por otro lado, el logaritmo de la relación de reparto *n*-octanol/agua viene representado con diferentes símbolos en la bibliografía. Aparece a menudo como $\log P$, $\log K$ o $\log D$ y en ocasiones con los subíndices "ow" ($\log P_{ow}$, $\log K_{ow}$ o $\log D_{ow}$). En la presente memoria se ha adoptado la notación $\log P$ propuesta por C. Hansch, puesto que ésta es generalmente la más utilizada y



siempre referida al sistema *n*-octanol/agua. El uso de la nomenclatura $\log D$ (en ocasiones también denominado $\log P_{ap}$) se reserva para hacer referencia al logaritmo de la relación de distribución. $\log D$ será diferente de $\log P$ en aquellas situaciones en las que el compuesto además participa en un equilibrio químico secundario (p. ej., ionización, agregación, formación de pares iónicos, etc.).

Para la cuantificación de $\log P$ y $\log D$ se han desarrollado una gran variedad de métodos experimentales bien directos (apartado I.3.1) o indirectos (apartado I.4), métodos computacionales basados en los descriptores solvatocrómicos (apartado I.3.2) de los solutos (ecuaciones I.7 y I.8) y métodos computacionales basados en descriptores de la estructura molecular (apartado I.3.3).

En los métodos experimentales directos la sustancia estudiada entra en equilibrio con las fases de *n*-octanol y agua. En cambio, los métodos experimentales indirectos se basan en la obtención de una correlación empírica entre los valores del logaritmo de la relación de reparto *n*-octanol/agua y los valores de otro parámetro relacionado con otro proceso de reparto para un conjunto de compuestos (*Danielsson L.G. y col., 1996*). Dentro de los métodos experimentales indirectos para la estimación de $\log P$ y $\log D$, se encuentran los basados en las técnicas de separación cromatográficas y electroforéticas, que debido a su uso tan extendido y a que este tipo de estudios conforma una parte importante de esta Tesis Doctoral, se tratarán con más detalle en el apartado I.4, haciendo especial énfasis en los resultados obtenidos en cromatografía líquida en fase inversa.

I.3.1.- Métodos experimentales directos para la determinación de la relación de reparto o de distribución *n*-octanol/agua

La **extracción líquido-líquido** es el método clásico para la determinación de la relación de reparto en el sistema bifásico *n*-octanol/agua. La organización para la cooperación y desarrollo económico (OECD, siglas inglesas de "*Organisation for the Economic Cooperation and Development*") propuso un procedimiento estándar para la evaluación de $\log P$ basado en dicho método (OECD, 1995). En este método, el compuesto a investigar se introduce en un embudo de decantación que contiene las dos fases (*n*-octanol y agua) y se agita durante un periodo de tiempo suficientemente largo a fin de alcanzar el equilibrio. Posteriormente, se separan las dos fases y se lleva a cabo la determinación de la sustancia de interés en cada una de ellas. A menudo, se requiere centrifugar la fase acuosa a fin de eliminar pequeñas gotas de *n*-octanol como resultado de la emulsión formada durante la agitación.

El intervalo de aplicación del método es limitado ya que viene determinado por la concentración menor de analito que se puede medir de forma fiable en ambas fases, es decir, por el límite de detección del método analítico utilizado para su determinación. El método no resulta adecuado para sustancias muy hidrófobas ($\log P > 4$) (OECD, 1995) ya que cuando la concentración de analito en la fase acuosa es baja, pequeñas contaminaciones de *n*-octanol provocan una sobreestimación de la concentración del analito y, por tanto, grandes errores en la estimación de su $\log P$. Siguiendo el razonamiento inverso, tampoco resulta adecuado para sustancias muy hidrófilas. Por otro lado, a fin de obtener resultados reproducibles es conveniente minimizar efectos tales como la adsorción del compuesto a investigar sobre las superficies de vidrio o de teflón, controlar el pH de la fase acuosa y la temperatura.

Otros inconvenientes de la técnica son la dificultad de realizar las experiencias con el disolvente *n*-octanol (olor fuerte, elevada solubilidad en agua y formación de emulsiones con el agua), su elevado coste, lentitud, necesidad de compuestos y disolventes muy puros, así como, un gran esfuerzo experimental que la hacen poco viable con fines de barrido "*screening*" (Danielsson L.G. y col., 1996). Por ello, se ha puesto mucho empeño en encontrar nuevas metodologías que permitan estimar la relación de reparto *n*-octanol/agua de los compuestos de una forma rápida y reproducible. En la Tabla I.4 se muestra un resumen de algunas características de dichas metodologías (Danielsson L.G. y col., 1996).

Brooke y col. (Brooke D. y col., 1986; 1990) desarrollaron el método denominado "*stir-flask*". En este método se pone en contacto la fase acuosa con la fase orgánica (*n*-octanol) que contiene el compuesto a investigar con la ayuda de un agitador magnético de teflón. El sistema se agita durante un periodo largo de tiempo (al menos 36 h) que permita que se alcance el equilibrio. Para sustancias muy hidrófobas ($\log P > 5$), el tiempo de agitación puede ser de dos a tres días.

Los resultados obtenidos por este método han mostrado ser muy reproducibles y están de acuerdo con los valores de $\log P$ obtenidos mediante otras técnicas. Este método elimina el problema de la formación de emulsiones, pero no otros problemas como la adsorción del compuesto a investigar sobre las superficies de vidrio, el control estricto del pH y de la temperatura y el problema de la determinación de analitos con valores extremos de $\log P$.

Brändström (*Brändström A., 1963*) propuso el denominado método **pH-métrico** ("*pH-metric*") para la determinación de las relaciones de distribución *n*-octanol/agua (D , $\log D$) de compuestos ionizables. Este método es muy útil pero requiere que los analitos tengan un carácter ácido o básico moderadamente fuerte, la temperatura a la que se realiza el ensayo debe controlarse de forma estricta y las disoluciones de ensayo deben protegerse del aire con un gas inerte. El método pH-métrico está basado en las valoraciones potenciométricas del soluto en medio acuoso y tras la adición de *n*-octanol, para la determinación de sus constantes de acidez (K_a) en dichos medios. La diferencia observada entre los dos valores de pK_a obtenidos está relacionada con $\log D$, el cual se calcula a partir de una serie de ecuaciones establecidas (*OECD, 2000*). Seiler (*Seiler P., 1974*) mejoró la técnica permitiendo la determinación simultánea del pK_a y $\log D$ a partir de una única valoración. Se han propuesto modificaciones posteriores, por ejemplo, para el tratamiento de compuestos con varias constantes de disociación (*Comer J., 1994*). La compañía Sirius Analytical Instruments Ltd., ha comercializado equipos para realizar este tipo de determinaciones basadas en el método pH-métrico.

En el método de **columna generadora** ("*generator-column*") (*DeVoe H. y col., 1981*) se genera una fase estacionaria orgánica de *n*-octanol. A una columna rellena de un soporte sólido inerte (p. ej., Chromosorb W, bolas de vidrio) que retiene al *n*-octanol se añade una disolución del compuesto a investigar preparada en *n*-octanol saturado en agua. La fase móvil, que contiene agua saturada en *n*-octanol, se bombea a través de la columna y se determina el analito en la fase acuosa que abandona la columna. El procedimiento aunque es largo y costoso, resulta útil para la determinación de la hidrofobicidad de compuestos con $\log P$ elevados, se reduce el riesgo de formación de emulsiones y de pérdidas por volatilización. Existen una serie de objeciones sobre esta técnica acerca de las posibles interacciones del soluto y la columna y principalmente acerca de si el tiempo de contacto entre las dos fases es suficiente para que se alcance el equilibrio.

La **cromatografía en contracorriente** se ha utilizado ampliamente para la estimación de los valores de $\log P$ o de $\log D$ (*Foucault A.P., 1991*). En este método, se utilizan dos disolventes inmiscibles equilibrados entre sí, uno actúa como fase estacionaria y el otro como fase móvil, entre los cuales tiene lugar el reparto del soluto. Se utiliza un campo gravitacional y centrífugo en lugar de un soporte sólido inerte para retener la fase estacionaria. El valor de $\log D$ (o de $\log P$) se determina a partir de los volúmenes de retención del compuesto (V_R), del volumen de la fase estacionaria (V_S) y de la fase móvil (V_M) en la columna, utilizando la relación fundamental de la

cromatografía: $V_R = D V_S + V_M$. Puesto que en cromatografía en contracorriente no se emplea un soporte sólido, no se observan todos los inconvenientes debidos al soporte sólido de sílice, tales como desnaturalización de las cadenas alquílicas, intervalo de pH limitado, asimetría de picos debido a la interacción del soluto con los grupos silanol residuales. Además, esta técnica ofrece ventajas similares a la cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC, siglas inglesas de "*reversed phase high performance liquid chromatography*" o simplemente RPLC "*reversed phase liquid chromatography*"), tales como el tamaño de muestra pequeño, la insensibilidad a las impurezas y la facilidad de automatización. Sin embargo, la falta de un soporte sólido para la fase estacionaria hace que la precisión de la técnica sea similar a la del método tradicional de extracción líquido-líquido y el límite superior del intervalo de aplicación corresponde a valores de $\log P$ o $\log D$ entorno a 4.

En la técnica denominada de **extracción por inyección en flujo** (*Danielsson L.G. y col., 1994*) se utiliza un sistema de extracción en continuo basado en el análisis por inyección en flujo y un flujo segmentado líquido-líquido. En esta técnica, el compuesto a investigar se disuelve en cualquiera de las dos fases y se inyecta sobre el portador constituido por la misma fase en que se ha disuelto. Las dos fases inmiscibles se bombean continuamente, fluyen a través de un segmentador hasta el serpentín de extracción donde el compuesto se reparte entre las dos fases segmentadas. Una fracción del flujo acuoso se separa y se lleva a un espectrofotómetro donde se registra la señal de absorbancia a las longitud de onda deseada. El método es rápido, sencillo y utiliza pequeñas cantidades de muestra, el instrumental requerido es sencillo y versátil y los resultados obtenidos son muy reproducibles. Una desventaja de este método es el reducido intervalo de aplicación.

Tabla I.4.- Resumen de alguna de las características de los métodos experimentales directos propuestos para estimar $\log P$ (Danielsson L.G. y col., 1996).

Metodología	Intervalo de aplicación	Consumo muestra	Tiempo por muestra	Desviación estándar ^a	Consumo disolvente por muestra	Referencia
Extracción líquido-líquido convencional	$-2 < \log P < 4$	20 mg	h	< 0.3	100 mL	<i>OECD, 1995</i>
"Stir-flask"	$\log P < 8.2$	15 - 3000 mg	36 - 72 h	< 0.1	20-50 mL	<i>Brooke D. y col., 1990</i>
pH-métrico	$-2 < \log P < 6$	3 - 40 mg	> 30 min	-	20 mL	<i>OECD, 2000</i>
Columna generadora	$\log P < 8.2$	10 mg	h - días	< 0.1	100 mL	<i>DeVoe H. y col., 1981</i>
Cromatografía en contracorriente	$-2.5 < \log P < 4.1$	0.5 - 30 mg	25 min - 6 h	< 0.1	20 mL-10 L	<i>Foucault A.P., 1991</i>
Extracción por inyección en flujo	$-1.2 < \log P < 3.4$	< 1 mg	< 15 min	< 0.1	< 10 mL	<i>Danielsson L.G. y col., 1994</i>

^a En unidades logarítmicas.

I.3.2.- Métodos indirectos para la estimación de la relación de reparto *n*-octanol/agua basados en las relaciones lineales de energía de solvatación

El modelo de los parámetros solvatocrómicos de Abraham (ecuación I.8) se puede utilizar para la determinación de las contribuciones de las interacciones intermoleculares individuales responsables del reparto de moléculas neutras en el sistema *n*-octanol/agua. Para ello basta con utilizar $\log P$ como variable dependiente de la ecuación I.8 ($\log SP$) para un conjunto de solutos neutros. Para un conjunto amplio de 613 compuestos se ha obtenido la siguiente relación (Platts J.A. y col., 2000):

$$\log P = 0.088 + 0.562 E - 1.054 S - 0.032 A - 3.460 B + 3.814 V \quad (\text{I.10})$$

$$n = 613; r = 0.9974; F = 23161.6; s_{y/x} = 0.116$$

Los coeficientes de ajuste obtenidos para cada uno de los parámetros se consideran constantes características del sistema, en este caso *n*-octanol/agua, que reflejan las diferencias en las propiedades de solvatación de las dos fases. Por tanto, tanto su signo como su magnitud son importantes para la interpretación de las propiedades del sistema. Así, el coeficiente asociado al parámetro *A* (acidez de los enlaces de hidrógeno del soluto) es próximo a cero lo que indica que el carácter aceptor de los enlaces de hidrógeno del *n*-octanol es similar al del agua. El valor del coeficiente asociado al parámetro *B* (basicidad de los enlaces de hidrógeno del soluto) es negativo, lo que indica que el carácter dador de puentes de hidrógeno del *n*-octanol es inferior al agua. El disolvente *n*-octanol es menos polar que el agua lo cual se pone de manifiesto en el valor negativo del coeficiente asociado al parámetro *S* (polaridad/polarizabilidad del soluto). Las interacciones soluto-disolvente relacionadas con las fuerzas de dispersión se tienen en cuenta con los coeficientes de ajuste asociados a los parámetros *E* y *V*. El valor relativamente grande y positivo del coeficiente de ajuste asociado al parámetro *V* (volumen molar característico de McGowan) es resultado en parte de la mayor energía requerida para formar una cavidad dada en el agua, y por otro lado de las mayores interacciones por fuerzas de dispersión de los solutos con el *n*-octanol. Los solutos con pares de electrones π y n son más polarizables ($E > 0$) que los correspondientes alcanos saturados ($E = 0$) lo que resulta en mayores interacciones de dispersión con *n*-octanol, como muestra el valor positivo del coeficiente asociado al parámetro *E* (exceso de refracción molar) (Abraham M.H. y col., 2002).

I.3.3.- Métodos para la estimación de la relación de reparto *n*-octanol/agua a partir de la estructura molecular de los compuestos

Existen diferentes métodos para el cálculo de $\log P$ de moléculas neutras a partir de su estructura molecular y se han desarrollado varios programas informáticos con tal fin. Algunos de estos métodos, se basan en la contribución aditiva de cada sustituyente, fragmento o átomo presente en la molécula al valor final de $\log P$. Entre ellos cabe destacar el método de cálculo de $\log P$ propuesto por Fujita y Hansch basado en las constantes π de Hansch y el modelo de fragmentación de Rekker basado en la constante hidrófoba de fragmentación f .

Fujita propuso (Fujita T. y col., 1964) el primer método para calcular $\log P$ basado en el cambio en $\log P$ de una estructura base al sustituir uno o más de sus átomos de hidrógeno:

$$\log P(R - X_1 X_2 \dots X_n) = \log P(R - H_1 H_2 \dots H_n) + \sum_{i=1}^n \pi(X_i) + c \quad (I.11)$$

donde $R - H_1 H_2 \dots H_n$ representa a la estructura base, $R - X_1 X_2 \dots X_n$ es la nueva molécula que se diferencia de la estructura base en la sustitución de n átomos de hidrógeno por n sustituyentes X . Por supuesto, el método requiere del valor de $\log P$ experimental de la estructura base ($\log P(R - H_1 H_2 \dots H_n)$) y además de una serie de factores de corrección (c) que son difíciles de estimar (Leo A., 2000).

Nys y Rekker (Nys G.G. y col., 1973; 1974; Rekker R.F. y col., 1992) fueron los primeros en publicar un método de cálculo de $\log P$ basado en fragmentos moleculares.

$$\log P = \sum_{i=1}^n a_i f_i + c \quad (I.12)$$

donde f es la constante hidrófoba de fragmentación o la contribución de un fragmento de la estructura a la hidrofobicidad total de la molécula, n es el número de fragmentos de la estructura, a es un factor numérico que indica la incidencia de un fragmento dado en la estructura molecular y c es un factor de corrección que tiene en cuenta posibles interacciones entre los fragmentos.

Algunos investigadores utilizan métodos teóricos basados en parámetros de química cuántica sobre toda la molécula del soluto (Bodor N. y col., 1989; 1992). Estos métodos se consideran preferibles a los métodos basados en la suma de valores asignados a partes estructurales, los cuales requieren de factores de interacción o correcciones en función de las posibles interacciones entre dichas partes. Sin embargo, estos métodos basados en parámetros de química cuántica, sólo se han aplicado con éxito a familias estructurales muy restringidas (Reddy K. y col., 1996) y cuando se aplican a una gran variedad de estructuras requieren de parámetros adicionales (no de tipo químico cuántico) (Bodor N. y col., 1992).

I.4.- Relaciones cuantitativas estructura-retención (QSRR). Métodos cromatográficos para la estimación de la hidrofobicidad

En los modelos QSRR (siglas en inglés de "*quantitative structure-retention relationships*") se relaciona cuantitativamente los valores de un parámetro de retención de los compuestos en un sistema cromatográfico/electroforético dado con una serie de propiedades físico-químicas y/o descriptores estructurales de los mismos (Kaliszan R., 1987; 1993). Los modelos QSRR (al igual que los modelos QSAR) son una aplicación de la relación extratermodinámica LFER.

La cromatografía líquida en fase inversa y la cromatografía de capa fina, también en la modalidad de fase inversa, se han utilizado ampliamente como métodos indirectos para la estimación de $\log P$ o $\log D$. Más recientemente y con este mismo propósito, también han aparecido numerosas publicaciones basadas en el uso de diversas técnicas electroforéticas. En contraposición a alguna de las técnicas directas anteriormente descritas, las técnicas cromatográficas y electroforéticas tienen un consumo de muestra muy pequeño, la muestra no tiene que ser pura, son relativamente fáciles de automatizar (Poole S.K. y col., 2003-a) y son aplicables para la estimación de un intervalo más amplio de valores de $\log P$ (Danielsson L.G. y col., 1996).

Estos métodos para la estimación de $\log P$ son indirectos, ya que se basan en la construcción de un modelo de correlación (ecuación I.13) entre los valores de un parámetro de retención para una serie de compuestos que conforman el conjunto de calibración y sus respectivos valores de $\log P$. Medidas adicionales de ese parámetro de retención para nuevos solutos (en el mismo sistema de separación en el que se han obtenido los compuestos del conjunto de calibración) se pueden utilizar para la estimación de los valores de $\log P$ de dichos solutos:

$$\log P = b_0 + b_1 \log k \quad (\text{I.13})$$

donde b_0 y b_1 son los coeficientes de ajuste del modelo y k es el factor de retención del soluto (o el factor de retención extrapolado para una fase móvil con un contenido en modificador orgánico igual a cero, k_w). En cromatografía de capa fina, en lugar de $\log k$ o $\log k_w$, se utilizan los parámetros R_M o el valor de R_M extrapolado a una fase móvil sin modificador orgánico (R_{Mw}). La ecuación I.13 constituye un ejemplo de modelo QSRR.

En estos estudios, el reparto de los solutos que tiene lugar en los sistemas cromatográficos y electroforéticos debe mimetizar lo máximo posible el reparto que tiene lugar en el sistema *n*-octanol/agua. Es decir, las interacciones intermoleculares fundamentales que controlan la retención en un sistema cromatográfico o electroforético deben estar correlacionadas con las mismas propiedades responsables del reparto en el sistema *n*-octanol/agua (Danielsson L.G. y col., 1996; Poole S.K. y col., 2003-a; Kaliszan R. y col., 2003). Las ventajas e inconvenientes de los métodos cromatográficos y electroforéticos para la estimación de $\log P$ se tratarán en los siguientes apartados.

Para estudiar las similitudes y diferencias entre los sistemas cromatográficos y electroforéticos y el sistema *n*-octanol/agua se han empleado modelos QSRR basados en LSERs. Así, los modelos obtenidos por aplicación de la ecuación I.8 se han utilizado ampliamente para caracterizar sistemas de cromatografía líquida en fase inversa con fases móviles hidroorgánicas convencionales (*Park J.H. y col., 1988; Abraham M.H. y col., 1994; 1997; Tan L.C. y col., 1998; Al-Haj M.A. y col., 1999; Sándi Á. y col., 2000*) o con fases móviles micelares (*García M.A. y col., 2000; 2001*), sistemas electroforéticos, mayoritariamente cromatografía electrocinética micelar (MEKC, siglas en inglés de "*micellar electrokinetic chromatography*") (*Khaledi M.G. y col., 1998; Poole C.F. y col., 1997; Rosés M. y col., 1999; Trone M.D. y col., 2000-a; 2000-b; Fuguet E. y col., 2001; 2002*) y cromatografía electrocinética con microemulsiones (MEEKC, siglas en inglés de "*microemulsion electrokinetic chromatography*") (*Abraham M.H. y col., 1996-a; Ishihama Y. y col., 1999*). En estos casos, la variable dependiente usualmente utilizada ($\log SP$) es el logaritmo de un parámetro de retención (p. ej., el factor de retención, $\log k$ o $\log k_w$) y una vez obtenido el modelo se puede utilizar para predecir el valor de ese parámetro de retención de compuestos orgánicos neutros en el sistema de separación cromatográfico o electroforético considerado.

La comparación de los coeficientes de ajuste obtenidos en la ecuación I.8 para el sistema *n*-octanol/agua (ecuación I.10) y para el sistema de separación cromatográfico o electroforético da información acerca de la correlación esperable entre los valores del parámetro de retención en el sistema de separación considerado y los valores de $\log P$. Normalmente, en estos casos lo que se compara son los valores obtenidos al dividir los coeficientes de ajuste e , s , a y b por el coeficiente v asociado al volumen molar característico de McGowan, (e/v , s/v , a/v y b/v). Si el valor de estos cocientes para ambos sistemas es prácticamente idéntico, se obtienen buenas correlaciones $\log P$ - parámetro de retención (*Abraham M.H. y col., 1997; Poole S.K. y col., 2003-a*), o lo que es lo mismo, la importancia relativa de las interacciones que tienen lugar en ambos sistemas es equivalente.

I.4.1- Cromatografía de capa fina (TLC)

La cromatografía de capa fina (TLC, siglas en inglés de "*thin-layer chromatography*") se ha utilizado mucho para la determinación de la hidrofobicidad de los compuestos y existen numerosos artículos de revisión que recogen dichas aplicaciones (*Cserhádi T. y col., 1994; Nasal A. y col., 2003; Poole S.K. y col., 2003-a*). En 1941, Martin y Synge (*Martin A.J.P. y col., 1941*) demostraron que el valor del factor de retardo (R_F) obtenido con TLC estaba relacionado con el valor de P , según la siguiente ecuación:

$$P = \text{constante} \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right) \quad (\text{I.14})$$

Marcinkiewicz y Green demostraron que los valores de R_M ($R_M = \log [(1/R_F)-1]$) obtenidos con TLC en fase inversa (RP-TLC, siglas en inglés de "*reversed-phase thin-layer chromatography*") estaban linealmente relacionados con los valores de $\log P$ para una serie de derivados del benceno (*Marcinkiewicz S. y col., 1963*). Utilizando los datos de R_M publicados por estos autores, Iwasa y col. (*Iwasa J. y col., 1965*) observaron una buena correlación ($r = 0.970$) entre los valores de la constante π de Hansch en el sistema *n*-octanol/agua y los valores del parámetro ΔR_M para diez fenoles.

Boyce y Milborrow (*Boyce C.B.C. y col., 1965*) observaron correlaciones entre los valores de R_M extrapolados a una fase móvil hipotética acuosa pura o tampón (R_{Mw}) obtenidos en RP-TLC como parámetros de hidrofobicidad y la actividad molusquicida de algunas *N*-alquiltrietilaminas. La extrapolación de R_M a R_{Mw} se basa en la relación lineal de Soczewiński-Watchmeister (*Soczewiński E. y col., 1962*) y supone que el valor de R_{Mw} obtenido para un soluto dado en una fase estacionaria dada es independiente del sistema agua/modificador orgánico utilizado para la obtención de los valores de R_M . Sin embargo, se ha observado que los valores de R_{Mw} dependen del modificador orgánico utilizado en la fase móvil (*Schoenmakers P.J. y col., 1981*) y que el intervalo de linealidad de las representaciones de R_M frente a la concentración de modificador orgánico en la fase móvil es limitado.

Para la determinación de la hidrofobicidad de los compuestos mediante TLC se utilizan placas de gel de sílice impregnadas con aceite de silicona, parafina líquida u octanol (*Nasal A. y col., 2003*). Utilizado este tipo de placas destacan los trabajos de Biagi y col. en los que se relacionan los valores de $\log P$ con los valores de R_M y R_{Mw} obtenidos usualmente con placas de sílice impregnadas con aceite de silicona (*Biagi G.L. y col., 1964; 1975; 1990-a; 1990-b; 1994-a; 1994-b; 1994-c; 1996*).

En la actualidad, se emplean de forma muy extensa las placas comerciales octadecilsilano (ODS, abreviatura en inglés de "*octadecylsilane*") y con el fin de mejorar la reproducibilidad de los

resultados, se recomienda el uso de placas HPTLC (siglas en inglés de "*high-performance thin-layer chromatography*") disponibles comercialmente.

Las fases móviles empleadas en RP-TLC son mezclas que contienen agua (o tampón) y un disolvente orgánico (modificador) en diversas proporciones. Los modificadores orgánicos utilizados más extensamente son metanol, acetona, acetonitrilo y también, aunque de forma menos frecuente, dioxano o tetrahidrofurano (*Nasal A. y col., 2003*).

Muchos de los métodos de TLC propuestos para la estimación de $\log P$ están restringidos a conjuntos de pocos compuestos con propiedades similares (*Poole S.K. y col., 2003-a*). Una excepción importante es el estudio de Dross y col. (*Dross K. y col., 1994*), que para un conjunto de 78 compuestos no relacionados obtuvieron la siguiente relación entre los valores de R_{Mw} , obtenidos con placas RP-18 TLC y fases móviles agua/metanol, y los valores de $\log P$:

$$R_{Mw} = -0.040 + 0.974 \log P \quad (I.15)$$

$$n = 78; r^2 = 0.963; F = 1992; s_{y/x} = 0.267$$

Posteriormente, Abraham y col. reevaluaron esta relación con el modelo de los parámetros solvatocrómicos (*Abraham M.H. y col., 1996-b*) y mostraron que las propiedades del sistema cromatográfico utilizado por Dross y col. eran similares pero no idénticas a las de $\log P$.

Existe una base de datos con las constantes LSERs características de sistemas cromatográficos de RP-TLC (coeficientes de ajuste de la ecuación I.8) para tres fases estacionarias y una amplia variedad de fases móviles (*Kiridena W. y col., 1998; 1999; Dias N.C. y col., 2000; Poole C.F. y col., 2000*). Los resultados indican que ninguno de estos sistemas cromatográficos muestra constantes exactamente coincidentes a las obtenidas para $\log P$ (ecuación I.10). Alguno de estos sistemas podría utilizarse para la estimación de los valores de $\log P$ de compuestos que son débilmente dipolares/polarizables o dadores de puentes de hidrógeno, pero no son adecuados para la estimación de los valores de $\log P$ de un grupo variado de compuestos.

I.4.2.- Cromatografía líquida en fase inversa (RP-HPLC) convencional

A principios de 1970 se propuso el uso de la cromatografía líquida en fase inversa para la determinación indirecta de la relación de reparto *n*-octanol/agua y desde entonces han aparecido numerosos artículos de revisión que recogen los resultados de multitud de trabajos publicados acerca de la utilidad de la técnica para efectuar dichas estimaciones (*Dorsey J.G. y col., 1993; Kaliszan R. y col., 1993; 2003; Sangster J., 1997; Nasal A. y col., 2003; Poole S.K. y col., 2003-a*).

En la actualidad, la técnica RP-HPLC con fases estacionarias no polares (mayoritariamente alquil-silano) se usa frecuentemente para la estimación de $\log P$. Como fases móviles se utilizan mezclas binarias de agua o tampón con modificadores orgánicos tales como metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano.

A pesar de la multitud de publicaciones, la aplicabilidad de la técnica queda restringida a compuestos relacionados estructuralmente o congéneres, es decir, a aquellos compuestos que presentan un mismo comportamiento de retención aunque no pertenezcan a la misma familia química (*Valkó K., 1987*). Este hecho es debido a las diferencias existentes en las interacciones de los solutos en el sistema *n*-octanol/agua y en los sistemas cromatográficos (*Nasal A. y col., 2003; Poole S.K. y col., 2003-a*):

- i.- En RP-HPLC el reparto de los solutos tiene lugar entre la fase móvil y la fase estacionaria modificada por la adsorción del modificador orgánico presente en la fase móvil.
- ii.- En la fase estacionaria pueden ocurrir interacciones específicas que no están presentes en el sistema de reparto *n*-octanol/agua (p. ej., interacciones de los solutos con los grupos silanol libres).
- iii.- Efectos relacionados con el tamaño de los poros de la fase estacionaria, tales como exclusión por tamaños o carga, están ausentes en el sistema *n*-octanol/agua.

Otros inconvenientes del uso de la RP-HPLC para la estimación de $\log P$ son:

- iv.- Elevada imprecisión de los resultados obtenidos con diferentes columnas comerciales que contienen la misma fase estacionaria pero pertenecientes a diferentes lotes de fabricación.
- v.- Intervalo de pH de trabajo restringido a 2-8 con fases estacionarias alquil-silano convencionales.

A continuación se comentan las fases estacionarias y móviles más utilizadas en RP-HPLC para estimar $\log P$, así como algunas aplicaciones diferenciadas según el modo de desarrollo cromatográfico.

I.4.2.1.- Fases estacionarias

Aunque la estimación cromatográfica de la hidrofobicidad mediante cromatografía líquida en fase inversa convencional se ha extendido mucho, no se han establecido condiciones universales para la estimación de $\log P$, debido en gran parte a la diversidad de columnas comerciales existentes (*Dorsey J.G. y col., 1993*).

Las fases estacionarias comúnmente utilizadas para la estimación de la hidrofobicidad en RP-HPLC son las convencionales formadas por enlace químico de cadenas alquílicas, usualmente octadecilo, en soportes de sílice. Las interacciones existentes entre los grupos silanol libres en la superficie del soporte y los solutos durante el proceso cromatográfico se consideran las responsables de que sólo se observen relaciones $\log k - \log P$ para compuestos congéneros (*Nasal A. y col., 2003*) y también de los problemas asociados con la estimación de la hidrofobicidad de compuestos ionizables (*Nawrocki J., 1997*). Además, estos materiales son químicamente inestables a valores de pH extremos. No obstante, hoy en día se han logrado grandes progresos en la tecnología de los materiales de sílice para fase inversa, con altas densidades de las cadenas alquílicas y técnicas para el bloqueo o desactivación de los grupos silanol que permiten trabajar a un intervalo de pH más amplio (*Nasal A. y col., 2003*). De todos modos, los soportes de sílice son estables en el intervalo de pH fisiológico, y permiten determinar el comportamiento de reparto de los compuestos en dicha zona de pH, lo cual es de gran interés en investigación farmacéutica.

Por otro lado, las fases estacionarias octadecilsilano (ODS) u otras alquil-silano no son adecuadas a fin de obtener una escala cromatográfica de hidrofobicidad universal, comparable entre laboratorios y análoga a la de $\log P$. Ello es debido a la falta de estandarización de estas fases estacionarias que conduce a la obtención de diferentes valores de los parámetros de retención y, por tanto, de hidrofobicidad cuando se utilizan diferentes columnas comerciales con la misma fase móvil (*Nasal A. y col., 2003*).

Se han propuesto diversas metodologías para asemejar el sistema cromatográfico al sistema *n*-octanol/agua. Los primeros intentos todavía vigentes en la actualidad, se basan en el **recubrimiento dinámico de la fase estacionaria con *n*-octanol**, mediante el empleo de fases móviles acuosas saturadas con *n*-octanol (*Mirrlees M.S. y col., 1976; Miyake K. y col., 1978; Cichna M. y col., 1995; Lombardo F. y col., 2000; 2001*). Se han publicado modelos para la predicción de $\log P$ a partir de $\log k$ para compuestos neutros y básicos, con un intervalo de aplicación $0.5 \leq \log P \leq 4$ y un error estándar en la predicción de $s_{\text{pr}} \sim 0.07$ unidades de logarítmicas. Sin embargo, se han encontrado grandes discrepancias para compuestos ácidos (*Poole S.K. y col., 2003-a*). El mayor inconveniente de esta metodología reside en la preparación de las columnas debido a la inestabilidad del recubrimiento, lo que conlleva a problemas de reproducibilidad, sin embargo, hoy en día se han desarrollado procedimientos con los que se consiguen fases estacionarias

considerablemente más estables (Cichna M. y col., 1995). Por otro lado, no permite la adición de modificadores orgánicos a la fase móvil por problemas de estabilidad de la columna, lo que hace que esta técnica no sea aplicable para compuestos muy hidrófobos ($\log P > 3$), ni tampoco sea adecuada con propósitos de alto rendimiento ("high throughput") (A. Nasal y col., 2003; Poole S.K. y col., 2003-a).

Miyake y col. propusieron el uso de **vidrio de un tamaño de poro controlado con un recubrimiento de glicerol** ("glycerol-coated controlled-pore glass", gly-CPG) con fases móviles agua/metanol (pH 2.2) para la estimación de $\log P$ (Miyake K. y col., 1988). No obstante, para la obtención de relaciones $\log k - \log P$, los autores necesitaron variables indicadoras adicionales relativas a la capacidad de formar puentes de hidrógeno de los compuestos. Otra desventaja de las columnas gly-CPG es que no permiten operar a pH básico.

Las **fases estacionarias de polímeros orgánicos** como las del poli(estireno-divinilbenceno) ("poly(styrene-divinylbenzene)", PS-DVB) han mostrado ser estables en el intervalo de pH 1-14. Sin embargo, sólo se han publicado moderadas correlaciones con $\log P$ y para grupos de compuestos congéneres (Bitteur S. y col., 1987; Miyake K. y col., 1987; Lambert W.J. y col., 1990). También, con las fases poliméricas de octadecil-enlazadas las correlaciones entre los parámetros de retención y $\log P$ son bajas o bien comparables a las observadas con columnas ODS (Bechalany A. y col., 1991). Además, algunas de estas fases poliméricas proporcionan interacciones específicas para ciertos compuestos (Yamaguchi J. y col., 1989).

Cuando aparecieron las **columnas de fase inversa de alúmina**, suscitaron gran interés para la parametrización cromatográfica de la hidrofobicidad, ya que la alúmina es estable en un intervalo amplio de pH y no posee grupos silanol. Bien-Vogelsang y col. introdujeron las fases estacionarias de alúmina recubierta de polibutadieno ("polybutadiene-coated alumina", PBCA) (Bien-Vogelsang U. y col., 1984) que son estables en un amplio intervalo de valores de pH de la fase móvil, lo que permite obtener datos de retención de las formas no ionizadas de compuestos ácidos, básicos y neutros. Por tanto, permiten la obtención de una escala cromatográfica continua de la hidrofobicidad de forma más sencilla, rápida y reproducible que el sistema *n*-octanol/agua, si bien hasta el momento su uso no es muy extendido (Kaliszan R., 1988-a; 1988-b; 1990; 2001).

Las **fases estacionarias de carbono grafito** son estables químicamente en un intervalo amplio de pH por lo que resultan también interesantes para estudios de hidrofobicidad. Sin embargo, no se han observado buenas correlaciones $\log k - \log P$ con estas columnas debido a la existencia de interacciones no sólo de tipo hidrófobo sino también de tipo electrónico soluto-fase estacionaria (Nasal A. y col., 2003).

I.4.2.2.- Modo isocrático de RP-HPLC

Desde que Boyce y Milborrow extrapolaron el parámetro de retención R_M determinado experimentalmente al correspondiente a un efluente acuoso puro (R_{Mw}), el uso de datos extrapolados en lugar de los datos obtenidos en una única fase móvil se convirtió en una práctica común, tanto en TLC como en HPLC. Inicialmente esta extrapolación se basó en la siguiente ecuación (*Soczewiński E. y col., 1962; Snyder L.R. y col., 1979*):

$$\log k = \log k_w - S\phi \quad (\text{I.16})$$

donde k_w corresponde a k en una fase móvil acuosa pura, S es una constante para un soluto dado en un sistema HPLC dado y ϕ es la fracción en volumen del modificador orgánico en el efluente. Los valores de $\log k_w$ obtenidos con la ecuación I.16 para un soluto y un sistema cromatográfico dado usualmente son diferentes de los determinados experimentalmente, y dependen del modificador orgánico empleado y del intervalo de concentraciones estudiado para su obtención (*Valkó K. y col., 1993-a*). La mayoría de relaciones $\log k$ vs. ϕ se curvan para valores de ϕ próximos a cero, esto condujo a la inclusión de un término cuadrático en la ecuación I.16 (*Schoenmakers P.J. y col., 1978*):

$$\log k = \log k_w + a_1\phi + a_2\phi^2 \quad (\text{I.17})$$

donde a_1 , a_2 y $\log k_w$ son constantes para un soluto dado en un sistema cromatográfico dado. Sin embargo, se ha observado de nuevo que los valores de $\log k_w$ obtenidos mediante la ecuación I.17 también dependen de la naturaleza del modificador orgánico empleado y del intervalo de concentraciones ensayados y además, difieren de los obtenidos con la ecuación I.16.

Jandera evaluó la exactitud de los valores de $\log k_w$ calculados por extrapolación a partir de las ecuaciones I.16 y I.17 utilizando fases móviles acuosas con modificadores orgánicos tales como metanol, acetonitrilo y 1,4-dioxano para una serie de plaguicidas. Dicho autor observó que el uso de la ecuación lineal proporcionaba errores de hasta un 80% en la estimación de k_w , mientras que los errores obtenidos a partir de la ecuación cuadrática fueron del 30% (*Jandera P., 1984*).

Recientemente, se ha realizado una evaluación estadística del modelo lineal y cuadrático, para un conjunto de 23 compuestos cromatografiados en 18 columnas con fases móviles metanol/agua y acetonitrilo/agua (*Baczek T. y col., 2000*). Los autores observaron que la inclusión del término cuadrático de la ecuación I.17 mejoraba la descripción de los datos de retención cromatográficos de una forma estadísticamente significativa. Por otro lado, los valores de $\log k_w$ obtenidos por extrapolación con los dos modelos, sólo eran estadísticamente comparables con las fases móviles que contenían metanol. Finalmente, las mejores correlaciones $\log k_w$ vs. $\log P$ se observaron con los datos extrapolados con la ecuación lineal (ecuación I.16) y fases móviles de agua/metanol.

Algunos autores sugieren que se obtiene una mejor linealización de las relaciones entre el factor de retención y la proporción de modificador orgánico en la fase móvil realizando una transformación matemática de las variables. De este modo se han obtenido de forma ocasional relaciones lineales del tipo $\log k$ vs. $\log \phi$ (Taylor R.B. y col., 1989) o bien $\log k$ vs. $\log(1/\phi)$ (Kaibara A. y col., 1990). Otros autores derivaron relaciones a partir de $1/k$ frente a la fracción molar de modificador orgánico en la fase móvil (Lanin S.N. y col., 1991).

Johnson y col. (Johnson B.P. y col., 1986) propusieron un método alternativo para estimar el valor de $\log k_w$ utilizando la escala solvatocrómica $E_T(30)$ como una medida de la polaridad de la fase móvil. La escala $E_T(30)$ está basada en el desplazamiento del máximo del espectro de absorción del fenolato de 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenil-*N*-piridinio) ($E_T(30)$, también denominado "betaine de Dimroth y Reichardt") en función de la polaridad del disolvente. Para un determinado analito el valor de $\log k_w$ se obtiene mediante el ajuste de los pares de valores ($E_T(30)$, $\log k$) obtenidos para diversas proporciones agua / modificador orgánico a la ecuación I.18 y la posterior extrapolación del valor de $E_T(30)$ en medio acuoso puro.

$$\log k = b_0 + b_1 \cdot E_T(30) \quad (\text{I.18})$$

Algunos autores han observado una mejora en la linealidad de las representaciones $\log k$ vs. $E_T(30)$ respecto a las basadas en la fracción en volumen de modificador orgánico ϕ (Johnson B.P. y col., 1986). Sin embargo, a la vista de las publicaciones posteriores (Michels J.J. y col., 1990; Valkó K. y col., 1993-a; Tate P.A. y col., 2004), dicha mejora en la linealidad no es tan obvia (Nasal A. y col., 2003).

En la práctica, los errores generales cometidos en la estimación de $\log k_w$ y su definición ambigua, lo convierten en un parámetro inaceptable para su uso en modelos de correlación. La selección del parámetro cromatográfico adecuado para la estimación de $\log P$, no ha recibido la atención necesaria y ello ha contribuido a la obtención de modelos muy pobres en muchos estudios (Poole S.K. y col., 2003-a). Se han realizado otros estudios con el fin de encontrar un parámetro cromatográfico alternativo que dependa menos de las condiciones cromatográficas y que proporcione una escala continua y universal para la medida de $\log P$.

Tal y como se ha comentado anteriormente, para obtener altas correlaciones entre la retención cromatográfica y $\log P$, el proceso de reparto en RP-HPLC debe mimetizar lo máximo posible al sistema *n*-octanol/agua. Las diferencias en la contribución de las interacciones por puentes de hidrógeno en ambos sistemas son usualmente las más notables. Yamagami y col. (Yamagami C. y col., 1994-a) observaron que el uso de $\log k_w$ proporciona buenas correlaciones con $\log P$ cuando los compuestos no presentan grupos con fuerte carácter dador ni aceptor de puentes de hidrógeno (p. ej., OR, -SR, NMe₂). Sin embargo, $\log k_w$ sobreestima el valor de $\log P$ de

compuestos con grupos aceptores de hidrógeno (p. ej., ésteres) y subestima el valor de $\log P$ de compuestos con grupos dadores de puentes de hidrógeno (p. ej., alcoholes, ácidos).

Mediante cromatografía líquida convencional, usualmente sólo se han obtenido buenas correlaciones $\log k$ o $\log k_w - \log P$ para grupos de compuestos congéneres y estas relaciones son distintas para cada grupo de compuestos. En ocasiones, se han observado pobres correlaciones incluso para conjuntos de compuestos congéneres, como por ejemplo para pirazinas mono-sustituidas (Yamagami C. y col., 1991), pirimidinas mono-sustituidas (Yamagami C. y col., 1994-b) fenil-carbamatos (Yamagami C. y col., 1996) y anilidas (Djaković-Sekulić T.L. y col., 2001).

Salvo raras excepciones (Jinno K. y col., 1991; Kaliszan K. y col., 1999-a), el porcentaje de éxito en la estimación de $\log P$ de compuestos no relacionados estructuralmente a partir de su retención con fases estacionarias alquil-enlazadas y fases móviles convencionales agua/disolvente orgánico es muy bajo (Poole S.K. y col., 2003-a). Du y col. (Du C.M. y col., 2001) utilizando una columna Luna C₁₈ y fases móviles acetonitrilo/agua (40% v/v) que contenían acetato amónico ajustado a pH 7.4 para compuestos neutros, a pH 10.5 para bases débiles y a pH 2 para ácidos débiles a fin de suprimir la ionización, obtuvieron la siguiente correlación:

$$\log P = (1.10 \pm 0.05) + (1.63 \pm 0.05) \log k \quad (\text{I.19})$$

$$n = 111; r = 0.951; RMSEC = 0.308$$

Esta correlación se mejoró ($r = 0.982$; $RMSEC = 0.189$) al introducir en la ecuación I.19 el descriptor solvatocrómico A (acidez de los enlaces de hidrógeno del soluto). Los autores concluyeron que el sistema cromatográfico constituido por una columna Luna C₁₈ y fases móviles acetonitrilo/agua es un sistema adecuado para la estimación de $\log P$ de compuestos neutros con bajo carácter dador de puentes de hidrógeno.

Valkó (Valkó K., 1987) propuso un método para detectar la presencia de compuestos congéneres. El procedimiento consiste en la representación de los parámetros $\log k_w$ frente a la fuerza eluyente S obtenidos al efectuar el ajuste de la ecuación I.16. La obtención de buenos coeficientes de correlación indica que los compuestos presentan el mismo carácter dador-aceptor de puentes de hidrógeno y exhiben un comportamiento de retención de congéneres en el sistema cromatográfico. Unos años más tarde, esta misma autora (Valkó K. y col., 1993-b) propuso un nuevo parámetro cromatográfico de hidrofobicidad (ϕ_0) a fin de subsanar las bajas correlaciones observadas entre los datos de retención cromatográficos y $\log P$ para compuestos no relacionados estructuralmente. Para un compuesto dado, ϕ_0 se define como la proporción de modificador orgánico en la fase móvil necesaria para que $\log k$ sea igual a cero. El método implica la medida de los valores de $\log k$ a diferentes concentraciones del modificador orgánico en la fase móvil, preferiblemente en la región de concentraciones donde $\log k \sim 0$. El valor de ϕ_0 se obtiene a partir de los valores de la pendiente y la ordenada en el origen de la representación $\log k$ vs. ϕ (ecuación

I.16, $\varphi_0 = \log k_w / S$). Estos autores observaron una buena correlación entre los valores de φ_0 y $\log P$ para alrededor de 500 compuestos cromatografiados en unas condiciones de pH de la fase móvil en las que todos ellos estuvieran en su forma neutra. Sin embargo, los valores de φ_0 mostraron ser característicos del compuesto y dependientes del tipo de modificador orgánico, del pH de la fase móvil y de la temperatura, además, se observaron dificultades en la obtención de los valores de φ_0 para compuestos con hidrofobicidad extrema.

Klein y col. (*Klein W. y col., 1988*) realizaron un estudio de los resultados obtenidos en 19 laboratorios en la estimación de $\log P$ a partir de la retención en RP-HPLC de compuestos no relacionados estructuralmente, con el propósito de actualizar la directriz 107 de la OECD (estimación clásica de $\log P$ mediante extracción líquido-líquido) mediante la inclusión de un método de HPLC (actual directriz 117; *OECD, 2002*). Todos los laboratorios utilizaron como fases móviles tampón fosfato/metanol a valores de pH en los que los compuestos no estuvieran ionizados y diferentes tipos de columnas C_{18} . Los autores llegaron a la conclusión de que la selección de los compuestos que conforman el conjunto de calibración era un punto clave para el desarrollo de los modelos. Para la realización de estimaciones fiables de $\log P$ recomendaron el uso de al menos 6 compuestos, los cuales debían cubrir un amplio intervalo de valores de $\log P$ y una amplia variedad de estructuras orgánicas que incluyeran compuestos neutros, ácidos y básicos. Además, para cada compuesto se debía disponer de los valores de $\log P$ determinados experimentalmente y obtenidos mediante diferentes programas informáticos de cálculo consistentes entre ellos. Por otro lado, recomendaron el uso de la variable $\log k$ en lugar de $\log k_w$ debido al esfuerzo experimental requerido para su obtención. En cuanto a la composición de la fase móvil, recomendaron reducir en lo posible la concentración de metanol en la fase móvil (máximo 75%). En cuanto a la fase estacionaria, recomendaron el uso de columnas C_{18} de un tamaño de partícula de 5 μm . La longitud de la columna no resultó ser un factor importante, pero recomendaron el uso de columnas más cortas y/o flujos de fase móvil más altos para el caso de compuestos muy hidrófobos. La temperatura de trabajo tampoco resultó ser un factor crítico, pero sí realizar los experimentos a temperatura constante (± 2 °C). Bajo estas condiciones experimentales, los valores de $\log P$ predichos para un conjunto de moléculas de prueba mostraban desviaciones entorno a 0.5 unidades logarítmicas respecto a los valores experimentales obtenidos mediante extracción líquido-líquido y además este método de RP-HPLC era preferible para compuestos muy hidrófobos ($4 \leq \log P \leq 6$).

Sangster recogió en una monografía las diversas correlaciones publicadas entre los valores de $\log k$ o $\log k_w$ determinados en diferentes sistemas cromatográficos y los valores de $\log P$ para más de mil conjuntos de compuestos congéneres, no congéneres y con diferentes propiedades dadoras/aceptoras de puentes de hidrógeno (*Sangster J., 1997*).

I.4.2.3.- Elución por gradiente en RP-HPLC

Una desventaja de las separaciones isocráticas en cromatografía líquida como métodos de alta producción o rendimiento ("*high throughput*") es que la retención puede ser bien demasiado grande o bien insuficiente para una determinación precisa de los factores de retención. Este inconveniente puede subsanarse mediante el empleo de columnas de diferente longitud y/o variando el flujo de la fase móvil. Con propósitos de análisis, la elución por gradiente se emplea de forma amplia para la separación de compuestos con un amplio intervalo de valores de retención. Por tanto, la estimación de $\log P$ mediante cromatografía líquida con elución por gradiente es una aplicación adicional de una técnica bien conocida (Poole S.K. y col., 2003-a).

Para la obtención de las correlaciones retención – $\log P$ mediante elución por gradiente, se han utilizado multitud de parámetros cromatográficos. A modo de ejemplo, Valkó y col. (Valkó K. y col., 1997; Du C.M. y col., 1998) emplearon la escala φ_0 para la obtención del denominado índice cromatográfico por gradiente de hidrofobicidad *CHI*. Los valores de *CHI* se pueden calcular mediante la siguiente expresión:

$$CHI = At_R + B \quad (I.20)$$

donde t_R es el tiempo de retención con elución por gradiente del compuesto y las constantes *A* y *B* se determinan mediante el ajuste de los valores de φ_0 determinados en modo isocrático y de t_R de una serie de compuestos que conforman el conjunto de calibración a la ecuación $\varphi_0 = A t_R + B$. Los valores de *A* y *B* dependen del flujo de la fase móvil, de la longitud de la columna, del tiempo de gradiente, el tipo de columna, etc.

Valkó y col. (Valkó K. y col., 2001) con columnas Luna C₁₈ y elución por gradiente con fases móviles tampón acuoso (pH 2, 7.4 y 10.5)/acetonitrilo, observaron que para la estimación de $\log P$ de compuestos neutros o no ionizados a partir del índice de hidrofobicidad *CHI*, era necesaria la inclusión adicional del parámetro solvatocrómico *A*:

$$\log P = 0.054CHI + 1.35A - 1.88 \quad (I.21)$$

$$n = 86; r^2 = 0.941; F = 655; s_{y/x} = 0.29$$

I.4.3.- Cromatografía líquida micelar (MLC)

La cromatografía líquida micelar (MLC, siglas inglesas de "*micellar liquid chromatography*") es un tipo de cromatografía líquida en fase inversa, que utiliza como fases móviles disoluciones de surfactantes por encima de su concentración micelar crítica (CMC, siglas de "*critical micellar concentration*"; simbolizada por c_M) (Armstrong D.W. y col., 1980; Hinze W.L., 1987; Dorsey J.G., 1987; Berthod A. y col., 1988-a; 2000; Khaledi M.G., 1997; Medina-Hernández M.J. y col., 1992). A concentraciones de surfactante superiores a la CMC, los monómeros de surfactante se encuentran en equilibrio entre la fase móvil, donde existen como entidades individuales o formando agregados micelares, y la fase estacionaria modificada por la adsorción de monómeros de surfactante. En estas condiciones, la cantidad de surfactante adsorbido permanece constante, una vez se ha alcanzado el equilibrio fase estacionaria / fase móvil (Dorsey J.G. y col., 1984; Landy J.S., y col., 1985; Berthod A. y col., 1986-a; 1987). La adsorción de un surfactante en una fase estacionaria formada por sílice enlazada a cadenas alquílicas (p. ej., C_1 , C_8 y C_{18}) puede ocurrir de dos formas:

- a. -Adsorción hidrófoba: debida a la interacción hidrófoba entre las colas hidrocarbonadas de las moléculas de surfactante y las cadenas alquílicas enlazadas a la sílice. De esta forma, la cabeza polar queda en contacto con la fase móvil, lo que le imparte a la fase estacionaria una cierta capacidad de intercambio iónico cuando se utilizan surfactantes iónicos.
- b. -Adsorción silanofílica: debida a la interacción entre la cabeza polar del surfactante y los grupos silanol residuales. De esta forma, las cadenas hidrocarbonadas de surfactante quedan orientadas hacia la fase móvil, y la fase estacionaria adquiere un carácter más hidrófobo.

Para la preparación de las fases móviles en MLC, se pueden utilizar una gran variedad de surfactantes de diversa naturaleza (no iónicos, aniónicos, catiónicos y zwitteriónicos), que confieren una gran versatilidad a la técnica respecto a la cromatografía líquida convencional en fase inversa. En MLC existen diferentes tipos de interacciones (electrónicas, hidrófobas y estéricas) del soluto con la fase móvil micelar y con la fase estacionaria modificada por la adsorción del surfactante (Figura I.1), que son imposibles de conseguir con un sistema hidroorgánico; y cuya importancia depende de la naturaleza del soluto y del surfactante:

- a.- Cuando se cromatografían solutos neutros, las interacciones de tipo hidrófobo son las más importantes.
- b.- Cuando se cromatografían solutos iónicos con surfactantes de la misma carga la repulsión electrostática entre el soluto y la micela cargada no afecta apreciablemente a la retención, puesto que el soluto puede permanecer en la pseudofase acuosa, moviéndose a lo largo de la columna. Por el contrario, la repulsión entre el soluto y los monómeros de surfactante adsorbidos sobre la fase estacionaria dificulta la retención y cabría esperar que los solutos no fueran retenidos por la columna. Sin embargo, algunos solutos pueden quedar retenidos por la fase estacionaria, si existe algún tipo de interacción hidrófoba entre la fase estacionaria y el soluto.
- c.- Con solutos que poseen carga opuesta a la del surfactante cabe esperar una considerable atracción electrostática entre el soluto y el surfactante presente tanto en la fase estacionaria como en la fase móvil. Las atracciones electrostáticas e hidrófobas soluto-fase estacionaria que favorecen la retención estarán en competición con las interacciones electrostáticas e hidrófobas soluto-micela que disminuyen la retención.

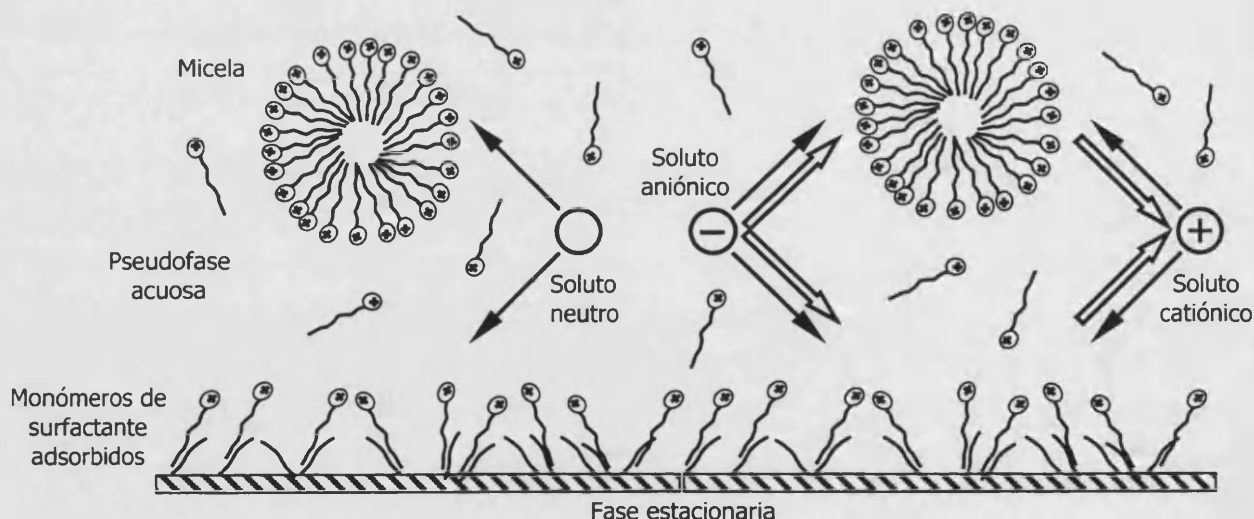


Figura I.1.- Interacciones hidrófobas (→) y electrostáticas (⇔) soluto-micela y soluto-fase estacionaria con un surfactante catiónico para solutos neutros, aniónicos y catiónicos.

La existencia de todo este tipo de interacciones y equilibrios de distribución en los que participa el soluto, hace posible que prácticamente cualquier compuesto orgánico pueda ser separado mediante MLC. Así, se han publicado procedimientos para la separación de todo tipo de compuestos aniónicos, catiónicos y neutros (*Kirkbright G.F. y col., 1984; Kirkman C.M. y col., 1984; Mullins F.G.P. y col., 1984; 1986; Borgerding M.F. y col., 1985; Stratton L.P. y col., 1986; Escuder-Gilabert L. y col., 2002; Bermúdez-Saldaña J.M. y col., 2002; Cholbi-Cholbi M.F. y col., 2004*).

En MLC, además de la naturaleza de la fase estacionaria, la naturaleza del soluto y de la naturaleza y concentración de surfactante en la fase móvil, existen otros factores que pueden afectar a la retención de un soluto, como el pH, la fuerza iónica, y la concentración de modificador orgánico en la fase móvil, así como la temperatura a la que tiene lugar la separación cromatográfica.

Con fases estacionarias alquílicas, el aumento de la **concentración de surfactante** generalmente produce una disminución de la retención de los compuestos, más acusada para los compuestos más hidrófobos.

El **pH** de la fase móvil micelar es un factor importante en la separación de solutos ionizables. La retención de ácidos y bases orgánicas se ve afectada por el pH del medio, ya que las constantes de asociación soluto-micela (K_{AM}) de las dos formas ácido-base son distintas. Pequeños cambios en el pH del medio pueden alterar significativamente la retención cromatográfica, particularmente a valores de pH cercanos al logaritmo de la constante de protonación (*Arunyanart M., y col., 1985*). Por otro lado, debido a la diferente afinidad de las especies ácido-base hacia las micelas, los valores de las constantes de protonación se pueden modificar en medios micelares (*Khaledi M.G. y col., 1990-a; Rodgers A.H. y col., 1994*). Estas modificaciones son muy acusadas cuando se utilizan surfactantes iónicos debido a la existencia de repulsiones o atracciones electrostáticas con alguna/-s de las especies ácido-base del compuesto. Así, se ha observado una disminución o un aumento de los valores de las constantes de protonación del orden de 0.5 a 3 unidades logarítmicas respecto a un medio acuoso puro, con surfactantes catiónicos y aniónicos, respectivamente (*El Seoud O.A., 1989; Bonet-Domingo E. y col., 1994; Cuenca-Benito M. y col., 1998*). Cuando se utilizan surfactantes neutros, debido a la ausencia de interacciones electrostáticas, no cabe esperar grandes modificaciones de las constantes de protonación.

Armstrong y Stine (*Armstrong D.W. y col., 1983-b*) observaron que al aumentar la **fuerza iónica** de la fase móvil, la constante de asociación soluto-micela aumentaba. Este efecto se ha explicado como consecuencia de la disminución de la capa de contraiones de la micela, que facilita la interacción hidrófoba soluto-micela.

En cuanto al **efecto de la temperatura** a la que tiene lugar el proceso cromatográfico sobre la retención de los compuestos en MLC, se ha observado que la retención disminuye al aumentar la temperatura. Sin embargo, el efecto de la temperatura sobre la retención es menos pronunciado con fases móviles micelares que con hidroorgánicas. Tomasella y col. (*Tomasella F.P. y col., 1990; 1991*) observaron que las constantes de asociación soluto-micela y soluto-fase estacionaria disminuyen al aumentar la temperatura. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la temperatura modifica las constantes de protonación de los solutos, por tanto, para compuestos ionizables eluidos con fases móviles micelares, especialmente de surfactantes iónicos, se pueden observar grandes cambios en su retención al cambiar la temperatura de trabajo.

Un inconveniente del uso de fases móviles micelares puras frente al de hidroorgánicas es la obtención de bajas eficacias de los picos cromatográficos. La causa fundamental del ensanchamiento de los picos cromatográficos en MLC es la lenta transferencia de masa del soluto de la fase móvil a la fase estacionaria modificada por la adsorción de surfactante (*Yarmchuk P. y col., 1984; Berthod A. y col., 1991; 1997*). Esta limitación puede superarse mediante la adición de pequeñas cantidades de **modificadores orgánicos** a la fase móvil (*Dorsey J.G. y col., 1983; Khaleli M.G. y col., 1990-b; Garcia M.A. y col., 1993; Marina M.L. y col., 1994*). A los eluyentes ternarios compuestos de agua, surfactante y un disolvente orgánico se denominan fases móviles micelares híbridas o mixtas. Entre los disolventes orgánicos, los alcoholes de cadena corta han demostrado ser, generalmente, los que ofrecen mejores resultados (*Yarmchuk P. y col., 1984; Berthod A. y col., 1988-b; Borgerding M.F. y col., 1989*). La adición de un modificador orgánico a un medio micelar puede alterar las propiedades de las micelas, como la CMC y el número de agregación e incluso se pueden incorporar a las micelas formando micelas mixtas (p. ej., con *n*-butanol, *n*-pentanol). Por otro lado, grandes concentraciones de alcohol pueden destruir completamente la estructura micelar (*Yarmchuk P. y col., 1984*). Además la presencia de un modificador orgánico en la fase móvil micelar produce la desorción parcial de los monómeros de surfactante adsorbidos sobre la fase estacionaria (*Berthod A. y col., 1988-b*) y origina una pseudofase acuosa menos polar, estos dos hechos contribuyen a la disminución de la retención de los solutos y a la mejora de la eficacia de los picos cromatográficos. Por un lado este efecto es mayor cuanto mayor es la concentración e hidrofobicidad del modificador (*Borgerding M.F. y col., 1989*) y por otro lado, la disminución de la retención es más acusada cuanto mayor es la hidrofobicidad del soluto. Este último hecho contribuye al aumento de la selectividad.

Desde que apareció la primera publicación referente al uso de fases móviles micelares, se han indicado algunas ventajas respecto a las fases hidroorgánicas convencionales, como son su versatilidad, bajo coste, baja inflamabilidad, menor toxicidad y biodegradabilidad. También cabe destacar la posibilidad de describir el comportamiento cromatográfico de los solutos a partir de ecuaciones sencillas (*Armstrong D.W. y col., 1981; Arunyanart M. y col., 1984; Foley J.P., 1990;*

Medina-Hernández M.J., y col., 1992; Torres-Lapasíó J.R. y col., 1993; 1994; Jiménez O. y col., 1997), la realización de gradientes de elución de surfactante sin necesidad de reequilibrar la columna (*Dorsey J.G. y col., 1984; Landy J.S. y col., 1984*), la posibilidad de inyectar directamente muestras fisiológicas en el sistema cromatográfico (*Bonet-Domingo E. y col., 1994; Rapado-Martínez I. y col., 1999; Martín-Biosca Y. y col., 2000-a; Escuder-Gilabert L. y col., 2001*) y por último la separación de compuestos de distinta naturaleza (polares, iónicos, apolares) con una sola fase móvil (*Yarmchuk P. y col., 1982; Berthod A. y col., 1986-b; Dorsey J.G., 1987; Khaledi M.G y col., 1990-b*).

I.4.3.1.- Estimación de la hidrofobicidad de compuestos mediante MLC

En MLC, la hidrofobicidad de los compuestos es una de las propiedades que determina su interacción con la fase estacionaria y con las micelas y por tanto, su retención. Las características particulares de esta modalidad cromatográfica sugieren que la MLC puede ser una buena alternativa en la predicción de la hidrofobicidad frente a la cromatografía líquida convencional en fase inversa, al solucionar en gran medida los problemas que esta última presenta. Entre las ventajas de las fases móviles micelares frente a las fases móviles convencionales en la predicción cromatográfica de la hidrofobicidad de los compuestos, cabe destacar:

- i.- Elevado poder solubilizante de las fases móviles micelares, lo que hace factible la determinación de la hidrofobicidad de compuestos muy apolares.
- ii.- Aumento del carácter hidrófobo de la fase estacionaria y reducción de los grupos silanol sobre la superficie de la fase estacionaria como consecuencia de la adsorción de los monómeros de surfactante sobre dicha superficie, lo que resulta de gran importancia en la predicción de la hidrofobicidad (*Bij K.E. y col., 1981; Khaledi M.G. y col., 1989; Medina-Hernández y col., 1992*).
- iii.- El entorno de la fase estacionaria en MLC es independiente de la concentración de micelas en la fase móvil (*Khaledi M.G. y col., 1989*).
- iv.- Posible exaltación de las interacciones hidrófobas del soluto en el sistema cromatográfico mediante la selección adecuada de la naturaleza del surfactante (p. ej., longitud de la cadena hidrocarbonada, grupo funcional de la cabeza polar o iónica) (*Khaledi M.G. y col., 1989*).
- v.- Existencia de modelos de retención fiables que relacionan el factor de retención y la concentración de micelas aplicables a compuestos apolares, polares e iónicos y utilizando surfactantes iónicos y no iónicos (*Armstrong D.W. y col., 1981; Arunyanart M. y col., 1984; Medina-Hernández M.J., y col., 1992; Jiménez O. y col., 1997*). A partir de estos modelos se

puede estimar el valor de la constante de asociación soluto micela (K_{AM}) y el del factor de retención correspondiente a una concentración de surfactante igual a la CMC, en ausencia de micelas (k_m). Por tanto, además del factor de retención, existen dos parámetros cromatográficos adicionales que se pueden utilizar para derivar las relaciones con $\log P$ (Khaledi M.G. y col., 1989).

- vi.- Las fases móviles micelares tienen menor efecto contaminante y menor coste que las fases hidroorgánicas.

En la bibliografía existen algunas referencias sobre aplicaciones de la MLC en la determinación de la hidrofobicidad de los compuestos. Así, se han obtenido para diferentes tipos de solutos relaciones lineales entre diferentes parámetros de retención obtenidos con una determinada fase móvil micelar (pura o en presencia de un modificador orgánico) y $\log P$. Los parámetros de retención en MLC utilizados con este propósito son:

- $\log k_m$ (Khaledi M.G. y col., 1989; Lavine B.K. y col., 1991; Medina-Hernández M.J. y col., 1995-b; Benito I. y col., 1998; Detroyer A. y col., 2001).
- $\log K_{AM}$ (Khaledi M.G. y col., 1989; Lavine B.K. y col., 1991; Medina-Hernández M.J. y col., 1995-b).
- $\log k$ (Gago F. y col., 1987; Lavine B.K. y col., 1991; González V. y col., 1992; García M.A. y col., 1994; Medina-Hernández M.J. y col., 1995-a; 1995-b; Marina M.L. y col., 1995; Rapado-Martínez I. y col., 1997; Benito I. y col., 1998; Gil-Agustí M. y col., 2000; Detroyer A. y col., 2001; 2003).
- k (Khaledi M.G. y col., 1987; 1989; García M.A. y col., 1994; Medina-Hernández M.J. y col., 1995-b; Benito I. y col., 1998).

En la Tabla I.5 se exponen los logros conseguidos en algunas de las publicaciones arriba mencionadas acerca de la estimación de la hidrofobicidad de los compuestos mediante MLC. En la bibliografía no existen discrepancias en cuanto a la naturaleza de las relaciones entre $\log k_m$ o $\log K_{AM}$ con $\log P$, en cambio sí existe cierta controversia acerca del uso directo del factor de retención k o bien su forma logarítmica $\log k$. Algunos autores (García M.A. y col., 1994; Medina-Hernández M.J. y col., 1995-b; Marina M.L. y col., 1995; Benito I. y col., 1998) tras un estudio amplio y exhaustivo de diferentes series de compuestos eluidos con diferentes fases móviles micelares, llegaron a la conclusión que la naturaleza de la relación $\log k - \log P$ no era lineal y que la obtención de relaciones lineales o no lineales dependía principalmente del intervalo de hidrofobicidad del conjunto de compuestos estudiado y también de las características de la fase móvil y la fase estacionaria utilizadas.

La curvatura observada en las relaciones $\log k$ vs. $\log P$ se ha atribuido a la heterogeneidad de los medios micelares, en los cuales los solutos pueden encontrar diversos entornos de diferente polaridad (Khaledi M.G. y col., 1987; 1989). Así pues, según la teoría del límite de solubilidad (Borgerding M.F. y col., 1988; Hinze W.L. y col., 1991), los compuestos con valores bajos de $\log P$ son muy solubles en agua y el reparto de los mismos entre el agua y la fase estacionaria determina su retención. En cambio, los compuestos muy hidrófobos son insolubles en agua y su retención viene determinada por su reparto o distribución entre las micelas y la fase estacionaria. En este equilibrio las dos fases son químicamente parecidas y la relación de reparto es próxima a la unidad e independiente de la hidrofobicidad. Por ello, la relación $\log k - \log P$ se curva para compuestos muy hidrófobos y explica la mejora observada en la relación $\log k - \log P$ tras la eliminación de los compuestos más hidrófobos (García M.A. y col., 1994).

Medina-Hernández y col. (Medina-Hernández y col., 1995-b) propusieron un modelo para la descripción de la curvatura en la relación $\log k - \log P$ (que se tratará con más detalle en el Capítulo IV) basada en un modelo de retención de los solutos con fases móviles micelares a pH constante (Armstrong D.W. y col., 1981; Arunyanart M. y col., 1984) y en las relaciones lineales observadas entre $\log k_m$ o $\log K_{AM}$ y $\log P$. Con dichos modelos, los autores explicaron los motivos por los que se han descrito diferentes tipos de relaciones $\log k - \log P$ y $k - \log P$ y consideraron dos situaciones extremas que estaban de acuerdo con las observaciones experimentales:

- Para solutos con baja hidrofobicidad o para concentraciones micelares muy bajas en la fase móvil, dicho modelo mostraba una relación lineal entre $\log k$ y $\log P$.
- Para solutos muy hidrófobos o para altas concentraciones micelares en fases móviles, el modelo mostraba una relación lineal entre $\log k$ y $\log P$, pero con menor pendiente que la de la situación anterior.

En cuanto a la influencia de la naturaleza del surfactante sobre las relaciones retención en MLC - $\log P$, cabe destacar que los utilizados de forma más amplia son el surfactante aniónico dodecilsulfato sódico (SDS, "sodium dodecyl sulphate") y los surfactantes catiónicos bromuro de cetiltrimetilamonio, (CTAB o C₁₆TAB, "cetyltrimetilammonium bromide") y bromuro de tetradeciltrimetilamonio (C₁₄TAB, "tetradecyltrimetilammonium bromide"). En las publicaciones en las que se han realizado estudios comparativos sobre que surfactante proporciona datos de retención que correlacionan mejor con $\log P$, los resultados han sido concluyentes ya que generalmente se han obtenido mejores valores de coeficientes de correlación con los surfactantes catiónicos CTAB o C₁₄TAB que con el surfactante aniónico SDS (Treiner C. y col., 1983; 1986; Gago F. y col., 1987; Khaledi M.G. y col., 1989; García M.A. y col., 1994). Khaledi y col. (Khaledi M.G. y col., 1989) justificaron los resultados sobre la base de que los sistemas micelares catiónicos poseen un balance hidrófilo / hidrófobo más próximo al sistema *n*-octanol / agua que el de los sistemas de

SDS, y/o que las interacciones polares entre los solutos y la cabeza catiónica del CTAB se asemejan a las del *n*-octanol. Todo ello es posiblemente debido a que los surfactantes catiónicos adsorbidos sobre la fase estacionaria producen un bloqueo mayor de los grupos silanol residuales.

Existen menos publicaciones en las que se ha utilizado el surfactante no iónico polioxietileno(23)lauril éter (Brij35). Sin embargo, los datos de retención obtenidos con este surfactante han proporcionado mejores correlaciones con la hidrofobicidad de los compuestos (Gago F. y col., 1987; Medina-Hernández M.J. y col., 1995-a, 1995-b; Beleña-Pozo I. y col., 1999). Así por ejemplo, Gago y col., (Gago F. y col., 1987) observaron que en las relaciones $\log k - \log P$ para una serie de 11 bencenos monosustituídos, el compuesto fenol, mostró un comportamiento anómalo en las fases móviles micelares de CTAB y SDS, y sólo mostró buenos resultados con las fases móviles de Brij35. Tras la eliminación de este compuesto del estudio, se obtuvieron buenos coeficientes de determinación en todos los casos, siendo ligeramente superiores los obtenidos con las fases móviles de CTAB. Beleña-Pozo y col. (Beleña-Pozo I. y col., 1999) realizaron un estudio para evaluar la influencia de la naturaleza del surfactante utilizando SDS, CTAB y Brij35 en la estimación de la hidrofobicidad de 19 compuestos aromáticos con diferente carácter aceptor/dador de puentes de hidrógeno. Los autores al realizar las representaciones $\log k$ vs. $\log P$ observaron un comportamiento de retención diferenciado para los compuestos con carácter dador o aceptor de puentes de hidrógeno eluidos con surfactantes iónicos. Sin embargo, con las fases móviles micelares de Brij35 se observó la existencia de una única relación $\log k - \log P$ para todos los compuestos, con independencia de su capacidad para participar en enlaces por puentes de hidrógeno. Estas observaciones concuerdan con las de Lavine y col. (Lavine B.K. y col., 1991), quienes en la representación $\log P$ vs. $\log k$ para 21 compuestos aromáticos mono-, di- y trisustituídos eluidos con fases móviles de SDS y CTAB obtuvieron dos rectas paralelas que clasificaban a los compuestos en dos grupos.

El uso de fases móviles micelares puras o híbridas no ha mostrado un efecto claro sobre los resultados obtenidos, aunque en términos generales, se ha observado que la adición de pequeñas cantidades de modificador orgánico mejora ligeramente los coeficientes de determinación de las relaciones $\log k$ vs. $\log P$ (Marina M.L. y col., 1995; Rapado-Martínez I. y col., 1997) y k vs. $\log P$ (Khaledi M.G. y col., 1989).

Tabla I.5.- Ejemplos de publicaciones en las que se establecen relaciones retención en MLC – hidrofobicidad.

Compuestos	Intervalo de $\log P$	Fase estacionaria	Fase móvil ^a	Modelo ^b	Observaciones	Referencia
11 Derivados del benceno monosustituidos	$0.64 \leq \log P \leq 2.99$	C ₁₈	SDS CTAB Brij35	$\log k = \Delta_0 + \Delta_1 \log P$ $0.944 \leq r^2 \leq 0.994$ (Valores obtenidos tras la eliminación del fenol)	El fenol mostró un comportamiento anómalo en las fases móviles micelares de CTAB y SDS y sólo mostró buenos resultados con las fases móviles de Brij35. Tras la eliminación de este compuesto del estudio, se obtuvieron buenos valores de r^2 en todos los casos, siendo ligeramente superiores los obtenidos con las fases móviles de CTAB	<i>Gago F. y col., 1987</i>
16 Compuestos aromáticos	$1.10 \leq \log P \leq 4.45$	C ₈ y C ₁₈	C ₁₄ TAB	$\log k = \Delta_0 + \Delta_1 \log P$ $0.771 \leq r^2 \leq 0.871$	- Estudio de las relaciones $\log k - \log P$ y $k - \log P$: Se observó una curvatura en la representación de $\log k$ vs. $\log P$ para compuestos muy hidrófobos ($\log P > 3$), obteniéndose mejores correlaciones lineales entre k y $\log P$ - Comparación de las fases móviles de C ₁₄ TAB y SDS: El uso de fases móviles de C ₁₄ TAB proporcionó correlaciones $k - \log P$ ligeramente mejores que las obtenidas con eluyentes de SDS	<i>Khaleel M.G. y col., 1989</i>
			C ₁₄ TAB/3% 1-PrOH SDS/3% 1-PrOH	$k = \Delta_0 + \Delta_1 \log P$ $0.939 \leq r^2 \leq 0.920$		
		C ₈	Micelares puras e híbridas de C ₁₄ TAB con diversos modificadores orgánicos	$k = \Delta_0 + \Delta_1 \log P$ híbridas: $0.934 \leq r^2 \leq 0.977$ puras: $r^2 = 0.940$	- Estudio de la influencia de la adición de modificadores orgánicos a fases móviles de C ₁₄ TAB: La adición de pequeñas proporciones de alcoholes de cadena corta proporcionaba similares o ligeramente mejores valores de r^2 que los obtenidos con fases móviles micelares puras	
		C ₈	C ₁₄ TAB/3% 1-PrOH	$k = \Delta_0 + \Delta_1 \log P$ $r^2 = 0.960$	- Comparación de las relaciones retención $-\log P$ con fases móviles hidroorgánicas y micelares híbridas de C ₁₄ TAB y diversas fases estacionarias: Se obtuvieron similares coeficientes de determinación en el caso de la columna C ₈ , pero grandes diferencias en los obtenidos con la columna difenilo	
		Difenilo	C ₁₄ TAB/3% 1-PrOH	$k = \Delta_0 + \Delta_1 \log P$ $r^2 = 0.958$		
		C ₈	40% MeOH/60% H ₂ O	$\log k = \Delta_0 + \Delta_1 \log P$ $r^2 = 0.964$		
Difenilo	40% MeOH/60% H ₂ O	$\log k = \Delta_0 + \Delta_1 \log P$ $r^2 = 0.427$				
35 Compuestos aromáticos no congéneres	$0.23 \leq \log P \leq 4.88$	Difenilo	C ₁₄ TAB/3% 1-PrOH	$k = \Delta_0 + \Delta_1 \log P$ $r^2 = 0.945$	Este último resultado se confirmó al ampliar el grupo de compuestos a 35 compuestos aromáticos no congéneres	
		Difenilo	40% MeOH/60% H ₂ O	$\log k = \Delta_0 + \Delta_1 \log P$ $r^2 = 0.605$		

(Continúa en la página siguiente)

Tabla I.5.- Continuación.

Compuestos	Intervalo de $\log P$	Fase estacionaria	Fase móvil ^a	Modelo ^b	Observaciones	Referencia
21 compuestos aromáticos mono-, di- y trisustituidos	$0.56 \leq \log P \leq 3.30$	C ₁₈	Hidroorgánica: MeOH/H ₂ O (50:50)	$\log P = b_0 + b_1 \log k$ $0.84 \leq r^2 \leq 0.98$ (Ajustes realizados para cada uno de los grupos)	<ul style="list-style-type: none"> - En todos los casos se obtuvieron dos rectas paralelas que clasificaban a los compuestos en dos grupos A (compuestos aromáticos monosustituidos) y B (fenoles), dentro de cada grupo se obtuvieron buenas correlaciones. - En el caso de las fases móviles de SDS, se observó una similitud en la clasificación de los compuestos a la obtenida con el eluyente hidroorgánico. Sin embargo, en caso del CTAB, se observó una inversión en la retención de los grupos - La representación $\log P$ vs. $\log K_{AM}$ proporcionó una única recta para todos los compuestos - En la representación $\log P$ vs. $\log k_m$ se mantuvieron las dos rectas independientes para cada grupo de compuestos. Los autores concluyeron que los grupos silanol libres en la fase estacionaria eran los responsables de la dicotomía en el comportamiento de retención de los compuestos observada en el gráfico $\log P$ vs. $\log k$ - El comportamiento separado para los dos grupos de compuestos se observó en las dos representaciones. - Los autores atribuyeron estas diferencias en la selectividad observada entre el CTAB y el SDS, a la disminución de las constantes de protonación de los fenoles en medio micelar de CTAB que podría hacer que estuvieran ionizados y hubiera interacciones electrostáticas de atracción soluto-micela y soluto-fase estacionaria responsables de la inversión de la retención de los grupos 	<i>Lavine B.K. y col., 1991</i>
			Micelares: SDS/1-PROH y CTAB			
			SDS/1-PROH	$\log P = b_0 + b_1 \log K_{AM}$ $r^2 = 0.96$ $\log P = b_0 + b_1 \log k_m$ (se mantuvieron los dos grupos)		
		CTAB	$\log P = b_0 + b_1 \log K_{AM}$ $\log P = b_0 + b_1 \log k_m$			
20 Aminoácidos derivatizados con el reactivo OPA-NAC		C ₁₈	Fases móviles micelares híbridas de SDS (pH 3)	$\log QH - x$	-En todos los casos se obtuvieron buenas correlaciones, aunque el derivado tirosina mostró valores de QH muy bajos en algunas fases móviles	<i>Medina-Hernández M.J. y col., 1995-a</i>
19 Aminoácidos derivatizados con el reactivo feniltiohidantoína		C ₁₈	SDS, CTAB y Brij35	$\log QH - x$	-En todos los casos se obtuvieron buenas correlaciones. La correlación observada en el caso del surfactante no iónico Brij35 fue la mejor	

(Continúa en la página siguiente)

Tabla I.5.- Continuación.

Compuestos	Intervalo de log P	Fase estacionaria	Fase móvil ^a	Modelo ^b	Observaciones	Referencia
23 compuestos orgánicos que incluían:	0.64 ≤ log P ≤ 5.03	C ₈	Fases móviles puras e híbridas de SDS y CTAB	$\log k = b_0 + b_1 \log P$ $0.8189 \leq r^2 \leq 0.9197$ $k = b_0 + b_1 \log P$ $0.8750 \leq r^2 \leq 0.9571$	Los resultados obtenidos mostraron la importancia del intervalo de valores de log P abarcado por los compuestos estudiados sobre las relaciones k o log k vs. log P. - Cuando se consideraban los 23 compuestos estudiados, k proporcionaba mejores correlaciones con log P que log k; en ambos casos los mejores resultados se observaban para las concentraciones más bajas de modificador orgánico en la fase móvil	García M.A. y col., 1994
8 PAHs ^c	3.48 ≤ log P ≤ 5.03					
15 Derivados del benceno y naftaleno	0.64 ≤ log P ≤ 3.37			$\log k = b_0 + b_1 \log P$ $0.7795 \leq r^2 \leq 0.9237$ $k = b_0 + b_1 \log P$ $0.5770 \leq r^2 \leq 0.9757$	- Para el grupo de los 10 bencenos monosustituidos o los 15 derivados del benceno y naftaleno, la correlación de k o log k con log P era similar e incluso log k proporcionaba en ocasiones mejores correlaciones, especialmente para las fases móviles de SDS. Para estas series de compuestos la adición de pequeñas cantidades de modificadores orgánicos en general proporcionaba mejores coeficientes de determinación, a excepción de los bencenos monosustituidos con fases móviles de SDS.	
10 de ellos eran bencenos monosustituidos	0.64 ≤ log P ≤ 2.84			$\log k = b_0 + b_1 \log P$ $0.7795 \leq r^2 \leq 0.9237$ $k = b_0 + b_1 \log P$ $0.8802 \leq r^2 \leq 0.9642$		
6 Series de compuestos neutros	I: 2.13 ≤ log P ≤ 4.60 II: 1.10 ≤ log P ≤ 3.58 III y IV: 1.10 ≤ log P ≤ 2.99 V y VI: 1.10 ≤ log P ≤ 4.45	C ₈ y C ₁₈	fases móviles micelares puras e híbridas de SDS, CTAB y Brij35	$\log k = b_0 + b_1 \log P$ $0.853 \leq r^2 \leq 0.974$ $k = b_0 + b_1 \log P$ $0.910 \leq r^2 \leq 0.982$ $\log k_m = b_0 + b_1 \log P$ $0.965 \leq r^2 \leq 0.987$ $k_m = b_0 + b_1 \log P$ $0.578 \leq r^2 \leq 0.834$ $\log K_{AM} = b_0 + b_1 \log P$ $0.733 \leq r^2 \leq 0.975$ $K_{AM} = b_0 + b_1 \log P$ $0.515 \leq r^2 \leq 0.841$	Los autores realizaron las siguientes observaciones: 1.- k en general proporcionaba mejores correlaciones lineales que log k y las relaciones log k - log P presentan una naturaleza no lineal, aunque se podían diferenciar dos situaciones: -Para las series de compuestos más hidrófilos y/o eluidos con fases móviles a concentraciones micelares más bajas existía una relación log k - log P de tipo lineal. - Para las series que incluían compuestos más hidrófobos y/o eluidos con concentraciones micelares más elevadas la relación log k - log P se curvaba. 2.- Las relaciones log k _m - log P o log K _{AM} - log P presentaban una naturaleza lineal 3.- log k _m era el mejor parámetro para predecir la hidrofobicidad de un soluto cuando se utilizan fases móviles micelares 4.- El surfactante no iónico Brij35 proporcionó los valores más altos para los parámetros estadísticos estudiados en la mayoría de relaciones estudiadas	Medina-Hernández M.J. y col., 1995-b

(Continúa en la página siguiente)

Tabla I.5.- Continuación.

Compuestos	Intervalo de $\log P$	Fase estacionaria	Fase móvil ^a	Modelo ^b	Observaciones	Referencia
19 Compuestos aromáticos no ionizados con diferente carácter aceptor/dador de puentes de hidrógeno	$0.07 \leq \log P \leq 4.88$	C ₁₈	SDS, CTAB y Brij35: - pH 7.4 (compuestos neutros) - pH 3.5 (ácidos)	$\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 (\log P)^2$ $0.93 \leq r^2 \leq 0.95$ (Para las fases móviles de Brij35)	En las representaciones $\log k$ vs. $\log P$, se observó: - La existencia de la curvatura anteriormente descrita para altos valores de $\log P$. - Un comportamiento de retención diferenciado de acuerdo con el carácter dador o aceptor de puentes de hidrógeno de los compuestos eluidos con surfactantes iónicos. - Con las fases móviles micelares de Brij35 se observó la existencia de una única relación $\log k - \log P$ para todos los compuestos con independencia de su capacidad para participar en enlaces por puentes de hidrógeno	Beleña-Pozo I. y col., 1999
12 Antihistamínicos	$2.02 \leq \log P \leq 4.92$	C ₁₈	SDS/1-pentanol (pH 7, para garantizar que todos los compuestos presentan un grado de ionización similar) MeOH / H ₂ O (pH 7)	$\log k = b_0 + b_1 \log P$ $r = 0.968$ $k = b_0 + b_1 \log P$ $r = 0.954$ $\log k = b_0 + b_1 \log P$ $r = 0.963$ $k = b_0 + b_1 \log P$ $r = 0.935$	Los coeficientes de correlación de las relaciones $\log k - \log P$ eran ligeramente superiores a los de las relaciones $k - \log P$ tanto para las fases móviles micelares como para las fases móviles hidroorgánicas	Gil-Agustí M. y col., 2000

^a Surfactantes utilizados para la preparación de las fases móviles micelares:

SDS: siglas en inglés de "sodium dodecyl sulphate", dodecilsulfato sódico (surfactante aniónico).

CTAB (o C₁₆TAB): siglas en inglés de "cetyltrimethylammonium bromide", bromuro de cetiltrimetilamonio (surfactante catiónico).

Brij35: polioxietileno(23)lauril éter (surfactante no iónico).

C₁₄TAB: del inglés "tetradecyltrimethylammonium bromide", bromuro de tetradeciltrimetilamonio (surfactante catiónico).

^b Parámetros estadísticos y variables utilizadas en los modelos:

b_i : coeficientes de ajuste.

r : coeficiente de correlación.

r^2 : coeficiente de determinación.

k_m : factor de retención correspondiente a una fase móvil con una concentración de surfactante igual a la CMC, es decir, en ausencia de micelas.

K_{AM} : constante de asociación soluto-micela.

QH : siglas en inglés de "quantitation of hydrophobicity" índice de cuantificación de hidrofobicidad. Cociente entre el factor de retención de cada uno de los derivados de aminoácidos y el factor de retención del derivado de la glicina para una fase móvil dada.

π : constante hidrófoba de los sustituyentes de Hansch relativa al derivado del aminoácido glicina.

^c PAHs: siglas en inglés de "polycyclic aromatic hydrocarbons", hidrocarburos aromáticos policíclicos.

I.4.4.- Cromatografía electrocinética (EKC)

La cromatografía (capilar) electrocinética (ECC o EKC, siglas en inglés de "*electrokinetic (capillary) chromatography*") es una modalidad de electroforesis capilar en la que se añade al tampón electroforético una serie de aditivos retentivos de los analitos que actúan como una pseudofase estacionaria. La separación de los solutos en EKC se basa en su diferente movilidad electroforética bajo la acción de un campo eléctrico y en su distribución o reparto diferencial entre la fase acuosa y la pseudofase estacionaria. En EKC se han utilizado una gran variedad de aditivos tales como disoluciones micelares (puras e híbridas), ciclodextrinas, polímeros, proteínas, microemulsiones, vesículas y liposomas. Si estos aditivos son iónicos permiten la separación tanto de solutos ionizados como de solutos neutros (Figura I.2).

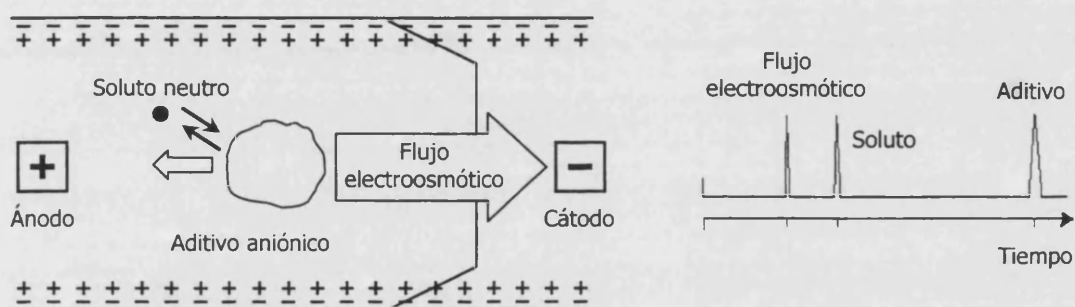


Figura I.2.- Esquema del principio de separación en EKC de un soluto neutro con un aditivo aniónico y electroferograma resultante.

La EKC es una alternativa interesante a la cromatografía líquida para la estimación de la hidrofobicidad de compuestos mediante modelos QSRR. Los modelos QSRR derivados a partir de parámetros de retención o migración obtenidos mediante electroforesis capilar, también aparecen en la bibliografía con el nombre relaciones cuantitativas estructura-migración (QSMR, siglas inglesas de "*quantitative structure-migration relationships*"). Entre las ventajas del uso de la EKC frente a RP-HPLC cabe destacar:

- i.- La rapidez del análisis.
- ii.- Las altas eficacias de los picos obtenidos con electroforesis.
- iii.- Menor consumo de muestra y de reactivos.
- iv.- La ausencia de una fase estacionaria sólida en el sistema que proporciona por un lado una mayor versatilidad a la técnica y por otro elimina los problemas asociados a la misma como la inestabilidad de las fases estacionarias alquil-silano a valores extremos de pH y el error asociado a la variabilidad existente entre columnas.

En los últimos años, muchos investigadores han publicado buenas correlaciones entre diferentes parámetros de retención o migración obtenidos en EKC con diferentes pseudofases estacionarias y $\log P$. Sin embargo, para la estimación de la hidrofobicidad de compuestos ionizables con EKC, el desarrollo electroforético tiene que realizarse a valores de pH en el que los compuestos no estén ionizados con el fin de evitar una migración electroforética adicional y las interacciones electrostáticas con los componentes del sistema de separación. También es posible corregir el factor de retención, para contrarrestar estos efectos, a partir de la medida independiente de su movilidad electroforética en electroforesis capilar zonal sólo con el tampón (*Poole S.K. y col., 2003-a*). Se han observado pocos problemas en la estimación de la hidrofobicidad de compuestos neutros o bases débiles con técnicas cromatográficas electrocinéticas, porque al pH de trabajo requerido para estos compuestos ($\sim 7 - 12$) no existen problemas con el flujo electroosmótico. El mayor inconveniente reside en los ácidos débiles, ya que a valores de pH bajos los grupos silanol de la superficie de los capilares de sílice no están ionizados y el flujo electroosmótico es excesivamente bajo para una medida satisfactoria de los factores de retención. En la actualidad para subsanar este inconveniente se añaden una serie de aditivos a los tampones electroforéticos (p. ej., moléculas orgánicas pequeñas y polímeros neutros o iónicos) para recubrir dinámicamente los capilares de sílice (*Poole S.K. y col., 2003-b*).

A continuación se comentan los resultados más relevantes obtenidos con las diferentes modalidades de EKC.

I.4.4.1.- Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)

En 1984, Terabe y col. (*Terabe S. y col., 1984*) introdujeron la cromatografía electrocinética micelar (MEKC, siglas en inglés de "*micellar electrokinetic chromatography*"), una modalidad de electroforesis capilar en la que se añade al tampón electroforético una disolución micelar que actúa como pseudofase estacionaria.

En los últimos años, han aparecido en la bibliografía correlaciones muy buenas entre los parámetros de retención o migración obtenidos en MEKC (p. ej., $\log k$, $\log P_{mw}$) y $\log P$. Con este propósito se han utilizado una gran variedad de surfactantes, así el SDS fue uno de los primeros surfactantes utilizados para la estimación de $\log P$ y hoy en día se sigue utilizando de forma amplia (*Takeda S. y col., 1993; Chen N. y col., 1994; Herbert B.J. y col., 1995; Smith J.T. y col., 1995; García M.A. y col., 1996; Benito I. y col., 1997; Dinelli G. y col., 1997; Rosés M. y col., 1999; Kelly K.A. y col., 2001*). También se han utilizado micelas mixtas formadas por mezclas de varios surfactantes (*Ishihama Y. y col., 1994; Yang S.Y., y col., 1996; Rosés M. y col., 1999*) y sales biliares (*Adlard M. y col., 1995; Yang S.Y., y col., 1996; Hanna M. y col., 1998; Wu Y.S. y col., 1998*).

No obstante, con algunos surfactantes y casos particulares de compuestos se han observado malas correlaciones. Así, Herbert y col. (*Herbert B.J. y col., 1995*) para un grupo de compuestos no relacionados estructuralmente y el surfactante SDS, sólo observaron buenas correlaciones para un grupo de 59 compuestos neutros ($r^2 = 0.958$) y no obtuvieron buenos resultados al incluir una serie de analitos ionizados. Yang y col. (*Yang S.Y. y col., 1996*), estudiaron la influencia del tipo de surfactante utilizado sobre la estimación de la hidrofobicidad de 60 compuestos aromáticos y 9 corticoesteroides. Los sistemas micelares ensayados fueron SDS, C₁₄TAB, la sal biliar colato sódico (SC) y perfluorooctano sulfonato de litio (LiPFOS, acrónimo en inglés de "lithium perfluorooctane sulfonate") y micelas mixtas de los surfactantes aniónicos. Sólo se obtuvieron buenas correlaciones $\log k - \log P$ cuando se utilizó el surfactante SC, en cambio, con el sistema micelar de LiPFOS se obtuvieron muy malos resultados y con SDS y C₁₄TAB se encontraron relaciones lineales diferentes para los compuestos en función de su carácter dador/aceptor de puentes de hidrógeno.

I.4.4.2.- Cromatografía electrocinética con microemulsiones (MEEKC)

Las microemulsiones (Figura I.3) son mezclas estables y transparentes generalmente constituidas por un surfactante, un cosurfactante (p. ej., un alcohol de cadena media) una fase polar y una fase apolar.

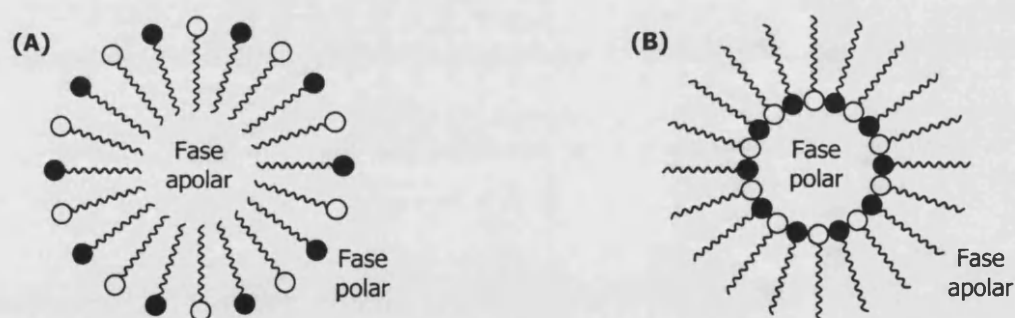


Figura I.3.- Ilustración de una microemulsión de: **(A)** una fase apolar en una fase polar y **(B)** una fase polar en una fase polar. (○~~~~) Surfactante, (●~~~~) cosurfactante.

Watarai (*Watarai H., 1991*) introdujo el uso de microemulsiones como pseudofases estacionarias en electroforesis capilar para la separación de analitos cargados y no cargados, originando la denominada cromatografía electrocinética con microemulsiones (MEEKC, siglas en inglés de "*microemulsion electrokinetic chromatography*"). Posteriormente, Ishihama y col. (*Ishihama Y. y col., 1995*) introdujeron el uso de MEEKC para la estimación de la hidrofobicidad de compuestos; utilizaron microemulsiones preparadas con SDS, *n*-butanol, *n*-heptano y tampón borato (pH = 7) para la estimación de los valores $\log P$ de 53 compuestos neutros y bases débiles ($r = 0.996$). Klotz y col. (*Klotz W.L. y col., 2001*) utilizando microemulsiones de composición similar a las utilizadas por Ishihama y col., pero con una concentración mayor de SDS, observaron excelentes correlaciones $\log k - \log P$ ($r^2 = 0.968$) para un grupo de 119 plaguicidas neutros y básicos.

Con el fin de subsanar los problemas asociados al flujo electroosmótico a valores de pH bajos, Poole y col. utilizaron un capilar dinámicamente recubierto de ácido sulfónico (*Poole S.K. y col., 2000*) para la estimación de la hidrofobicidad de compuestos neutros y ácidos débiles y posteriormente (*Poole S.K. y col., 2003-b*) un capilar recubierto con una bicapa de poli(vinilsulfonato) adsorbido sobre un polímero catiónico (polibreno). Los autores observaron una buena correlación entre los valores de $\log k$ obtenidos con microemulsiones de SDS + *n*-butanol + *n*-heptano + tampón fosfato (pH = 3; T = 30 °C) y los valores de $\log P$.

Recientemente, el grupo de investigación dirigido por Kit-Sum Wong ha utilizado "MEEKC multiplexo" (MMEEKC, siglas en inglés de "*multiplexed microemulsion electrokinetic chromatography*") como una técnica de alto rendimiento o producción ("*high-throughput*") para la estimación de la hidrofobicidad de compuestos. Estos autores utilizaron un equipo de electroforesis capilar con un soporte para una fila de 96 capilares de sílice fundida en paralelo y una placa de 96 pocillos para las disoluciones de los solutos. En un primer trabajo (*Wehmeyer K.R. y col., 2003*), utilizando microemulsiones de SDS + 1-butanol + *n*-heptano + tampón 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfonato (pH 10.4) establecieron una relación $\log k - \log P$ ($r^2 = 0.9628$) con un conjunto de calibración de 17 compuestos neutros y bases débiles y predijeron la hidrofobicidad de 42 compuestos a partir de sus valores de $\log k$ en MMEEKC. La desviación media de los valores de $\log P$ predichos de los experimentales fue 0.23 (0.80 en el peor de los casos). En un trabajo posterior (*Wong K.S. y col., 2004*) se optimizó la composición de la microemulsión anteriormente ensayada, se utilizaron 6 compuestos en el conjunto de calibración ($r^2 = 0.9821$) y 52 en el conjunto de predicción (desviación media ± 0.5).

I.4.4.3.- Cromatografía electrocinética con vesículas (VEKC) y con liposomas (LEKC)

Las vesículas son agregados formados por una o varias bicapas continuas de monómeros de compuestos con propiedades anfifílicas que encierran en el centro una región acuosa. Las vesículas están presentes en la naturaleza y se forman por agregación de los lípidos dando lugar a los liposomas (Figura I.4), pero también pueden prepararse de forma sintética a partir de fosfolípidos, de surfactantes con dos cadenas hidrocarbonadas o bien a partir de una mezcla de dos surfactantes de cadena sencilla y carga opuesta (Nasal A. y col., 2003; Poole S.K. y col., 2003-a).

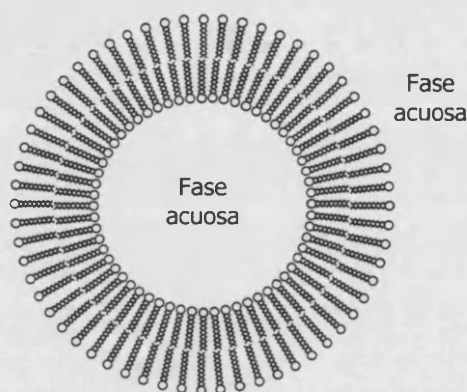


Figura I.4.- Ilustración de una vesícula de lípidos unilamellar o liposoma unilamellar.

Los liposomas y otras vesículas se han adicionado a los tampones electroforéticos utilizados en electroforesis capilar, a estas técnicas se les ha denominado cromatografía electrocinética con liposomas (LEKC, siglas de "*liposome electrokinetic chromatography*") y cromatografía electrocinética con vesículas (VEKC, siglas de "*vesicle electrokinetic chromatography*"), respectivamente.

Hong y col. (Hong M. y col., 1998) prepararon vesículas a partir del surfactante aniónico SDS y el surfactante catiónico bromuro de *n*-dodeciltrimetilamonio (DTAB, siglas de "*n*-docecyltrimethylammonium bromide") y observaron una buena correlación ($r^2 = 0.9823$) entre los valores de $\log k$ de 20 derivados del benceno neutros ($0.18 \leq \log P \leq 4.44$) obtenidos mediante este sistema VEKC y sus correspondientes valores de $\log P$.

Agbodjan y col. (Agbodjan A.A. y col., 2001) realizaron un estudio comparativo de las relaciones $\log k - \log P$ derivadas para 41 compuestos neutros ($0.5 \leq \log P \leq 5.5$) con diferentes pseudofases estacionarias en EKC. Los sistemas electroforéticos examinados fueron micelas de los surfactantes aniónicos SDS y mono-*n*-dodecil fosfato sódico (SDP, siglas de "sodium mono-*n*-dodecyl phosphate") y vesículas sintéticas preparadas a partir del surfactante aniónico de doble cadena hidrocarbonada dihexadecil hidrógenofosfato (DHP, "dihexadecyl hydrogen phosphate") en ausencia y en presencia de colesterol. En los cuatro sistemas estudiados se observaron buenas correlaciones $\log k - \log P$, aunque los coeficientes de determinación fueron ligeramente mayores en el caso de las vesículas ($r^2 = 0.90$, en el caso de las micelas de SDS; $r^2 = 0.93$, con micelas de SDP; $r^2 = 0.98$, con vesículas DHP y $r^2 = 0.99$ con vesículas DHP-colesterol). Para investigar las similitudes y diferencias entre el reparto de los solutos en las diferentes pseudofases estudiadas y en sistema *n*-octanol/agua construyeron modelos LSERs para cada uno de los sistemas y compararon los coeficientes de ajuste obtenidos con los correspondientes de $\log P$. Los autores concluyeron que en todos los casos los coeficientes de ajuste eran muy similares a los obtenidos con $\log P$ y los derivados para los sistemas con vesículas eran los más cercanos lo que explicaba los valores más altos de r^2 observados.

Klotz y col. (Klotz W.L. y col., 2002) prepararon vesículas sintéticas a partir de dos surfactantes de carga opuesta, el surfactante catiónico CTAB y el surfactante aniónico octil sulfato sódico (SOS, siglas de "sodium octyl sulfate") y a partir del surfactante aniónico de doble cadena hidrocarbonada bis(2-etilhexil)sulfosuccinato sódico (AOT). Los autores encontraron muy buenas correlaciones ($0.957 \leq r^2 \leq 0.968$) entre los valores de $\log k$ determinados en los dos sistemas electroforéticos de vesículas y los valores de $\log P$ para unos 100 compuestos neutros o no ionizados no relacionados estructuralmente ($0.5 \leq \log P \leq 5.5$).

Burns y col. (Burns S.T. y col., 2002) investigaron la utilidad los valores de las relaciones de reparto liposoma/agua ($\log K_{lw}$) medidos en LEKC para la estimación de la hidrofobicidad de compuestos neutros. Los liposomas se prepararon sintéticamente a partir de los lípidos dipalmitoil-L- α -fosfatidilcolina (DPPC, "dipalmitoyl-L- α -phosphatidylcholine"), dipalmitoil-L- α -fosfatidilglicerol (DPPG, "dipalmitoyl-L- α -phosphatidylglycerol") y colesterol. Los autores obtuvieron una buena correlación $\log K_{lw} - \log P$ ($r^2 = 0.96$) para un conjunto de 55 compuestos aromáticos neutros.

I.5.- Relaciones (cuantitativas) retención-actividad ((Q)RAR)

Hasta este punto de la introducción, se ha considerado la relación de reparto *n*-octanol/agua como el parámetro de referencia para la cuantificación de la hidrofobicidad y como parámetro utilizado por excelencia en estudios QSAR, ya que la hidrofobicidad de los xenobióticos es una de las propiedades responsables de su difusión pasiva a través de las membranas biológicas, de su interacción con un receptor específico y con otras biomacromoléculas, tal y como se ha comentado en el apartado I.2. Sin embargo, en la bibliografía no siempre se han encontrado buenas correlaciones actividad biológica – log*P*, lo que cuestiona la capacidad de este parámetro o del sistema *n*-octanol/agua para describir procesos de reparto complejos como los que tienen lugar en las biomembranas y que puede justificarse considerando los siguientes aspectos. Por un lado, hay que tener en cuenta que las propiedades de un sistema bifásico formado por dos disolventes inmiscibles son uniformes a lo largo de cada una de las fases, mientras que las membranas biológicas tienen propiedades anisotrópicas, lo que provoca diferencias en el reparto de los solutos en ambos sistemas (Dill K.A. y col., 1981; 1988; Marqusee J.A. y col., 1986; De Young L.R. y col., 1988; 1990; Dorsey J.G. y col., 1993; Hsieh M.M. y col., 1995). Por otro lado, aunque las interacciones hidrófobas de los xenobióticos en los sistemas biológicos son normalmente las que determinan su actividad biológica, también existen otras interacciones de tipo electrónico y estérico que no siempre pueden despreciarse y que están ausentes en el sistema *n*-octanol/agua. En este sentido, se ha considerado que otros sistemas de reparto, diferentes al *n*-octanol/agua, pueden proporcionar modelos mejores de las actividades biológicas de los xenobióticos (Kaliszan R., 1999-b).

Desde este punto de vista y combinando la filosofía de los estudios QSAR y QSRR, los parámetros cromatográficos obtenidos bajo unas condiciones experimentales adecuadas se han utilizado como variables de predicción de las actividades biológicas de los xenobióticos, originando el área denominada relaciones cuantitativas retención-actividad (QRAR, siglas inglesas de "*quantitative retention-activity relationships*"). En los estudios QRAR se obtienen relaciones del tipo de la ecuación I.22 en su forma más sencilla o bien la ecuación I.23 en su forma más general:

$$\text{Actividad biológica} = b_0 + b_1 \log k \quad (\text{I.22})$$

$$\text{Actividad biológica} = f(\text{parámetros de retención}) \quad (\text{I.23})$$

Los modelos QRAR se basan en el hecho de que la mayoría de procesos biológicos tienen mucho en común con los procesos que tienen lugar en algunas separaciones cromatográficas. En primer lugar, ambos son procesos dinámicos. Por otro lado, salvo los procesos metabólicos, no conllevan la ruptura o formación de nuevos enlaces. Finalmente, las propiedades hidrófobas, electrónicas y estéricas de los xenobióticos son las que determinan su actividad biológica y también pueden determinar su retención cromatográfica. Por consiguiente, es razonable esperar que existan

relaciones entre la retención cromatográfica y las propiedades farmacológicas de los compuestos (Kaliszan R. 1999-b).

En las primeras publicaciones de modelos QRAR se realizaban estudios comparativos sobre que parámetro $\log P$ o $\log k$ (o $\log k_w$), obtenido con RP-HPLC con fases móviles hidroorgánicas convencionales, era un mejor descriptor de las actividades biológicas de los xenobióticos; sin embargo, los resultados no han sido concluyentes. Así, diversos trabajos defienden el uso del parámetro de retención $\log k_w$ (Braumann T. y col., 1983; Hsieh M.M. y col., 1995), en otros casos es $\log k$ el parámetro de retención propuesto como alternativa ventajosa frente a $\log P$ (Mailhot H., 1987; Hodson J. y col., 1988) y en otros estudios se ha concluido que $\log P$, $\log k$ o $\log k_w$ proporcionan resultados estadísticamente equivalentes (Minick D.J. y col., 1988; Rittich B. y col., 1990; 1992).

En otros trabajos se han utilizado los factores de retención obtenidos con RP-HPLC convencional para la construcción de modelos QRAR, como por ejemplo, para la evaluación de la actividad biológica de glicósidos y hormonas esteroides (Davydov V.Y. y col., 1988), la actividad inhibitoria de la fosfodiesterasa de xantinas 8-sustituidas (Walther B. y col., 1989), el factor de bioconcentración en peces "*Poecilia reticulata*" de hidrocarburos heteroaromáticos neutros (De Voogt P. y col., 1991), la unión a albúmina de suero de cobayas e inhibición de la fosfodiesterasa de una serie de xantinas (Hasegawa T. y col., 1991) y la actividad antituberculosa de una serie de dipiridilsulfidas (Klimeš J. y col., 1992).

No obstante, es lógico pensar que si un parámetro de retención obtenido en un determinado sistema cromatográfico se utiliza para modelar un determinado fenómeno biológico, es un prerrequisito la existencia en dicho sistema cromatográfico bien de componentes similares a los del sistema biológico, o bien de componentes que emulen o presenten interacciones moleculares con los solutos similares a las responsables de dicho fenómeno biológico (Nasal A. y col., 2003). En este sentido, para la obtención de modelos QRAR se han desarrollado nuevas fases estacionarias que emulan a las biomembranas o a las interacciones xenobiótico-biomembrana, como las membranas artificiales inmovilizadas (cromatografía IAM), biomembranas inmovilizadas (IBC) y nuevas aplicaciones de la cromatografía líquida micelar (MLC) que se comentan a continuación.

I.5.1.- Membranas artificiales inmovilizadas (IAM)

Pidgeon y Venkataram (*Pidgeon C. y col., 1989*) introdujeron las membranas artificiales inmovilizadas (IAM, siglas en inglés de "*immobilized artificial membranes*") como fases estacionarias. Las columnas IAM se preparan por enlace covalente de distintos tipos de fosfolípidos a las partículas de sílice (usualmente aminopropilsílice), formándose de este modo monocapas que mimetizan el entorno lipídico de las membranas celulares. Las columnas IAM contienen bien un único fosfolípido o bien una mezcla de fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina (PC, siglas en inglés de "*phosphatidylcholine*"), fosfatidiletanolamina (PE, siglas de "*phosphatidylethanolamine*"), fosfatidilglicerol (PG, siglas de "*phosphatidylglycerol*"), ácido fosfátidico (PA, siglas de "*phosphatidic acid*") y fosfatidilserina (PS, siglas en inglés de "*phosphatidylserine*") (*Pidgeon C. y col., 1994*). Aunque las membranas biológicas contienen diversos tipos de fosfolípidos, PC es el mayor constituyente. De este modo, la mayoría de columnas IAM se han preparado a partir del fosfolípido PC (IAM.PC) o de sus derivados que pueden ser un éster de doble cadena ($^{\text{ester}}\text{IAM.PC}^{\text{C}_{10}/\text{C}_3}$, también denominada IAM.PC.DD2), un éter de cadena sencilla ($^{\text{ether}}\text{IAM.PC}^{\text{C}_{10}/\text{C}_3}$) o PC sin el grupo glicerol ($^{\text{G}}\text{IAM.PC}^{\text{C}_{10}/\text{C}_3}$, también denominada IAM.PC.DD), los superíndices C10/C3 hacen referencia a los grupos acilo C₁₀ y C₃ utilizados usualmente para el bloqueo los grupos amino residuales (*Stewart B.H. y col., 1998-a; Geetha T. y col., 2000; Taillardat-Bertschinger A. y col., 2003*). En la Figura I.5 se representan alguna de estas fases estacionarias IAM. Sólo se comercializan tres de ellas (IAM.PC.DD, IAM.PC.DD2 e $^{\text{ester}}\text{IAM.PC.MG}$, en esta última columna el "*endcapping*" se realiza con metilglicolato, MG) por la compañía Regis Technologies.

Las fases móviles utilizadas usualmente con columnas IAM son disoluciones acuosas de tampón fosfato salino ajustadas al pH fisiológico de interés (p. ej., pH 7.4). En estos casos, el parámetro cromatográfico utilizado para la construcción de modelos QSRR o QRAR es el logaritmo del factor de retención ($\log k_{\text{IAM}}$). Sin embargo, para la elución de compuestos muy hidrófobos es necesaria la adición de pequeñas cantidades de modificador orgánico (usualmente metanol o acetonitrilo) a la fase móvil. En tales casos, la variable utilizada en los estudios QSRR y QRAR es el logaritmo del factor de retención extrapolado a una fase móvil acuosa ($\log k_{\text{wIAM}}$) que se obtiene de forma análoga a RP-HPLC convencional.



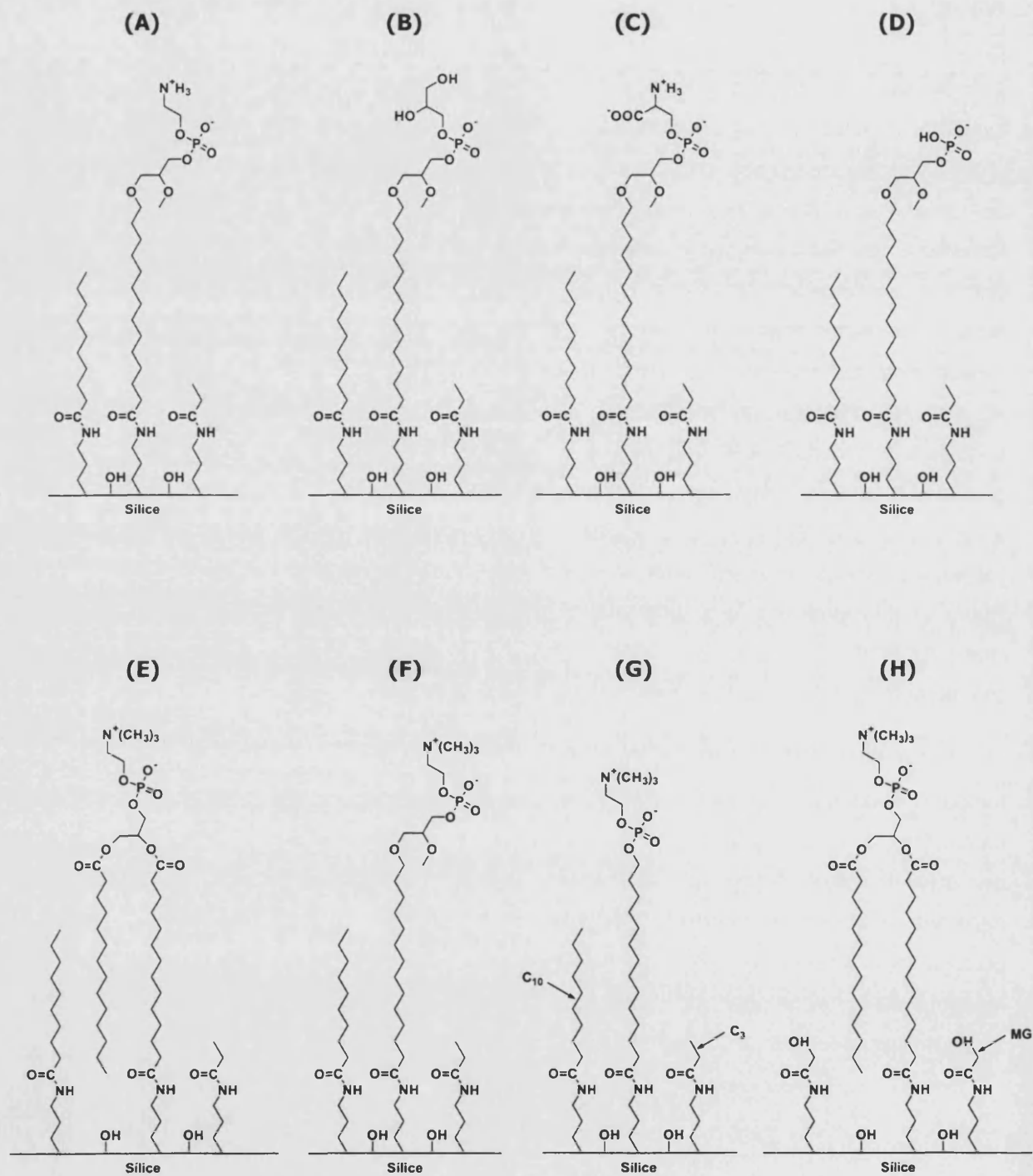


Figura I.5.- Ilustración de columnas IAM: (A) IAM.PE^{C10/C3}, (B) IAM.PG^{C10/C3}, (C) IAM.PS^{C10/C3}, (D) IAM.PA^{C10/C3}, (E) ester^{IAM.PC^{C10/C3}}, (F) ether^{IAM.PC^{C10/C3}}, (G) δ^{IAM.PC^{C10/C3}} y (H) ester^{IAM.PC.MG}.

Se han publicado numerosos trabajos en los que se relacionan los parámetros de retención $\log k_{IAM}$ o $\log k_{wIAM}$ con $\log P$ o $\log D$ (Stewart B.H. y col., 1998-a; Geetha T. y col., 2000; Kaliszan R. y col., 2003; Nasal A. y col., 2003; Taillardat-Bertschinger A. y col., 2003). Sin embargo, puesto que las columnas IAM mimetizan a las membranas celulares, uno de sus mayores atractivos reside en la obtención de modelos QRAR. De este modo, la cromatografía con columnas IAM se ha utilizado como una técnica "in vitro" para la descripción y predicción del transporte de xenobióticos a través de diversas membranas biológicas y la predicción de las actividades farmacológicas de fármacos.

Durante la pasada década se han investigado con especial énfasis las relaciones entre diversos parámetros relacionados con fenómenos de transporte de xenobióticos a través de distintas barreras biológicas y sus datos de retención obtenidos con columnas IAM. Así, las columnas IAM han mostrado una gran potencialidad para la evaluación de la absorción oral de xenobióticos (Pidgeon C. y col., 1995; Stewart B.H. y col., 1998-b; Genty M. y col., 2001). También se ha examinado la capacidad de los factores de retención obtenidos en IAM para la descripción y predicción del paso de xenobióticos a través de la barrera hematoencefálica (Salminen T. y col., 1997; Reichel A. y col., 1998; Ducarme A. y col., 1998) y la permeabilidad de xenobióticos a través de la piel humana (Nasal A. y col., 1995; Turowski M. y col., 1997; 1998; Barbato F. y col., 1998). En la Tabla I.6 se muestran algunos resultados obtenidos para la evaluación del transporte de xenobióticos a través de diversas barreras biológicas utilizando columnas IAM.

A continuación se comentan otras publicaciones en las que se han utilizado los parámetros $\log k_{IAM}$ o $\log k_{wIAM}$ para la evaluación de propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de xenobióticos. Kaliszan y col. (Kaliszan R. y col., 1994) observaron que $\log k_{IAM}$ proporcionaba mejores correlaciones con varios parámetros farmacocinéticos de fármacos β -adrenérgicos que $\log P$ o $\log k$ medido en una columna C_{18} . Barbato y col. observaron buenas correlaciones entre la concentración inhibitoria mediana (pIC_{50}) de la ciclooxigenasa-2 de antiinflamatorios no esteroideos (Barbato F. y col., 1997-a) o las dosis media para el bloqueo de los canales del sodio de anestésicos locales (Barbato F. y col., 1997-b) y $\log k_{wIAM}$. Caldwell y col. (Caldwell G.W. y col., 1998) utilizaron los valores de $\log k_{IAM}$ obtenidos con columnas $^{ester}IAM.PC.MG$ y $^{ester}IAM.PC^{C10/C3}$ para la construcción de modelos QRAR de varios parámetros farmacocinéticos de 8 β -bloqueantes, observándose mejores coeficientes de correlación en la mayoría de modelos QRAR derivados con la columna $^{ester}IAM.PC.MG$. Pehourq y col. (Pehourq F. y col., 2003) encontraron relaciones de tipo parabólico entre los valores de varios parámetros farmacocinéticos de antiinflamatorios no esteroideos y sus valores de $\log k_{wIAM}$ obtenidos con una columna IAM.PC.MG y fases móviles de tampón fosfato (pH = 7.4)/acetonitrilo. Los coeficientes de correlación de los modelos IAM-QRAR fueron similares o ligeramente superiores a los obtenidos en los modelos QSAR basados en $\log D$ (a pH 7.4) y muy superiores a los modelos QRAR derivados con los valores de $\log k_w$ obtenidos con RP-HPLC con una columna C_{18} y fases móviles de tampón fosfato (pH = 7.4)/metanol.

Tabla I.6.- Ejemplos de modelos QRAR desarrollados con los datos de retención obtenidos con columnas IAM.

Xenobióticos	Actividad biológica	Fase estacionaria	Fase móvil	Modelo ^a	Referencia
Tracto gastrointestinal					
11 Cefalosporinas	Porcentaje de absorción oral en ratones, % <i>A</i>	ether ₁ IAM.PC ^{C10/C3}	PBS ^b 0.01 M (pH 7.4) y PBS ^b 0.01 M (pH 7.4) + acetonitrilo ^c	$\log(\% A) = 0.284 \log k_{wIAM} + 1.033$ $r = 0.941$	<i>Pidgeon C. y col., 1995</i>
		C ₁₈	PBS ^b 0.01 M (pH 7.4) y PBS ^b 0.01 M (pH 7.4) + acetonitrilo ^c	$\log(\% A) = 0.218 \log k_w + 0.515$ $r = 0.890$	
11 Fármacos no congéneres	Coficiente de permeabilidad a través de las líneas celulares Caco-2, P_m (cm s ⁻¹)	ether ₁ IAM.PC ^{C10/C3}	PBS ^b 0.01 M (pH 7.4)	$\log P_m = 1.131 \log k_{IAM} - 0.131$ $r = 0.762$ La correlación mejoró tras corregir los valores de k_{IAM} con el peso molecular de los compuestos ($\log(k_{IAM}/M)$): $\log P_m = 1.272 \log(k_{IAM}/M) - 0.131$ $r = 0.854$	
12 Xenobióticos no congéneres	Porcentaje de absorción en el Intestino delgado de ratas, % <i>A</i>	ether ₁ IAM.PC ^{C10/C3}	PBS ^b 0.01 M (pH 5.4)	$\log(\% A) = 0.378 \log k_{IAM} + 1.553$ $r = 0.791$ La correlación mejoró con la variable $\log(k_{IAM}/M)$: $\log(\% A) = 0.365 \log(k_{IAM}/M) + 2.338$ $r = 0.858$	
		C ₁₈	PBS ^b 0.01 M (pH 5.4)	$\log(\% A) = 0.054 \log k + 1.626$ $r = 0.10$ Tampoco se obtuvo una buena correlación con la variable $\log(k/M)$: $\log(\% A) = 0.147 \log(k/M) + 1.836$ $r = 0.270$	
Barrera hematoencefálica					
26 Fármacos no congéneres	Relación de distribución cerebro/sangre, <i>BB</i>	IAM.PC.DD	PBS ^b 0.01 M (pH 7.4)	$\log BB = 0.62 \log k_{IAM} + 1.00 I_2 - 0.01 V_m + 1.18$ $n = 26; r^2 = 0.582; F = 10.2; s_{y/x} = 0.56$ Fue necesaria la inclusión de variables relacionadas con la ionización ($I_2 = 1$ para compuestos con el grupo amino, $I_2 = 0$ para el resto de compuestos) y el tamaño de las moléculas (V_m , volumen molar) Tras la eliminación de 5 compuestos anómalos: $\log BB = 0.58 \log k_{IAM} + 0.89 I_2 - 0.01 V_m + 1.28$ $n = 21; r^2 = 0.848; F = 31.5; s_{y/x} = 0.27$	<i>Salminen T. y col., 1997</i>
		-	Modelo QSAR	$\log BB = 0.32 \log P + 0.96 I_3 - 0.01 V_m + 1.06$ $n = 26; r^2 = 0.705; F = 17.5; s_{y/x} = 0.47$ $I_3 = 1$ para compuestos con el grupo amino, $I_3 = -1$ para ácidos carboxílicos, $I_3 = 0$ para el resto Tras la eliminación de 3 compuestos anómalos: $\log BB = 0.35 \log P + 0.99 I_3 - 0.01 V_m + 1.25$ $n = 23; r^2 = 0.848; F = 35.2; s_{y/x} = 0.32$ El modelo QSAR proporcionó estadísticos equivalentes al modelo QRAR pero con la ventaja de que se observaron menos compuestos anómalos	

(Continúa en la página siguiente)

Tabla I.6.- Continuación.

Xenobióticos	Actividad biológica	Fase estacionaria	Fase móvil	Modelo ^a	Referencia
Piel					
17 Xenobióticos no congéneres	Coeficiente de permeabilidad cutánea, K_p (cm s ⁻¹)	ester ¹ IAM.PC.MG	Tampón fosfato 0.1 M (pH = 6) / 5% acetónitrilo (v/v)	$\log K_p = (-6.42 \pm 0.14) + (1.46 \pm 0.14) \log K_{IAM}$ $n = 17; r = 0.899; s_{y/x} = 0.47; p < 0.0001$	<i>Turowski M. y col., 1997</i>
		Columnas de sílice con queratina Inmovilizada ^d	Tampón fosfato 0.05 M (pH = 4.20) / 5% <i>i</i> -propanol (v/v)	$\log K_p = (-6.56 \pm 0.13) + (1.9 \pm 0.2) \log K_{IAM} + (-1.0 \pm 0.4) \log K_{keratin}$ $n = 17; r = 0.932; s_{y/x} = 0.40; p < 0.0001$ Los valores de $\log K_{IAM}$ son los obtenidos con la fase estacionaria y fase móvil anteriores	
17 Xenobióticos no congéneres	Coeficiente de permeabilidad cutánea, K_p (cm s ⁻¹)	Columnas de sílice con colágeno Inmovilizado ^e	Tampón fosfato 0.05 M (pH = 4.20) / 5% <i>i</i> -propanol (v/v)	El objetivo de este trabajo era incorporar los datos de retención ($\log K_{collagen}$) de los 17 xenobióticos en el modelo QRAR anterior y mejorar la predicción de la permeabilidad cutánea. Sin embargo, la inclusión de la variable $\log K_{collagen}$ en la ecuación no fue estadísticamente significativa	<i>Turowski M. y col., 1998</i>

^a Variables y parámetros estadísticos:

$\log K_{keratin}$: logaritmo del factor de retención obtenido en una columna con queratina Inmovilizada.

$\log K_{collagen}$: logaritmo del factor de retención obtenido en una columna con colágeno Inmovilizado.

n : número de compuestos incluidos en el modelo.

r : coeficiente de correlación.

r^2 : coeficiente de determinación.

$s_{y/x}$: desviación estándar de los residuos de y .

F : cociente entre la varianza modelada y la residual.

p : probabilidad. Medida del nivel de significación estadística del modelo.

^b PBS: siglas en Inglés de "phosphate buffer saline"; tampón fosfato salino.

^c Para los compuestos más retenidos, se obtuvieron los valores de $\log K_{IAM}$ en cuatro fases móviles con diferentes concentraciones de acetónitrilo y se calcularon los valores de $\log K_{IAM}$ por extrapolación.

^d La queratina es una proteína presente en grandes cantidades en las capas más externas de la epidermis (estrato córneo).

^e El colágeno es una proteína presente en la epidermis y dermis.

También se han preparado fases estacionarias en las que se han inmovilizado otros lípidos. Así por ejemplo, se han inmovilizado ceramidas (Yin J.M. y col., 1998), lípidos mayoritarios del estrato córneo, para la evaluación de la permeabilidad cutánea, colesterol, componente importante de las biomembranas, aunque su aplicabilidad para la evaluación del transporte de xenobióticos a través de las membranas biológicas no mostró buenos resultados (Al-Haj M.A. y col., 1998).

El trabajo con columnas IAM comerciales es sencillo desde el punto de vista experimental, es posible trabajar con elución por gradiente (Valkó K. y col., 2000; 2004) y además existen columnas ^{ester}IAM.PC^{C10/C3} de 1 cm de longitud disponibles comercialmente ("*IAM fast-screen mini columns*"; Regis Technologies). Todas estas características convierten a la cromatografía con columnas IAM en una herramienta muy valiosa y con capacidad de alto rendimiento para la evaluación rápida de las propiedades farmacológicas de nuevos xenobióticos en las fases iniciales de su desarrollo. Los inconvenientes de cromatografía con columnas IAM son el elevado precio, la falta de estabilidad de las columnas y la necesidad de utilizar fases móviles hidroorgánicas.

I.5.2.- Cromatografía con biomembranas inmovilizadas (IBC)

En cromatografía con biomembranas inmovilizadas (IBC, siglas de "*immobilised biomembrane chromatography*") se utilizan fases estacionarias constituidas por diferentes tipos de biomembranas inmovilizadas hidrófoba, estérica, electrostática o covalentemente en geles. Estas biomembranas pueden ser glóbulos rojos, vesículas de biomembranas que carecen de citoesqueleto y proteínas periféricas, liposomas preparados a partir de uno o varios fosfolípidos naturales o proteoliposomas preparados a partir de liposomas y proteínas integrales (Lundahl P. y col., 1999). La preparación de las columnas es bastante sencilla, sin embargo, algunas de ellas sólo son estables durante unos pocos días.

Algunas de estas fases estacionarias pueden utilizarse para la medida de la afinidad de los analitos por las proteínas presentes en las biomembranas, en este caso la técnica recibe el nombre de cromatografía de afinidad con biomembranas inmovilizadas (IBAC, siglas de "*immobilised biomembrane affinity chromatography*") (Gottschalk I. y col., 2002). También se pueden utilizar para la medida del reparto o distribución de los solutos en la biomembrana, en tal caso la técnica se denomina cromatografía de reparto con biomembranas inmovilizadas (IBiPaC, "*immobilised biomembrane partitioning chromatography*") (Beigi F. y col., 1998). En la primera aplicación de IBiPaC se prepararon columnas con liposomas inmovilizados por lo que la técnica se denominó inicialmente cromatografía con liposomas inmovilizados (ILC, "*immobilised liposome chromatography*") (Beigi F. y col., 1995), la posterior inmovilización de otros tipos de biomembranas condujo al nombre más general de IBiPaC.

Beigi y col. (*Beigi y col., 1998*) compararon el comportamiento de retención de 17 xenobióticos en columnas en las que se inmovilizaron liposomas de fosfolípidos de huevo (EPL, "*egg phospholipid liposomes*") con la retención en columnas con liposomas de fosfatidilcolina de huevo, liposomas de lípidos de membrana (ML, "*membrane liposomes*"), vesículas de biomembranas y glóbulos rojos. Los autores observaron la existencia de correlaciones lineales en todos los casos aunque con diferentes pendientes y ordenadas en el origen lo que ponía de manifiesto las diferentes interacciones presentes en cada sistema de biomembranas. Por otro lado, al comparar la retención de los compuestos en la columna de liposomas PC y en una columna IAM.PC.DD se observó la existencia de una correlación lineal moderada ($r^2 = 0.83$) a pesar de estar preparadas ambas columnas con el mismo fosfolípido. Los autores atribuyeron este hecho a que la estructura de los lípidos es de gran importancia en el reparto de los xenobióticos.

Aunque no existen muchas referencias bibliográficas, los parámetros de retención obtenidos con IBiPaC han mostrado ser muy útiles en el desarrollo de modelos QRAR para la predicción del transporte de xenobióticos. Una ventaja de IBiPaC frente a la cromatografía IAM, es que las fases móviles están compuestas por disoluciones acuosas de un tampón (usualmente tampón fosfato a pH 7.4) y no requieren la adición de modificadores orgánicos para la elución de los compuestos más hidrófobos (*Beigi F. y col., 1995*). Además, la composición de los liposomas, vesículas y proteoliposomas se puede controlar para conseguir un porcentaje de fosfolípidos, colesterol y proteínas (en su caso) muy similar al de las biomembranas.

Beigi y col. (*Beigi F. y col., 1995*) prepararon columnas preparadas por inmovilización estérica de liposomas de fosfatidilcolina de huevo en un gel de agarosa-dextrano (Superdex 200) y obtuvieron una relación cualitativa de tipo hiperbólico entre el porcentaje de absorción oral en humanos 12 fármacos no congéneres y el logaritmo de los factores de capacidad específicos ($\log K_s$) medidos en IBiPaC. Liu y col. (*Liu X.Y. y col., 2002*) observaron una relación similar entre el porcentaje de absorción oral en humanos y el logaritmo de las relaciones de reparto liposoma/agua ($\log K_M$) obtenidas con liposomas preparados con los lípidos PC, PS, PE y colesterol para un conjunto de 29 compuestos no relacionados estructuralmente.

I.5.3.- Cromatografía líquida micelar (MLC)

Las micelas se han utilizado como modelos simples de biomembranas debido a sus propiedades anfífilas y carácter anisotrópico. Breyer y col. (*Breyer E.D. y col., 1991*) publicaron la primera aplicación exitosa de la MLC en la construcción de modelos QRAR que ofrecía mejores resultados que RP-HPLC convencional. Los autores observaron altas correlaciones entre la bioactividad (medida como $\log(1/C)$, donde C es la concentración que inhibe en un 50% el crecimiento de un cultivo de "*Tetrahymena pyriformis*") de 26 fenoles para-sustituidos y sus

factores de retención obtenidos con fases móviles micelares puras e híbridas de CTAB (pH = 7) y columnas C₁₈ y difenilo. Por otro lado, los modelos QRAR $\log(1/C)$ - $\log k$ obtenidos con RP-HPLC convencional mostraron coeficientes de determinación muy bajos y para la obtención de modelos QSAR con coeficientes de determinación similares a los obtenidos en los modelos MLC-QRAR se necesitaron tres descriptores moleculares.

Medina-Hernández y col. (*Medina-Hernández M.J. y col., 1993*) mostraron la existencia de una relación cualitativa entre la retención de diuréticos con fases móviles micelares de SDS y su lugar de acción en la nefrona, concluyendo que el sistema cromatográfico podría mimetizar dicho órgano. Tanaka y col. (*Tanaka A. y col., 1994*) encontraron para un conjunto de 18 imidazoles una relación de tipo polinómico entre el logaritmo de la actividad anticoagulante en ratas y el logaritmo de la relaciones de reparto o distribución micela/agua ($\log P_{mw}$) medidos en MLC con fases móviles micelares de Brij35 y una columna C₈. Sanchis-Mallols y col. (*Sanchis-Mallols J.M. y col., 1997*) mostraron la existencia de relaciones entre la actividad α - y β -adrenérgica de catecolaminas y su retención en MLC con fases móviles puras e híbridas de SDS y una columna C₁₈. Detroyer y col. (*Detroyer A. y col., 2001*) observaron la existencia de relaciones lineales entre los coeficientes de permeabilidad de 6 β -bloqueantes a través de las líneas celulares Caco-2 y de segmentos intestinales de ratas y sus factores de retención (expresados como k o $\log k$, indistintamente) en MLC obtenidos con fases móviles micelares híbridas de SDS a pH 3 y una columna C₁₈. Los autores compararon estos modelos MLC-QRAR con los correspondientes modelos $\log P$ -QSAR e IAM-QRAR y concluyeron que los datos de retención en MLC proporcionaban mejores coeficientes de correlación para los compuestos estudiados.

I.5.3.1.- Cromatografía micelar de bio-reparto (CMB)

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el uso de fases móviles micelares de Brij35 y columnas C₁₈ convencionales de fase inversa, en las condiciones experimentales adecuadas, proporciona un entorno que permite reproducir el ambiente que encuentra un xenobiótico cuando se administra a un organismo vivo. A esta metodología, que es una modalidad de trabajo en MLC, la hemos denominado cromatografía micelar de bio-reparto (CMB).

Los datos de retención obtenidos en CMB han mostrado ser muy útiles en la construcción de modelos QRAR para la descripción y/o predicción de diversos parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de diversas familias de fármacos, parámetros farmacocinéticos y permeabilidad a través de diversas membranas celulares de un amplio conjunto de xenobióticos pertenecientes a diversos grupos terapéuticos y diferentes familias químicas, así como para la evaluación de la ecotoxicidad de contaminantes orgánicos. En las Tablas I.7 y I.8 se muestran a modo de ejemplo algunos de los modelos QRAR obtenidos con CMB y sus estadísticos de ajuste y validación.

El éxito de la CMB en la construcción de modelos QRAR podría atribuirse al hecho de que las interacciones hidrófobas, electrónicas y estéricas que determinan el reparto biológico son las que determinan el reparto en CMB debido a una serie de similitudes de los sistemas CMB con las barreras biológicas y los fluidos intra- y extracelulares, tal y como se observa en la Figura I.6:

- El Brij35 ($C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_{23}OH$) es un surfactante no iónico (las membranas celulares son zwitteriónicas con carga neta cero) y presenta carácter dador/aceptor de puentes de hidrógeno. El uso de surfactantes de tipo iónico podría hacer que las interacciones electrostáticas de solutos cargados en el sistema cromatográfico predominaran sobre las de tipo hidrófobo. Este efecto no es deseado para el desarrollo de modelos QRAR, ya que como se ha reiterado a lo largo de esta introducción, la hidrofobicidad de los xenobióticos es una de las fuerzas responsables de su difusión pasiva a través de las membranas biológicas y de su interacción con un receptor específico y otras biomacromoléculas. La presencia de Brij35 en el sistema garantiza que las interacciones hidrófobas soluto-fase estacionaria y soluto-micela jueguen un papel importante en la retención de los compuestos.
- La fase estacionaria C_{18} modificada por la adsorción hidrófoba de monómeros de Brij35 se parece estructuralmente a la fila ordenada de fosfolípidos de las bicapas lipídicas. Además, el carácter hidrófilo/hidrófobo de los monómeros de Brij35 adsorbidos se parece a las regiones polares/apolares de las membranas.
- Las fases móviles micelares constituidas por disoluciones acuosas salinas de micelas en equilibrio con los monómeros de surfactante y preparadas en condiciones que reproducen la fuerza iónica y pH de los fluidos biológicos se asemejan a los mismos, compuestos básicamente por agua, sales, glucosa, aminoácidos, proteínas y lípidos. Los lípidos son moléculas anfílicas que pueden formar agregados micelares o bien se forman complejos micelares con las proteínas (lipoproteínas) ($CMC < 10^{-6} M$) (Voet D. y Voet J., 1992).

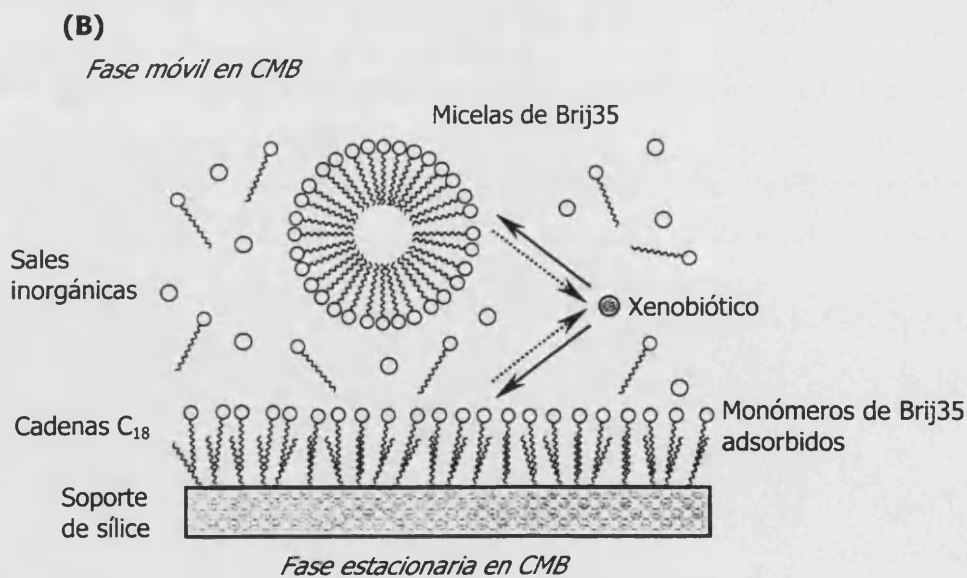
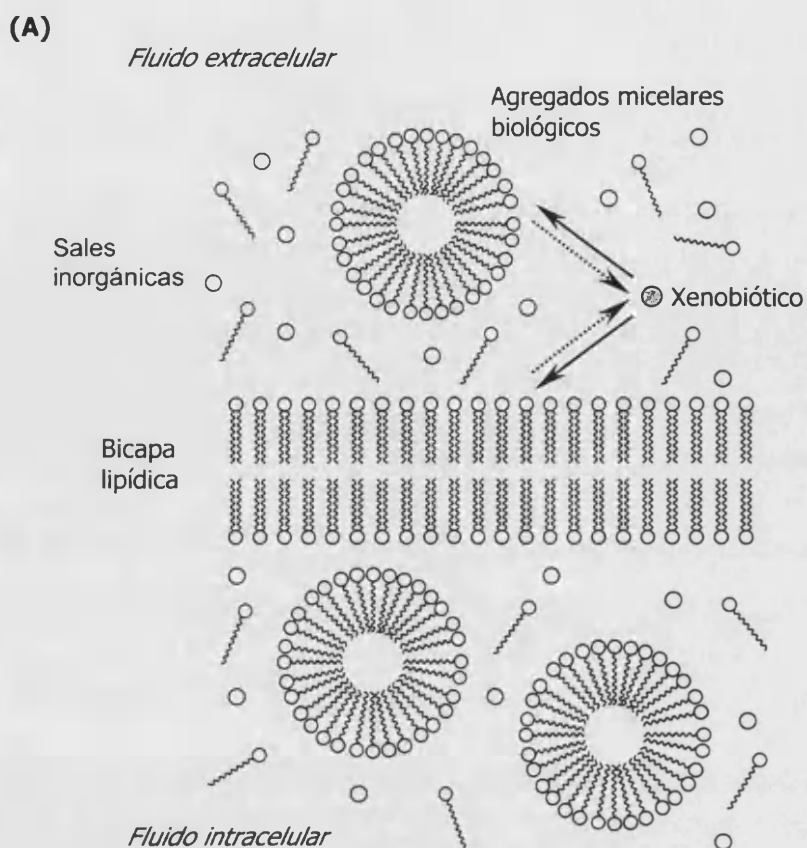


Figura I.6.- Comparación de las interfases **(A)** membrana biológica-fluido celular y **(B)** fase estacionaria-fase móvil en CMB.

Tabla I.7.- Ejemplos de algunos modelos QRAR obtenidos con CMB para la descripción y predicción de parámetros farmacodinámicos.

Actividad ^a	[Brij35] (M) ^b	Modelo ^c	n ^d	b ₀ ± ts ₉₀ ^e	b ₁ ± ts ₉₁ ^e	b ₂ ± ts ₉₂ ^e	r ² ^f	s _{y/x} ^g	F ^h	RMSEC ⁱ	RMSECV ^j	RMSECV ^k	Referencia
Antidepresivos tricíclicos	0.04												<i>Quiñones-Torrel C.</i>
IC ₅₀ (receptor NA), en ratas, (10 ⁻⁸ M)		1	6	-50 ± 30	60 ± 30	-20 ± 10	0.97	3.3	49.1	0.09	0.22	0.31	<i>y col., 1999</i>
IC ₅₀ (receptor 5-HT), en ratas, (10 ⁻⁸ M)		1	6	-40 ± 60	50 ± 70	-15 ± 20	0.89	2.2	12.5	0.20	0.46	0.30	
Benzodiazepinas	0.02	1											<i>Molero-Monfort M.</i>
ED ₅₀ , oral en ratones, (mg kg ⁻¹)			7	-13 ± 9	19 ± 11	-6 ± 3	0.98	0.04	86.2	0.03	0.10	0.04	<i>y col., 1999</i>
Fenotiazinas	0.06	1											<i>Martín-Biosca Y.</i>
IC ₅₀ (³ H-haloperidol) en ratas, (nM)			8	-30 ± 10	40 ± 12	-11 ± 3	0.93	0.15	40.8	0.12	0.16	0.17	<i>y col., 1999</i>
IC ₅₀ (receptor D ₁) en ratas, (μM)			8	-50 ± 20	50 ± 20	-14 ± 6	0.90	0.16	22.9	0.13	0.28	0.18	
Potencia relativa a clorpromazina			10	-48 ± 11	60 ± 13	-18 ± 4	0.94	0.13	60.0	0.11	0.17	0.16	
Duración, s.c. en perros, (h)			9	-19 ± 10	24 ± 12	-7 ± 4	0.84	0.12	15.2	0.09	0.15	0.17	
ED ₅₀ (AP), s.c. en perros, (mg kg ⁻¹)			9	-50 ± 20	60 ± 20	-18 ± 7	0.88	0.29	21.7	0.24	0.32	0.31	
ED ₅₀ (AM), s.c. en ratas, (mg kg ⁻¹)			10	-34 ± 10	46 ± 13	-12 ± 4	0.90	0.17	60.1	0.14	0.18	0.20	
ED ₅₀ (AP), s.c. en ratas, (mg kg ⁻¹)			10	-70 ± 20	80 ± 20	-23 ± 7	0.89	0.32	29.8	0.27	0.38	0.38	
ED ₅₀ (JB), s.c. en ratas, (mg kg ⁻¹)			9	-40 ± 20	50 ± 30	-14 ± 6	0.84	0.26	15.8	0.21	0.33	0.36	
ED ₅₀ (JB), s.c. en perros, (mg kg ⁻¹)			9	-25 ± 15	30 ± 20	-8 ± 5	0.80	0.23	12.1	0.19	0.30	0.24	
ED ₅₀ (NE), s.c. en ratas, (mg kg ⁻¹)			9	20 ± 11	-25 ± 14	8 ± 4	0.90	0.18	26.7	0.15	0.21	0.20	
ED ₅₀ (CA), s.c. en ratas, (mg kg ⁻¹)			9	-40 ± 20	40 ± 20	-12 ± 7	0.98	0.26	11.1	0.21	0.34	0.30	
Barbitúricos	0.06	1											<i>Martín-Biosca Y.</i>
(1/C) en conejos, (kg mol ⁻¹)			10	3.0 ± 0.2	-	0.6 ± 0.2	0.85	0.12	47.1	0.10	0.12	0.13	<i>y col., 2000-b</i>
Duración de la acción, en humanos (h)			9	2.1 ± 0.5	-2.7 ± 1.2	1.1 ± 0.7	0.95	0.05	55.0	0.04	0.19	0.06	
Inicio de la acción, en humanos (h)			8	1.0 ± 0.4	-3.5 ± 1.1	1.9 ± 0.6	0.94	0.04	38.5	0.03	0.08	0.05	
Dosis hipnótica, en humanos (g)			9	0.3 ± 0.3	-2.0 ± 0.8	0.9 ± 0.4	0.94	0.03	49.8	0.02	0.07	0.03	
EC ₅₀ -LRR, en humanos (μM)			6	-3.0 ± 1.4	12 ± 4	-6 ± 2	0.98	0.11	77.7	-	-	-	
IC ₅₀ (¹⁴ C-amobarbital), (μM)			7	-4.3 ± 1.3	15 ± 3	-7 ± 2	0.98	0.13	103	0.10	0.36	0.15	

(Continúa en la página siguiente)

Tabla I.7.- Continuación.

Actividad ^a	[Brij35] (M) ^b	Modelo ^c	n ^d	b ₀ ± ts _{b0} ^e	b ₁ ± ts _{b1} ^e	b ₂ ± ts _{b2} ^e	r ² ^f	s _{y/x} ^g	F ^h	RMSEC ⁱ	RMSECV ^j	RMSECVI ^k	Referencia
Butirofenonas	0.06	2											<i>Martín-Biosca Y.</i>
IC ₅₀ (³ H-espiperona) en ratas, (nM)			9	1000 ± 200	-1200 ± 300	340 ± 80	0.96	10.2	64.8	8.35	21.14	11.97	<i>y col., 2001</i>
IC ₅₀ (³ H-haloperidol) en terneros, (nM)			11	380 ± 90	-430 ± 110	120 ± 30	0.93	4.8	49.5	4.09	12.18	4.96	
Dosis efectiva mínima, s.c. en ratas, (mg kg ⁻¹)			8	4.8 ± 1.0	-5.7 ± 1.3	1.7 ± 0.4	0.98	0.04	103	0.031	0.124	0.043	
Dosis efectiva mínima, s.c. en perros, (mg kg ⁻¹)			8	1.2 ± 0.3	-1.4 ± 0.4	0.4 ± 0.1	0.97	0.01	78.6	0.009	0.021	0.013	
ED ₅₀ (NE/AM)			8	1300 ± 1100	-2100 ± 1400	800 ± 400	0.93	42	33.5	33.3	111.4	45.3	
ED ₅₀ (PP/CA)			9	50 ± 50	-80 ± 70	40 ± 20	0.96	2.6	67.9	2.11	2.74	2.98	
Antiepilépticos	0.06	2											<i>Martínez-Pla J.J.</i>
Concentración terapéutica, en humanos, (mg L ⁻¹)			13	80 ± 20	-120 ± 40	40 ± 20	0.88	5.2	35.8	4.54	13.51	5.04	<i>y col., 2001</i>
Concentración tóxica, en humanos, (mg L ⁻¹)			10	270 ± 40	-440 ± 90	180 ± 50	0.98	7.9	145	6.62	22.89	8.42	
Concentración comatosa, en humanos, (mg L ⁻¹)			9	420 ± 140	-600 ± 300	300 ± 200	0.90	27	27.3	22.3	87.17	28.75	
Psicótrópos	0.02	2											<i>Quiñones-Torrel C.</i>
LD ₅₀ , oral en ratones (mg kg ⁻¹)			53	20000 ± 3000	-18000 ± 3000	4000 ± 800	0.83	230	121	223	236	239	<i>y col., 2001</i>
LD ₅₀ , oral en ratas (mg kg ⁻¹)			32	21000 ± 5000	-19000 ± 5000	4000 ± 1000	0.81	280	63	262	315	257	
Analgésicos opioides	0.02												<i>Quiñones-Torrel C.</i>
Concentración terapéutica, en humanos, (ng mL ⁻¹)		2	10	400 ± 300	-600 ± 400	280 ± 140	0.91	45.0	35.0	37.67	63.52	54.17	<i>y col., 2002-a</i>
LD ₅₀ , s.c. en ratones, (mg kg ⁻¹)		1	11	1.0 ± 0.7	2.5 ± 1.1	-1.0 ± 0.4	0.86	0.1	25.0	0.13	0.17	0.16	
IC ₅₀ (receptor μ), en ratas (nM)		1	8	19 ± 6	-29 ± 11	11 ± 5	0.91	0.6	24.4	0.48	0.84	0.74	
IC ₅₀ ("Tetrahymena pyriformis"), (mM)		2	7	150 ± 60	-160 ± 90	40 ± 30	0.94	6.7	30.3	5.03	16.08	7.24	

^a IC₅₀: concentración de fármaco necesaria; para producir una inhibición del 50% del receptor de la noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), de la actividad del enzima adenilato ciclasa (receptor D₁) y del receptor μ opiáceo; para producir el desplazamiento del 50% de un receptor dado del ³H-haloperidol, ¹⁴C-amobarbital, ³H-espiperona; y para inhibir la motilidad del 50% de un cultivo de "Tetrahymena pyriformis". ED₅₀: Dosis que produce un determinado efecto en un 50% de una población. Efectos: antagonismo de la apomorfina (AP), de la anfetamina (AM) y de la norepinefrina (NE), catalepsia (CA), anestesia general medida por pérdida de reflejos (LRR), ptosis palpebral (caída de los párpados) (PP). Ensayo "jumping box" (JB). LD₅₀: dosis letal mediana, dosis requerida para causar la muerte a un 50% de una población. C: dosis hipnótica mínima efectiva. s.c.: administración subcutánea.

^b Fases móviles ajustadas al pH plasmático 7.4.

^c Modelo: (1) log(actividad) = b₀ + b₁ logK + b₂ (logK)²; (2) actividad = b₀ + b₁ logK + b₂ (logK)².

^d n: número de compuestos incluidos en el modelo. ^e b₁ ± ts_{b1}: coeficientes de ajuste del modelo con su intervalo de confianza para un nivel de confianza del 95%. ^f r²: coeficiente de determinación. ^g s_{y/x}: desviación estándar de los residuos de y. ^h F: cociente entre la varianza modelada y la residual. ⁱ RMSEC: siglas en inglés de "root-mean-square error of calibration". Raíz cuadrada del error al cuadrado medio en calibración. ^j RMSECV: del inglés "root-mean-square error in cross-validation". Raíz cuadrada del error al cuadrado medio en validación cruzada. Técnica de validación cruzada empleada "leave-one-out cross-validation". ^k RMSECVI: del inglés "root-mean-square error in cross-validation for interpolated data". Raíz cuadrada del error al cuadrado medio en validación cruzada para las predicciones obtenidas para datos interpolados. Técnica de validación cruzada empleada "leave-one-out cross-validation". Más información acerca de los parámetros estadísticos en Capítulo III (Experimental y metodología general).

Tabla I.8.- Modelos QRAR generales obtenidos con CMB para la estimación del paso de xenobióticos a través de diversas barreras biológicas.

Barrera biológica	Actividad	pH de la fase móvil ^a	Modelo ^b	Referencia
Tracto gastrointestinal	Porcentaje de absorción oral en humanos, %A	6.5 (pH medio del intestino delgado)	$\%A = \frac{K_{CMB}}{(0.7 \pm 0.2) + (1.02 \pm 0.03)K_{CMB}} \times 100$ $n = 74; r^2 = 0.72; F = 3185; s_{yx} = 9.8; p < 0.0001$	Molero-Manfort M. y col., 2001
Piel	Coefficiente de permeabilidad cutánea en humanos, K_p (cm h ⁻¹)	5.5 (pH de la piel)	$\log K_p = (-3.3 \pm 0.3) + (1.3 \pm 0.2) \log k_{CMB} - (0.0080 \pm 0.014) MP$ $n = 42; r^2 = 0.83; F = 93; s_{yx} = 0.51; p < 0.0001$ $RMSEC = 0.498; RMSECV = 0.537$	Martínez-Pla J.J. y col., 2003
Tejido ocular (córnea)	Coefficiente de permeabilidad, P_m (cm s ⁻¹)	7.4; 7.60; 7.65; 7.7	$\log P_m = (-4.4 \pm 0.3) + (0.83 \pm 0.15) \log k_{CMB} - (0.0044 \pm 0.012) M$ $n = 38; r^2 = 0.80; F = 69; s_{yx} = 0.28; p < 0.0001$ $RMSEC = 0.271; RMSECV = 0.285$	Martín-Biosca Y. y col., 2003
Barrera hematoencefálica	Relación de distribución cerebro/sangre, BB	7.4 (pH plasmático)	$\log BB = (-0.84 \pm 0.12) + (0.76 \pm 0.08) \log k_{CMB} - (0.26 \pm 0.11) \alpha$ $n = 42; r^2 = 0.75; F = 60; s_{yx} = 0.39; p < 0.0001$ $RMSEC = 0.379; RMSECV = 0.421$	Escuder-Gilabert L. y col., 2004-a

^a Brij35 0.04 M en todos los casos.

^b Variables y parámetros estadísticos (Véase Tabla I.7):

p : probabilidad. Medida del nivel de significación estadística del modelo ($p < 0.05$, para un nivel de confianza del 95%).

El parámetro $RMSECV$ se obtuvo mediante "Venetian-blinds cross-validation". Véase el Capítulo III (Experimental y metodología general) para mayor información.

k_{CMB} : factor de retención obtenido en CMB.

MP : punto de fusión (°C).

M : peso molecular.

α : carga molar total.

Además de los ejemplos de los modelos QRAR de propiedades farmacodinámicas mostradas en la Tabla I.7, se han obtenido modelos QRAR de tipo parabólico para la predicción de diversos parámetros farmacocinéticos. Martínez-Pla y col. (*Martínez-Pla y col., 2001; Quiñones-Torrel C. y col., 2002-b*) mostraron que se podían obtener modelos generales de tipo cualitativo (RAR) que incluían a los compuestos de diferentes familias farmacológicas. Así, el porcentaje de unión a las proteínas plasmáticas ($n = 53$), porcentaje de eliminación renal (de fármaco inalterado) ($n = 49$) y volumen de distribución (V_d , L kg⁻¹) ($n = 43$) mostraban un comportamiento de tipo hiperbólico con los factores de retención obtenidos en CMB con fases móviles de Brij35 0.04M a pH 7.4 expresados como k_{CMB} o $\log k_{\text{CMB}}$ en el caso de V_d . Aunque no se obtuvieron relaciones cuantitativas, debido en gran parte a la gran incertidumbre asociada a los datos experimentales de los parámetros farmacocinéticos, los modelos cualitativos obtenidos permiten la extracción de información cualitativa o semi-cuantitativa que puede ser de gran interés en las primeras fases del desarrollo de nuevos fármacos, para una evaluación rápida de sus propiedades farmacocinéticas. También cabe destacar que en el caso del parámetro aclaramiento (Cl , mL/min/kg) se observó una gran dispersión de los datos y no se advirtió una tendencia muy clara. Los autores atribuyeron este comportamiento al hecho de que el parámetro Cl incluye información sobre procesos metabólicos, los cuales no pueden ser modelados con CMB ni con otros sistemas cromatográficos (p. ej., ILC o columnas IAM) puesto que no existe ruptura o formación de nuevos enlaces. En la actualidad estos modelos se han ampliado hasta unos cien compuestos y en algunos casos se han obtenido relaciones de tipo cuantitativo (*Martínez-Pla J.J. y col., 2004*).

Los datos de retención obtenidos en CMB también han mostrado su utilidad en la evaluación de la toxicología medioambiental. Bermúdez-Saldaña y col. han obtenido modelos que permiten la asignación del mecanismo de acción tóxica de 85 plaguicidas pertenecientes a 6 familias diferentes, así como su etiquetado en función de su peligrosidad (*Bermúdez-Saldaña y col., 2005-a*) o en función de su riesgo potencial a largo plazo (*Bermúdez-Saldaña y col., 2005-b*) según las directivas europeas a partir de sus valores de $\log k_{\text{CMB}}$ obtenidos con fases móviles de Brij35 a pH 7. Estos autores, para estos compuestos, también han obtenido modelos QRAR de tipo parabólico que relacionan los valores del logaritmo de la relación de reparto suelo/agua con los valores de $\log k_{\text{CMB}}$ ($n = 56$, $0.74 \leq r^2 \leq 0.76$) y su clasificación en función de su movilidad (*Bermúdez-Saldaña y col., 2005-c*).

Comparando el sistema CMB con IBiPaC, la primera diferencia a destacar es la presencia y ausencia de componentes de origen biológico en IBiPaC y CMB, respectivamente, así como las bicapas lipídicas existentes en las biomembranas utilizadas en IBiPaC, frente a las monocapas de monómeros de Brij35 en las micelas o en la fase estacionaria. No obstante, se ha demostrado que los datos de retención obtenidos en IBiPaC y en CMB están relacionados. Molero-Monfort y col. (*Molero-Monfort M. y col., 2000*) observaron la existencia de relaciones lineales ($r^2 \geq 0.96$) entre

los valores de $\log k_{\text{CMB}}$ obtenidos con fases móviles de Brij35 0.02M (pH 7.4) y los valores del logaritmo de los factores de capacidad específicos en IBiPaC, $\log K_s$, tomados de la bibliografía (*Beigi F. y col., 1998*) para un conjunto de 17 xenobióticos. Los mejores resultados se obtuvieron para el sistema IBiPaC de liposomas de lípidos de membrana y vesículas de biomembranas, donde se obtuvieron pendientes estadísticamente iguales a la unidad. A la vista de los resultados los autores concluyeron que el sistema cromatográfico de CMB mimetiza adecuadamente la importancia relativa de las interacciones xenobiótico-membrana.

En la Tabla I.9 se resumen para su comparación las características principales de la cromatografía con columnas IAM, la cromatografía de reparto con biomembranas inmovilizadas y de la cromatografía micelar de bio-reparto.

Tabla I.9.- Comparación de las características de los sistemas cromatográficos desarrollados para mimetizar el reparto en las biomembranas.

Técnica	Naturaleza de la membrana artificial inmovilizada	Naturaleza del soporte	Fases móviles	Estabilidad de la fase estacionaria	Precisión de los factores de retención	Coste económico por columna	Esfuerzo experimental
IAM	Monocapas de fosfolípidos	Aminopropilsilíce	PBS ^a / modificador orgánico	Depende de la naturaleza del fosfolípido, de la composición de la fase móvil y del bloqueo de los grupos amino residuales ^b	$CV > 10\%$ entre columnas comerciales	> 1500 €	El propio de las técnicas cromatográficas
IBiPaC	Biomembranas formadas por bicapas de fosfolípidos ^c	Geles	PBS ^a	Limitada, depende de la naturaleza de la biomembrana	Elevada variabilidad entre columnas	No disponible comercialmente	Tediosa preparación de las fases estacionarias (7-8 h)
CMB	Monocapas de Brij35	Octadecilsilano	Disolución micelar de Brij35 en PBS ^a	La propia de las columnas en fase inversa	$CV < 10\%$ La propia de las columnas en fase inversa	< 300 €	El propio de las técnicas cromatográficas

^a PBS: tampón fosfato salino.

^b Referencia: (*Taillardat-Bertschiger A. y col., 2003*).

^c Pueden contener otros componentes de la biomembrana.

I.5.4.- Nuevas fases estacionarias para la evaluación de las interacciones xenobiótico-biomacromolécula

Algunos xenobióticos experimentan interacciones específicas con algunas biomacromoléculas que también contribuyen a la actividad biológica de los mismos. En este sentido, se pueden distinguir cuatro tipos de biomacromoléculas:

- i.- Las proteínas de membrana: las membranas celulares contienen una serie de proteínas unidas a una u otra cara de la membrana (proteínas periféricas) o bien que atraviesan la bicapa lipídica (proteínas integrales o de transmembrana) cuya naturaleza y composición son características de cada membrana y pueden desempeñar un papel fundamental en el transporte de xenobióticos.
- ii.- Los receptores farmacológicos: los receptores suelen ser proteínas de membrana y la unión de los xenobióticos a los mismos es un requisito bien para la estimulación o modulación de la función de un receptor (agonistas) o bien para el bloqueo del acceso de ciertos xenobióticos estimulantes (antagonistas). Cuanto mayor es la afinidad de un xenobiótico por un receptor dado mayor es su actividad agonista o antagonista.
- iii.- Las proteínas plasmáticas: en el torrente sanguíneo los xenobióticos se unen a las proteínas plasmáticas, de forma que sólo la fracción no unida queda libre para ejercer su actividad.
- iv.- Los enzimas: muchos fármacos exhiben su actividad farmacológica por inhibición de un determinado enzima. Por otro lado, los enzimas son responsables de la metabolización de los xenobióticos y, por tanto, determinan la fracción inalterada de compuesto que puede alcanzar el sitio de acción.

Para tener en cuenta las interacciones xenobiótico-biomacromolécula se han utilizado fases estacionarias en las que se han inmovilizado diferentes tipos de biomacromoléculas. Así, se han preparado fases estacionarias en las que se han inmovilizado proteínas de membrana, como por ejemplo, la P-glicoproteína y el receptor nicotínico de acetilcolina (Moaddel R. y col., 2002; Bertucci y col., 2003), proteínas plasmáticas como la albúmina de suero humano (HSA, siglas en inglés de "human serum albumin"), de suero bovino (BSA, siglas de "bovine serum albumin") (Beaudry F., y col., 1999; Hage D.S. y col., 2000), la α_1 -glicoproteína ácida (AGP, " α_1 -acid glycoprotein") (Kaliszan R. y col., 1996) y enzimas como la acetilcolinesterasa (Bertucci C. y col., 2003). La cromatografía con biomembranas inmovilizadas (modalidad IBAC) también se ha utilizado para la medida de la afinidad de los analitos por las proteínas (Gottschalk I. y col., 2002).

I.5.5.- Cromatografía electrocinética (EKC)

Los parámetros de retención o migración obtenidos en distintas modalidades de EKC también han demostrado ser útiles en la construcción de modelos QRAR. A este tipo de modelos también se les ha denominado en la bibliografía relaciones cuantitativas migración-actividad (QMAR, siglas en inglés de "*quantitative migration-activity relationship*"). Sin embargo, probablemente por tratarse de una técnica más reciente, existen muy pocas referencias sobre la aplicación de la EKC en estudios QRAR o QMAR en comparación con las publicaciones existentes en las que se emplea cromatografía líquida.

Ishihama y col. (*Ishihama Y. y col., 1995*) utilizaron los datos de migración 6 fenoles p -sustituidos obtenidos en MEEKC con microemulsiones preparadas con SDS / n -butanol / n -heptano / tampón borato (pH = 7) y sus valores de pK_a para la estimación de su toxicidad ($r = 0.683$). En un trabajo posterior (*Ishihama Y. y col., 1996-a*), utilizando el mismo tipo de microemulsión obtuvieron modelos QMAR de tipo parabólico para la evaluación de la absorción cutánea de 10 antiinflamatorios no esteroideos ($r^2 = 0.854$) y para la permeabilidad cutánea de 15 fenoles ($r = 0.965$), así como un modelo QMAR de tipo lineal para la evaluación de la concentración de 9 fenoles que inhibe en un 50% la hemólisis osmótica ($r = 0.977$). Estos autores (*Ishihama Y. y col., 1996-b*) obtuvieron modelos QMAR de tipo lineal para la evaluación de la unión a la α_1 -glicoproteína ácida de 10 compuestos catiónicos a partir de sus datos de migración en MEEKC con micromemulsiones similares a las anteriores pero preparadas con el surfactante catiónico cloruro de dodeciltrimetilamonio (DTAC, siglas de "*dodecyltrimethylammonium chloride*") ($r^2 = 0.788$).

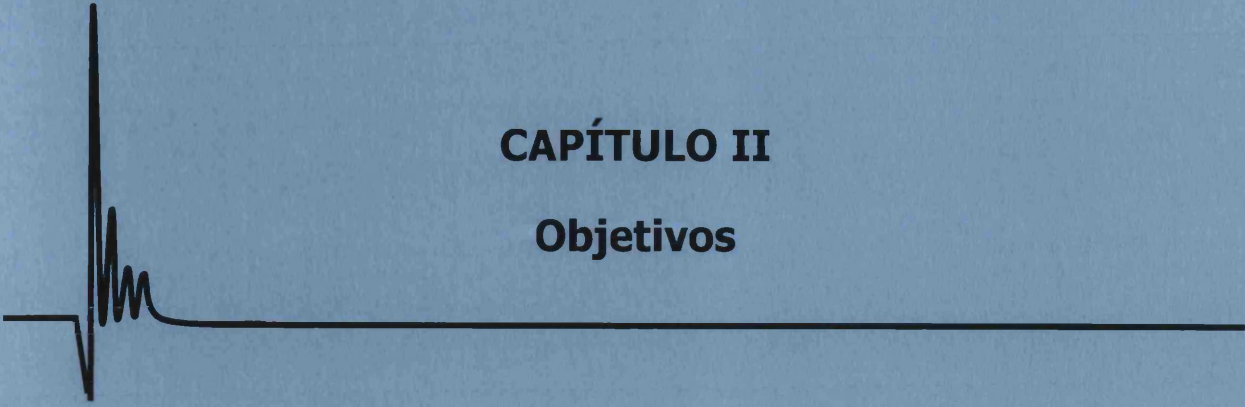
Rosés y col. (*Rosés M. y col., 1999*) obtuvieron un modelo QMAR para la evaluación de la concentración narcótica en renacuajos de 13 compuestos a partir de sus valores de $\log k$ obtenidos en MEKC con micelas mixtas SDS-Brij35 y del parámetro solvatocrómico V ($r = 0.973$).

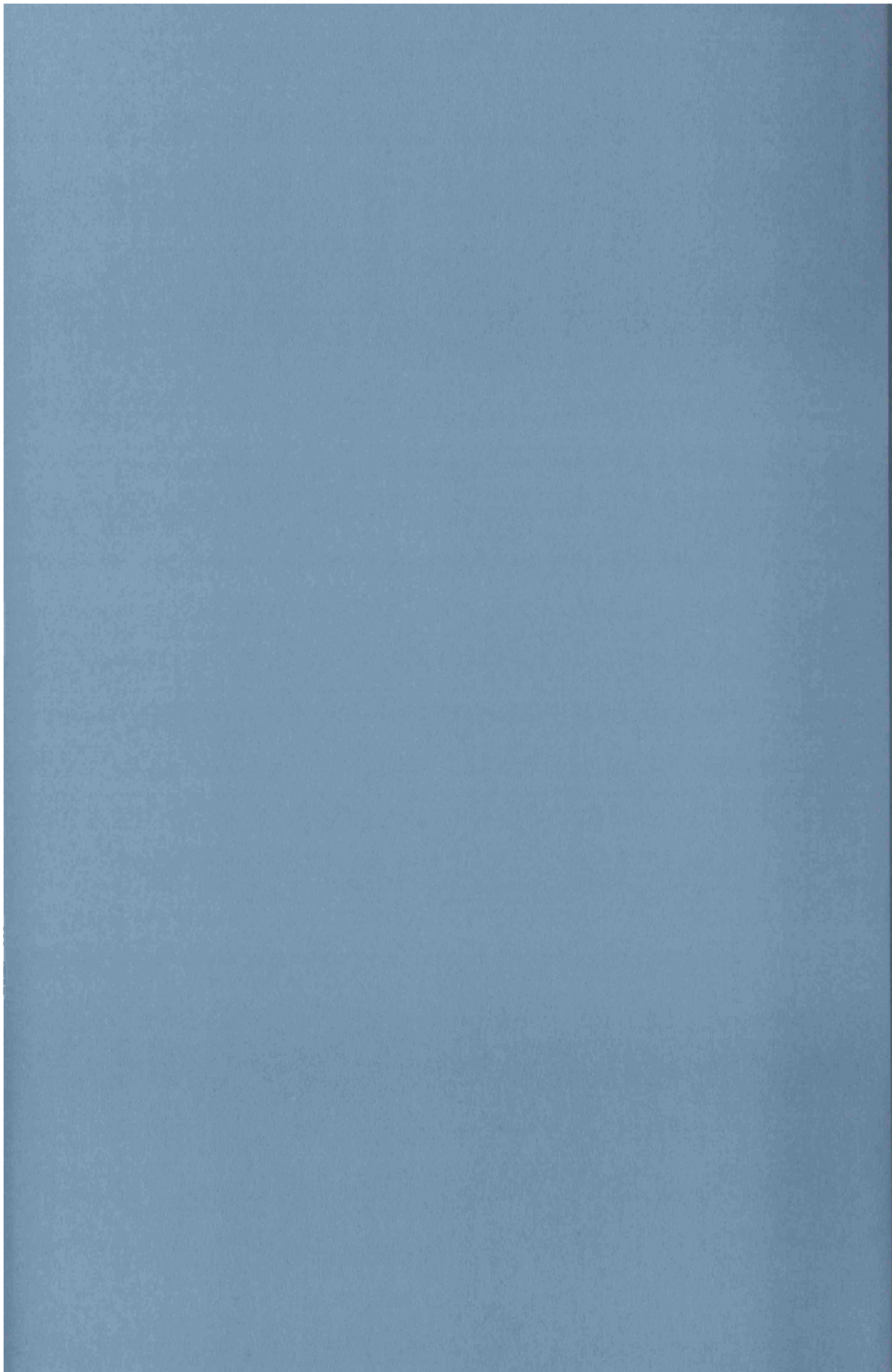
Bermúdez-Saldaña y col. (*Bermúdez-Saldaña J.M. y col., 2004*) elaboraron modelos QMAR para la evaluación de diferentes parámetros de ecotoxicidad de 24 compuestos aromáticos a partir de sus valores de $\log k$ obtenidos en sistemas MEKC con diferentes sales biliares ($0.82 \leq r^2 \leq 0.94$).

Como se ha comentado anteriormente, existen muy pocas publicaciones en este campo, sin embargo, la naturaleza de los aditivos utilizados en EKC, agregados micelares, microemulsiones, proteínas, vesículas, liposomas, etc., y las características propias de la técnica (apartado I.4.4.), convierten a EKC en una herramienta muy útil, interesante y con grandes posibilidades para la evaluación de las interacciones de xenobióticos con estos aditivos. Así, cabe destacar el creciente interés que está suscitando para la medida de la afinidad de los xenobióticos por las proteínas (*Busch M.H.A. y col., 1997; He X. y col., 2004*).

CAPÍTULO II

Objetivos





Esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de una línea de investigación desarrollada por nuestro grupo de investigación durante los últimos años cuyo objetivo último es el desarrollo y evaluación de sistemas *"in vitro"* basados en técnicas cromatográficas y electroforéticas micelares para la evaluación del comportamiento biológico de xenobióticos. Esta línea de investigación se planteó como respuesta a la demanda creciente por parte de la industria farmacéutica y química de disponer de sistemas *"in vitro"* que sirvan como una alternativa o apoyo a la experimentación con animales para su implementación en las primeras etapas de desarrollo de nuevos xenobióticos y que presenten una capacidad de alto rendimiento, que reduzcan tiempo, esfuerzo experimental y costes.

En este contexto, la hidrofobicidad de una molécula es indudablemente una de las propiedades físico-químicas determinante de su actividad biológica. Su cuantificación resulta de gran interés en los estudios QSAR (relaciones cuantitativas estructura-actividad) y tiene un valor de predicción en distintas disciplinas como farmacología, toxicología y control medioambiental. La cromatografía líquida micelar (MLC) presenta una serie de características, expuestas en el Capítulo I, que la hacen potencialmente ventajosa frente a la cromatografía líquida en fase inversa con fases móviles hidroorgánicas convencionales y frente a otras técnicas utilizadas en la evaluación de la hidrofobicidad de los compuestos. Adicionalmente, las micelas se han utilizado como modelos simples de las biomembranas debido a sus propiedades anfífilas y anisotrópicas.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es la evaluación de la aplicabilidad de la cromatografía líquida micelar en la cuantificación de las propiedades hidrófobas de moléculas bioactivas y su posible aplicación para la evaluación farmacológica y ecotoxicológica de xenobióticos. Para la consecución del mismo se plantearon dos objetivos específicos:

- 1.- Desarrollo de modelos retención-hidrofobicidad para compuestos orgánicos. Para cubrir este objetivo se realizan los siguientes estudios:

En el Capítulo IV se aborda la problemática existente acerca de la naturaleza no lineal de las relaciones entre la retención de compuestos en MLC y su hidrofobicidad. Este estudio se lleva a cabo con diferentes series de compuestos neutros eluidos con diversas fases móviles micelares de surfactantes aniónicos, catiónicos y neutros.

En el Capítulo V se estudia la posibilidad de utilizar la retención cromatográfica en MLC para estimar la hidrofobicidad de compuestos ionizados. Para llevar a cabo este estudio se ensayan diversos modelos y se comprueba su validez utilizando los datos de retención de diversas familias de compuestos congéneres ionizables eluidos con diferentes fases móviles micelares a diferentes valores de pH.

En el Capítulo VI se pretende obtener un modelo retención-hidrofobicidad de validez general que sea capaz de describir y predecir la retención de cualquier compuesto en MLC.



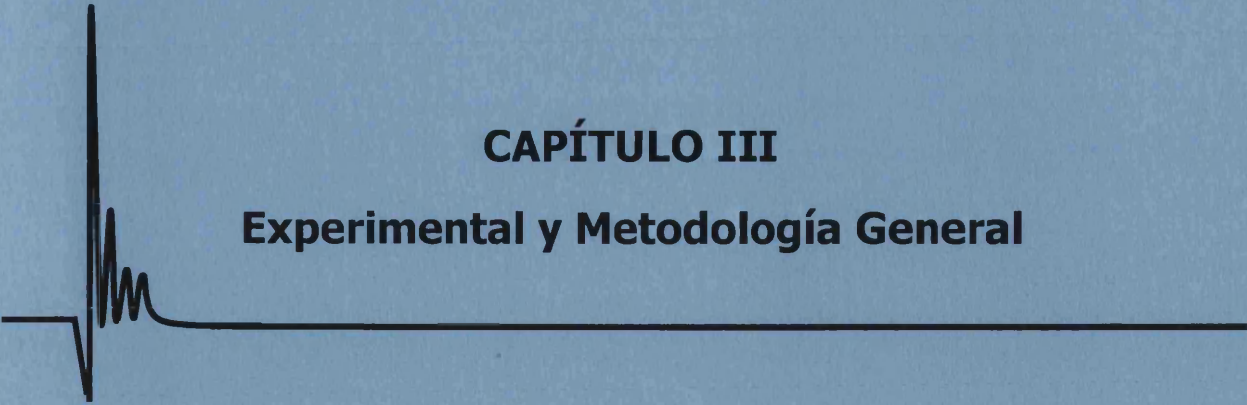
Para llevar a cabo este estudio se utiliza Brij35 (polioxietileno(23)lauril éter) como surfactante para la preparación de las fases móviles y se selecciona un conjunto amplio de compuestos no congéneres que exhiban un amplio intervalo de propiedades físico-químicas como hidrofobicidad e ionización.

- 2.- Evaluación de la potencialidad de la cromatografía líquida micelar en la construcción de modelos retención-actividad (QRAR) de fármacos y compuestos de interés medioambiental.

En el Capítulo VII se pretende obtener modelos QRAR utilizando la cromatografía micelar de bio-reparto (CMB) para la descripción de la actividad farmacológica de dos familias terapéuticas (anestésicos locales y antiinflamatorios no esteroideos) y examinar su capacidad de predicción. También se pretende comparar las características de los modelos encontrados en CMB con los obtenidos utilizando la cromatografía de membranas inmovilizadas (IAM), metodología reconocida y establecida en los laboratorios farmacéuticos.

En el Capítulo VIII se pretende desarrollar modelos QRAR para la descripción y predicción de la ecotoxicidad de un amplio conjunto de contaminantes orgánicos y su comparación con las estimaciones proporcionadas mediante programas informáticos basados en modelos QSAR.

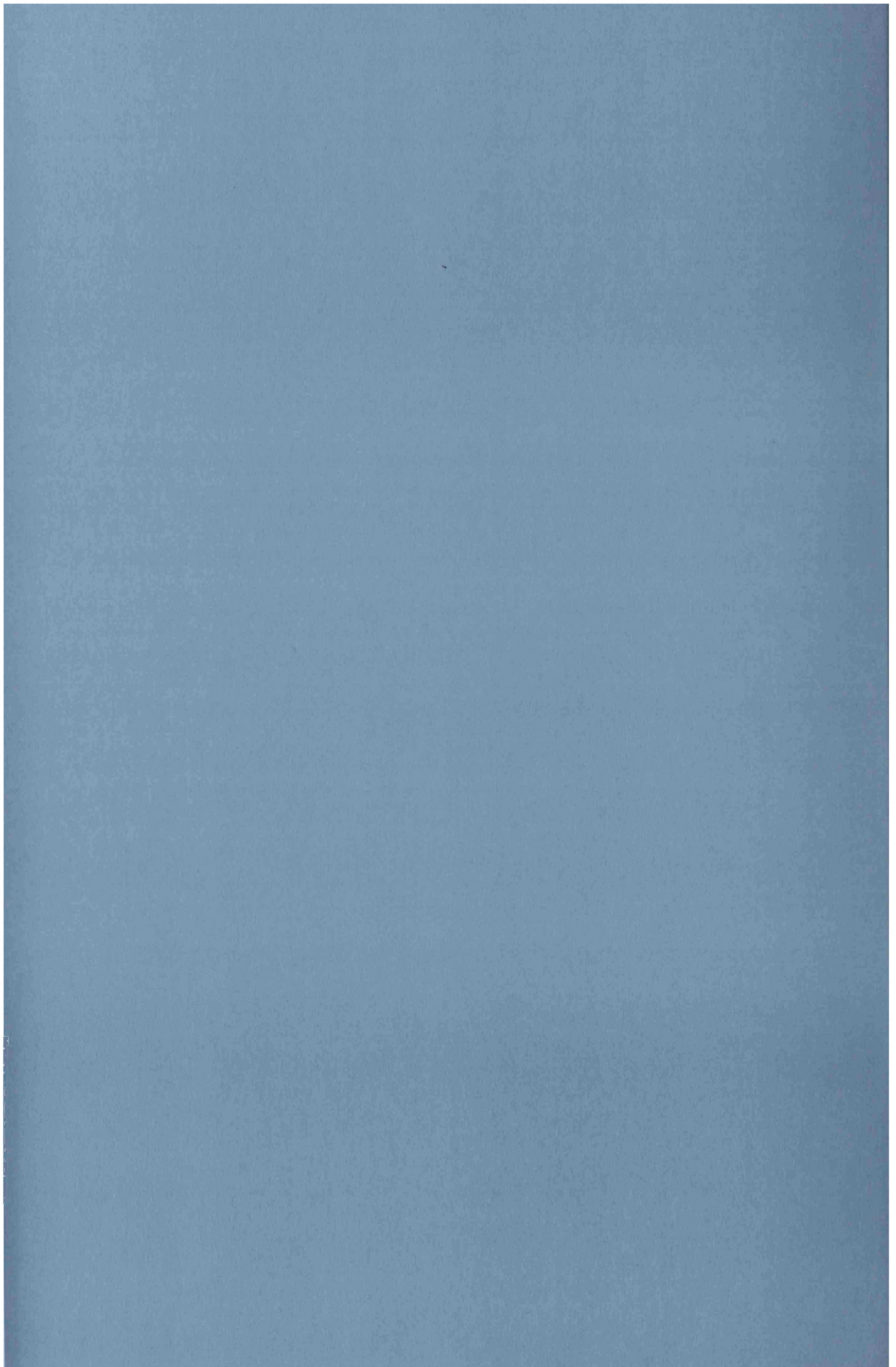
Finalmente, en el Capítulo IX se evalúa la potencialidad de la cromatografía electrocinética micelar para la descripción de propiedades ecotoxicológicas de herbicidas de la familia de los fenoxiácidos, comparando los resultados con los obtenidos con CMB.



CAPÍTULO III

Experimental y Metodología General

III.1.- Reactivos	81
III.2.- Instrumentación	82
III.3.- Acondicionamiento de los sistemas cromatográficos y electroforéticos	84
III.4.- Cálculo de los factores de retención y de los factores de afinidad	85
III.5.- Evaluación estadística de los modelos	88
III.6.- Programas informáticos utilizados	91
III.7.- Nomenclatura utilizada	93



En el presente Capítulo se exponen aspectos generales sobre el experimental y la metodología (reactivos, preparación de las fases móviles y de las disoluciones de los analitos, equipos utilizados, acondicionamiento de los sistemas cromatográficos y electroforéticos, procesamiento y tratamiento de los datos, evaluación estadística de los modelos desarrollados y programas informáticos utilizados) seguida en los Capítulos posteriores. Los aspectos concretos acerca de la configuración del equipo cromatográfico, el tipo de columna cromatográfica utilizada, flujo de fase móvil se detallan en el apartado de experimental de cada uno de los Capítulos.

III.1.- Reactivos

Las fases móviles utilizadas en cromatografía líquida micelar (MLC) se prepararon por disolución de polioxietileno(23)lauril éter (Brij®35) (Acros Organics, Geel, Bélgica) en tampón fosfato 0.05 M a pH 7 ó 7.4 con la ayuda de un baño de ultrasonidos. El Brij®35 es una marca registrada por ICI America Inc. (Wilmington, Delaware, EE.UU.), de aquí en adelante nos referiremos al mismo simplemente como Brij35. Las concentraciones de Brij35 usualmente ensayadas en las fases móviles fueron 0.02, 0.04 y 0.06 M. La disolución amortiguadora de fosfato se preparó a partir de hidrógenofosfato disódico y dihidrógenofosfato sódico (ambos reactivos analíticos, Panreac Química, S.A., Montcada i Reixac, Barcelona, España), o bien a partir de dihidrógenofosfato sódico e hidróxido sódico (purísimo, Panreac Química, S.A.). Para reproducir la presión osmótica de los fluidos biológicos, se añadió a la fase móvil micelar 9.20 g L⁻¹ de cloruro sódico (purísimo, Panreac Química, S.A.).

En cromatografía electrocinética micelar (MEKC) las disoluciones electrolíticas se prepararon utilizando disoluciones acuosas de Brij35 0.005, 0.01 y 0.02 M en tampón fosfato 0.05 M a pH 7. El tampón se preparó por disolución de la cantidad adecuada de dihidrógenofosfato sódico (grado analítico, Merck, Darmstadt, Alemania) en agua y el pH se ajustó a 7 con una disolución de hidróxido sódico 1 M (grado analítico, Merck). No se adicionó cloruro sódico al tampón electroforético debido a las altas intensidades de corriente observadas tras su adición que provocaban un calentamiento excesivo del capilar.

Las disoluciones madre de los analitos utilizadas en cromatografía, se prepararon por disolución de 10 mg del compuesto en 10 mL de disolución de fase móvil (usualmente en la de Brij35 0.04M), en metanol o acetonitrilo (ambos multisolvent, Scharlab, S.L., La Jota, Barcelona, España) o bien en la disolución de tampón fosfato 0.05 M utilizada en la preparación de las fases móviles. Las disoluciones de trabajo se prepararon por dilución de las disoluciones madre con la fase móvil de Brij35, usualmente en la de concentración de 0.04M. Para las experiencias en MEKC, las disoluciones madre de 1000 mg L⁻¹ de los analitos se prepararon con metanol (grado HPLC,

Labscan Ltd., Dublín, Irlanda) y las disoluciones de trabajo se prepararon por dilución de las mismas con metanol. Las disoluciones se guardaron en el frigorífico a 4 °C. No se observó descomposición de las disoluciones de los compuestos estudiados al menos durante un periodo de un mes. En la Tabla III.1 se muestran los compuestos utilizados junto con los distribuidores comerciales de los que se adquirieron.

III.2.- Instrumentación

Se utilizó un espectrofotómetro de fila de diodos de Hewlett-Packard, modelo 8452A, provisto de un ordenador Hewlett-Packard, modelo Vectra ES/12 (Palo Alto, California, EE.UU.) para la obtención de los espectros de absorción de los analitos.

Para la disolución y desgasificación de las disoluciones de los analitos y de las fases móviles se utilizó un baño de ultrasonidos (J.P. Selecta, S.A., modelo Ultrasons, Abrera, Barcelona, España).

Para el ajuste del pH de las fases móviles se utilizó un pH-metro (Crison Instruments, S.A., modelo micropH 2000, Alella, Barcelona, España) provisto de un electrodo combinado de vidrio-calomelanos.

El agua utilizada en la preparación de todas las disoluciones fue de calidad ultrapura, obtenida con un desionizador Barnstead E-pure® (Barnstead | Thermolyne Corporation, Sybron International, Dubuque, Iowa, EE.UU.) o bien Milli-Q (Millipore, Bedford, Massachussets, EE.UU.) para MLC y MEKC, respectivamente.

Todas las disoluciones y fases móviles se filtraron a través de filtros desechables de Nylon con un diámetro de poro de 0.45 µm de Micron Separations (Westboro, Massachussets, EE.UU.) o de Scientific Resources (Eatontown, Nueva Jersey, EE.UU.) para las experiencias en MLC y MEKC, respectivamente. Para filtrar las fases móviles se utilizó una bomba de vacío (Dinko Instruments, modelo D-95, Dinter, S.A., Barcelona, España). Para la filtración de las disoluciones de los analitos, el filtro se acopló a una jeringa de vidrio (HP) de 1 mL.

Los equipos cromatográficos empleados fueron los de sistemas de módulos integrados Hewlett-Packard Serie HP 1100, constituidos por una bomba de elución isocrática y un detector de absorción UV-visible de longitud de onda variable (Palo Alto, California, EE.UU.). Para el control de los instrumentos, adquisición y tratamiento de cromatogramas se utilizó un ordenador HP Vectra XM 5/133 Serie 4 (Ámsterdam, Holanda) provisto de una ChemStation HP (versión A0402, 1996 ó A.07.01 [682] ©HP 1999). Para realizar las inyecciones en los sistemas cromatográficos se utilizó una válvula Rheodyne (Cotati, California, EE.UU.), o bien un inyector automático (Serie Agilent 1100), en ambos casos el volumen de inyección fue de 20 µL. Las experiencias de los Capítulos VI,

VIII y IX se realizaron a temperatura controlada, utilizando un compartimento termostatzado para columnas HP 1100. Los flujos de las fases móviles fueron de 1 ó 1.5 mL min⁻¹ y se especifican en el apartado de experimental de cada uno de los Capítulos. La detección se efectuó en el UV a longitudes de onda cercanas a su máximo de absorción e indicadas en la Tabla III.1.

En MLC, se utilizaron columnas octadecilsilano C₁₈ (Scharlab, S.L., La Jota, Barcelona, España) y precolumnas de características similares a las de la columna utilizada, para preservar la integridad de la misma. Las especificaciones de las columnas se detallan en los Capítulos correspondientes.

Las experiencias en electroforesis capilar se realizaron con un sistema HP^{3D} CE (Hewlett-Packard, Waldbronn, Alemania) equipado con un detector de fila de diodos y un inyector automático. Para el control del equipo, adquisición y tratamiento de los electroferogramas se utilizó un ordenador HP Kayak XA Vectra (Walbronn, Alemania) provisto de un programa HP 3D-CE ChemStation (Rev. A. 0903 [1417], ©Agilent Technologies, 1990-2002). La inyección se realizó hidrodinamicamente a 30 mbar durante 2 s. Se utilizó un capilar de sílice fundida (Polymicro Technologies, Fénix, Arizona, EE.UU.) con un diámetro interno de 50 µm, un diámetro externo de 375 µm, siendo la longitud efectiva (L_{eff}) de 50 cm y la longitud total (L_{tot}) de 58.5 cm.

La inyección manual de las disoluciones de los analitos en el sistema cromatográfico se realizó con una jeringa de vidrio (HP) de 1 mL a través de un disco de Nylon de 0.45 µm (Micron Separations), acoplado a la jeringa. Este sistema también se utilizó para rellenar los viales utilizados en el inyector automático del equipo cromatográfico y de electroforesis capilar.

III.3.- Acondicionamiento de los sistemas cromatográficos y electroforéticos

Previamente a la inyección de las muestras en el cromatógrafo, es necesario acondicionar el sistema con la fase móvil micelar. Para ello se sigue el siguiente procedimiento:

Inicialmente, la columna se encuentra estabilizada con acetonitrilo. Para cambiar a la fase móvil micelar, en primer lugar, es necesario pasar algunos volúmenes de agua para eliminar el acetonitrilo y evitar la precipitación del Brij35 en el sistema cromatográfico, debido su baja solubilidad en acetonitrilo. Para evitar el cambio brusco de presión en el sistema cromatográfico, el flujo de agua se aumenta progresivamente desde 0.2 mL min^{-1} a 1 mL min^{-1} .

A continuación, se bombea la fase móvil micelar, comenzando a flujo de 0.2 mL min^{-1} e incrementándolo progresivamente hasta el valor de flujo de fase móvil deseado para efectuar el análisis cromatográfico, una vez alcanzado el flujo deseado se mantiene al menos durante una hora para asegurar la adsorción reproducible y constante de monómeros de tensioactivo sobre la fase estacionaria. Desde el punto de vista práctico, la estabilización de la línea base es un buen indicativo de que el sistema se encuentra totalmente equilibrado. De esta forma, el sistema se encuentra en las condiciones adecuadas para empezar el desarrollo cromatográfico. Con un flujo de fase móvil de 1 mL min^{-1} , la presión se debe encontrar entre 100 y 200 bar, dependiendo de la naturaleza de la fase móvil utilizada, de las características de la columna cromatográfica y de la temperatura. Para una fase móvil dada, la presión se mantiene prácticamente constante, siendo las variaciones máximas de 10 bar tras una semana de trabajo.

Para sustituir la fase micelar por acetonitrilo, se repite el proceso anterior en sentido inverso, realizando en primer lugar el cambio de la fase micelar a agua, y finalmente, de agua a acetonitrilo. Una presión en el sistema cromatográfico de aproximadamente 40 bar con una columna de unos 15 cm de longitud, $5 \mu\text{m}$ de tamaño de poro y un flujo de acetonitrilo 1 mL min^{-1} a temperatura ambiente, es indicativo de que no ha habido ninguna obstrucción en el sistema cromatográfico.

En electroforesis capilar es necesario activar y acondicionar el capilar antes de su utilización. Con capilares nuevos se sigue el siguiente protocolo: inicialmente, se realiza una etapa de lavado del capilar con una disolución acuosa de hidróxido sódico 1 M durante 10 min a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. A continuación, se lava con agua Mili-Q durante 3-4 min. Finalmente, se realiza la etapa de acondicionamiento del capilar con el tampón electroforético de trabajo a la temperatura de desarrollo deseada ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 15-20 min. Todas estas etapas se realizan ejerciendo una presión sobre el vial de entrada de 1000 mbar. Tras estas etapas de activación y acondicionamiento, el capilar está listo para su utilización.

Adicionalmente, a fin de obtener picos simétricos y datos de migración reproducibles, al principio del día y antes de cada inyección el capilar se acondiciona de acuerdo a los siguientes pasos: (1) lavado con agua Milli-Q durante 2 min; (2) lavado con hidróxido sódico 0.1 M durante 2 min; (3) 2 min de lavado con agua Milli-Q y (4) acondicionamiento del capilar con el tampón de trabajo durante 2 min (5-10 min si se trata de la primera sesión de trabajo del día). Todos estos pasos se realizan a la temperatura de trabajo y ejerciendo una presión de 1000 mbar.

Finalmente, una vez terminadas todas las experiencias, es necesario lavar el capilar. Para ello se repiten todos los pasos anteriormente descritos para el acondicionamiento del capilar entre inyecciones, a excepción del paso (4) en el que el capilar se lava con metanol durante 2-3 min. Además, en este caso todos los pasos se pueden realizar a temperatura ambiente.

III.4.- Cálculo de los factores de retención y de los factores de afinidad

En cromatografía, para calcular el factor de retención se utilizó la expresión:

$$k = \frac{t_R^g - t_M^g}{t_M^g} \quad (\text{III.1})$$

donde t_R^g es el tiempo total de retención del analito y t_M^g es el "tiempo total básico", estimado a partir de la primera perturbación que aparece en el cromatograma. El equipo cromatográfico se configuró de modo que el tiempo de extra-columna fuese despreciable y por tanto el tiempo total básico medido experimentalmente fuese equivalente al tiempo básico (tiempo necesario para que la fase móvil pase a través de la columna). En el Capítulo VI se utilizaron factores de retención relativos siguiendo el procedimiento que se detallará en dicho Capítulo.

En la Figura III.1 se muestra el cromatograma de algunos antiinflamatorios no esteroideos obtenido con una fase móvil micelar de Brij35 0.04 M a pH 7.4, donde se indica con una flecha la posición considerada para la estimación del "tiempo total básico". Todos los factores de retención se obtuvieron inyectando por triplicado las disoluciones de los analitos y en los cálculos se utilizó la media de los valores individuales.

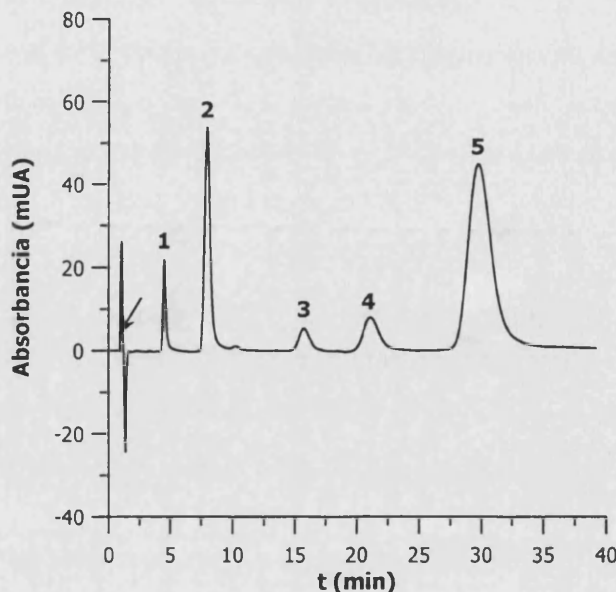


Figura III.1.- Cromatograma de algunos antiinflamatorios esteroideos obtenido con una fase móvil micelar de Brij35 0.04 M a pH 7.4: **(1)** ácido salicílico, **(2)** naproxeno, **(3)** flurbiprofeno, **(4)** diclofenac y **(5)** fentiazac. Estimación del "tiempo total básico" (←).

Para evaluar la retención en cromatografía electrocinética micelar se utilizaron los factores de afinidad ($\tilde{k}'_{MEKC,i}$) propuestos por Collet y Gareil (*Collet J. y col., 1997*) para la separación de solutos aniónicos en presencia de micelas neutras, como una medida la interacción soluto-micela. Los factores de afinidad, $\tilde{k}'_{MEKC,i}$, se calcularon a partir de las movilidades electroforéticas (denominadas tradicionalmente movilidades electroforéticas efectivas, $\mu_{ep,i}$), que son independientes del flujo electroosmótico, a partir de la siguiente ecuación:

$$\tilde{k}'_{MEKC,i} = \frac{\mu_{ep,i}^z}{\mu_{ep,i}^m} - 1 \tag{III.2}$$

donde el subíndice i representa al analito y los superíndices m y z hacen referencia a la presencia y ausencia de micelas en el tampón electroforético, respectivamente. Las movilidades electroforéticas del soluto i en ausencia ($\mu_{ep,i}^z$) o en presencia ($\mu_{ep,i}^m$) de un surfactante neutro, se pueden calcular a partir de las siguientes expresiones:

$$\mu_{ep,i}^z = \mu_{tot,i}^z - \mu_{eo}^z = \frac{L_{tot} \cdot L_{eff}}{V} \left(\frac{1}{t_{m,i}^z} - \frac{1}{t_{eo}^z} \right) \tag{III.3}$$

$$\mu_{ep,i}^m = \mu_{tot,i}^m - \mu_{eo}^m = \frac{L_{tot} \cdot L_{eff}}{V} \left(\frac{1}{t_{m,i}^m} - \frac{1}{t_{eo}^m} \right) \tag{III.4}$$

donde $\mu_{\text{tot},i}$ es la movilidad electroforética total (denominada tradicionalmente movilidad electroforética aparente) del analito i medida en presencia del flujo electroosmótico, μ_{eo} es la movilidad electroosmótica, L_{tot} es la longitud total del capilar, L_{eff} es la longitud efectiva del capilar, V es el voltaje aplicado, $t_{m,i}$ es el tiempo de migración del analito y t_{eo} es el "tiempo básico electroosmótico" medido como el tiempo de migración de un soluto sin carga que migra junto al flujo electroosmótico (marcador del flujo electroosmótico). Como marcador del flujo electroosmótico se utilizó metanol. En la Figura III.2 se muestra un electroferograma del ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propiónico obtenido en electroforesis capilar zonal en el que se muestra el "tiempo básico electroosmótico" y el tiempo de migración del analito

Las movilidades electroforéticas y electroosmóticas se expresaron en $\text{cm}^2 \text{kV}^{-1} \text{min}^{-1}$. Todos los factores de afinidad, se obtuvieron inyectando por triplicado las disoluciones de los analitos tanto en cromatografía electrocinética micelar como en electroforesis capilar zonal. En los cálculos se utilizó el valor medio del factor de afinidad.

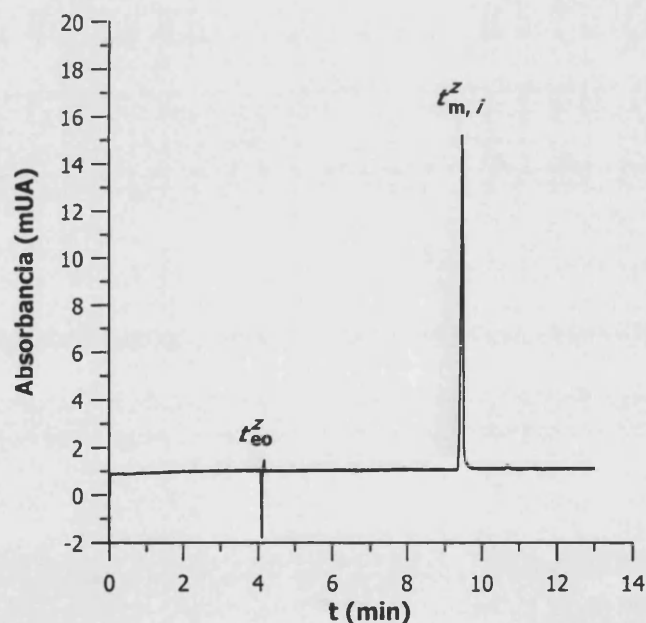


Figura III.2.- Electroferograma del ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propiónico (2,4,5-TCPA) obtenido utilizando como tampón electroforético una disolución acuosa de tampón fosfato 0.05 M a pH 7.4. (t_{eo}^z) "Tiempo básico electroosmótico" y ($t_{m,i}^z$) tiempo de migración del analito en electroforesis capilar zonal.

III.5.- Evaluación estadística de los modelos

Para la evaluación estadística de los modelos obtenidos, se emplearon los estadísticos de regresión utilizados usualmente en la bibliografía para este tipo de estudios:

- r : coeficiente de correlación (momento-producto).
- r^2 : coeficiente de determinación.
- r' y r'^2 : coeficientes de correlación y determinación ajustados a los grados de libertad, respectivamente. Estos estadísticos son apropiados para la comparación de modelos con un número diferente de variables independientes.
- $s_{y/x}$: estadístico que estima la desviación estándar de los residuos de y (también denominado error típico o error estándar de la estimación en algunos programas informáticos de cálculo y representado con las notaciones s_e o SE). Se puede utilizar para la construcción de los límites de predicción para nuevas observaciones.
- F : cociente entre la varianza modelada y la residual obtenido a partir de un análisis de varianza (ANOVA, siglas inglesas de "analysis of variance").

Con el fin de evaluar con mayor rigor los modelos de regresión e incrementar así la confianza estadística de las estimaciones obtenidas a partir de éstos, adicionalmente, se utilizaron otros parámetros estadísticos:

- $b_i \pm t_{\alpha/2, \nu} \cdot s_{b_i}$: intervalo de confianza ($IC_{100(1 - \alpha)\%}$) de los coeficientes de ajuste (b_i) del modelo para un nivel de significación α , o lo que es lo mismo, para un nivel de confianza (NC) del $100(1 - \alpha)\%$. El estadístico $t_{\alpha/2, \nu}$ es el valor tabulado de la distribución t de Student para un nivel de significación de $\alpha/2$ y ν grados de libertad, y s_{b_i} es la desviación estándar de los coeficientes de ajuste b_i . Para la obtención de los intervalos de confianza de los coeficientes se fijó a priori un nivel de significación $\alpha = 0.05$ ($NC = 95\%$).
- p : probabilidad asociada al ANOVA del modelo de regresión y a los coeficientes de ajuste del mismo. Es una medida del nivel de significación (calculado a posteriori) del modelo o de los coeficientes de ajuste. Un modelo o los coeficientes de ajuste del mismo, se consideran estadísticamente significativos a un $NC = 95\%$ cuando el valor del estadístico p asociado a ellos es menor de 0.05.

Cuando un modelo y sus coeficientes de ajuste son estadísticamente significativos pueden utilizarse con fines cuantitativos, es decir, para la predicción de la variable

dependiente. En ocasiones puede suceder, que el modelo a un $NC = 95\%$ sea estadísticamente significativo ($p < 0.05$) y alguno de sus coeficientes de ajuste no lo sea ($p > 0.05$). En tales casos, el modelo obtenido sólo puede utilizarse como una herramienta cualitativa. Si se pretende utilizar con fines cuantitativos, desde el punto de vista estadístico, se recomienda volver a construir el modelo eliminando el coeficiente de ajuste no significativo.

La capacidad de descripción y de predicción de los modelos se evaluó por comparación de los valores obtenidos para los siguientes parámetros:

- La raíz cuadrada del error al cuadrado medio en calibración ($RMSEC$, siglas inglesas de "root-mean-square error of calibration"). Es una medida del error de ajuste y se calcula mediante la siguiente expresión:

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}} \quad (III.5)$$

donde \hat{y}_i es el valor de la variable dependiente predicho por el modelo para la molécula i cuando las n moléculas se incluyen en el mismo, y_i es el valor de la variable y para la molécula i y n es el número de moléculas (o de objetos) incluidas en el modelo. Este parámetro informa de la capacidad de descripción del modelo y da una medida de la desviación promedia del modelo respecto de los datos a partir de los cuales se ha construido el mismo.

- La raíz cuadrada del error al cuadrado medio en validación cruzada ($RMSECV$, siglas en inglés de "root-mean-square error of cross-validation"). Es una medida del error en predicción, basada en validación cruzada. Normalmente, $RMSECV$ se calcula mediante la ecuación (III.5), si bien \hat{y}_i representa predicciones para moléculas excluidas en la construcción del modelo.

De la definición de $RMSECV$ se puede deducir que este parámetro aporta información acerca de la capacidad del modelo para predecir el valor de la variable dependiente para nuevas moléculas.

- La raíz cuadrada del error al cuadrado medio en validación cruzada para las predicciones obtenidas por interpolación ($RMSECV_i$). Este parámetro fue propuesto por el Profesor S. Sagrado (*Escuder-Gilabert L. y col., 1999*), miembro de nuestro grupo de investigación. El valor del parámetro $RMSECV_i$ se obtiene de manera análoga a la del parámetro $RMSECV$, a excepción de la exclusión de los dos datos correspondientes a los valores extremos (mayor y menor) de la variable independiente:

$$RMSECV_i = \sqrt{\frac{\sum_{i=2}^{n-1} (\hat{y}_i - y_i)^2}{n-2}} \quad (\text{III.6})$$

De acuerdo con las definiciones de los parámetros que se acaban de exponer, se deduce que cuanto menores sean las diferencias entre $RMSEC$, $RMSECV$ y en su caso $RMSECV_i$, mayor será la robustez del modelo. Por otro lado también es importante destacar que cuanto menores sean las diferencias entre los valores de $RMSECV$ y de $RMSECV_i$, la predicción del valor de la variable dependiente obtenida por extrapolación para nuevas moléculas será más fiable.

La etapa de validación se realizó de forma diferente en función de si se disponía de una "serie corta" o una "serie larga" de datos:

- En el caso de disponer de una "serie corta de datos", para obtener los valores de $RMSECV$, cada una de las moléculas i incluidas en la etapa de calibración del modelo se excluyó del modelo y se predijo en el modelo formado por con las $n - 1$ moléculas restantes, así sucesivamente generando n nuevos modelos que predicen el valor para la molécula excluida correspondiente. Esta técnica de validación cruzada se denomina "*leave-one-out cross-validation*".

El parámetro $RMSECV$ obtenido de esta manera, integra la información de extrapolación e interpolación de los datos en el modelo. La extrapolación de los datos extremos puede ser inconsistente para "series cortas de datos". Por este motivo, en estas situaciones se utilizó además el parámetro $RMSECV_i$.

- En el caso de "series largas de datos", salvo que existan datos puntuales con características muy especiales o diferentes respecto a las del resto de la serie, el hecho de excluir una molécula i para su predicción en el modelo generado por las $n - 1$ moléculas restantes, es de esperar que no tenga un impacto especial sobre el modelo. Por tanto, en estas situaciones la validación cruzada del tipo "*leave-one-out cross-validation*" no aporta información relevante acerca de la capacidad de predicción del modelo. En estos casos, es más recomendable, realizar la etapa de validación cruzada mediante la eliminación sucesiva de bloques de datos que contienen j moléculas seleccionadas de forma aleatoria en lugar de excluir una única molécula ("*Venetian-blinds cross-validation*"). En el caso de "series largas de datos", el parámetro $RMSECV_i$ no resulta de interés a menos que los dos datos extremos sean muy diferentes respecto a los del resto de la serie.

III.6.- Programas informáticos utilizados

A continuación, se enumeran los programas informáticos utilizados en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, y se describe brevemente la finalidad que se les asignó a cada uno de ellos, ya sea para el tratamiento y procesamiento de los datos cromatográficos y electroforéticos, para la obtención y evaluación estadística de los modelos desarrollados, como para la obtención y estimación de descriptores estructurales y de ecotoxicidad.

Tratamiento de los datos de retención y migración



Microsoft® Excel (©Microsoft Corporation, versiones 7.0 a 2000). Se utilizó para el cálculo de los factores de retención en cromatografía, de las movilidades electroforéticas y de los factores de afinidad, así como para la obtención de los parámetros estadísticos asociados a ellos. Adicionalmente, se utilizó para el procesamiento de los datos y construcción de las matrices (X) o vectores (x e y) de datos y para realizar una evaluación previa de la relación existente entre ellos.

Obtención y evaluación estadística de los modelos



The MathWorks

MATLAB® for Windows (©The MathWorks Inc., versión 4.2c.1). Este programa se utilizó para la obtención y evaluación estadística de los modelos. Especialmente, para la obtención de los valores de los parámetros $RMSEC$, $RMSECV$ y $RMSECV_i$. Todo ello se realizó a través de rutinas informáticas desarrolladas por el Profesor Salvador Sagrado.



STATGRAPHICS Plus for Windows (©Statistical Graphics Corp., versión 2.1). Este programa se utilizó para la obtención de los valores de algunos estadísticos asociados a los modelos (p. ej., los estadísticos p). Además, se utilizó para la obtención de modelos por regresión lineal múltiple (MLR, siglas en inglés de "*multiple linear regression*") (p. ej., "*stepwise MLR*"; regresión lineal múltiple "paso a paso") y para la obtención de modelos de regresión no lineal que requieren el uso de técnicas iterativas (Capítulo VI).



The Unscrambler® (©CAMO ASA, CAMO Inc., versiones 7.01 y 7.6). Este programa se utilizó para la obtención de modelos multivariantes mediante las técnicas de análisis en componentes principales (PCA, siglas en inglés de "*principal component analysis*") y de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS, siglas en inglés de "*partial least squares*").

Obtención y estimación de descriptores estructurales y de ecotoxicidad



ACD/logP (ACD Labs™, Advanced Chemistry Development Inc., versión de demostración). Este programa se utilizó para la estimación de valores de las relaciones de reparto *n*-octanol/agua ($\log P$) de la forma neutra de los compuestos a partir de su estructura molecular.



ACD/ChemSketch (ACD Labs™, Advanced Chemistry Development Inc., versión de demostración). Este programa se utilizó para la estimación de los valores del volumen molar (V_m), refracción molar (R_m), "parachor" (Pr) y polarizabilidad para la forma neutra de los compuestos a partir de su estructura molecular.



KOWWIN™ (US Environmental Protection Agency, US EPA, versión 1.66)^a. Se utilizó para la estimación de valores de $\log P$ para la forma neutra de los compuestos a partir de su estructura molecular.



MPBPWIN™ (US EPA, versión 1.40)^a. Se utilizó para la obtención de los valores experimentales de los puntos de fusión de los compuestos o en su defecto para su estimación.



WSKOWWIN™ (US EPA, versión 1.10)^a. Se utilizó para la obtención de los valores experimentales de la solubilidad en agua de los compuestos o en su defecto para su estimación.



ECOSAR Class Program™ (US EPA, versión 0.99e)^a. Este programa se utilizó para la estimación de los valores de los parámetros de ecotoxicidad utilizados en los Capítulos VIII y IX.



BCFWIN™ (US EPA, versión 2.14)^a. Este programa se utilizó para la estimación de los valores del factor de bioconcentración (BCF, siglas en inglés de "bioconcentration factor") en peces.

Otros programas utilizados



GRAPHER (Golden software Inc., versión 1.22). Se utilizó para la representación gráfica de los pares de datos (x_i , y_i).



ChemWindow® (ShoftShell INTERNATIONAL, versión 3.0). Se utilizó para el dibujo de las estructuras moleculares bidimensionales de los compuestos.

^a Propiedad de la US EPA. Desarrollados por la "Office of Pollution Prevention and Toxics" (OPPT) de la EPA y la "Syracuse Research Corporation" (SRC). Programas integrados en el paquete informático EPI Suite™ (versión 3.05), cedido por gentileza del Profesor Bill Meylan de la SRC.

III.7.- Nomenclatura utilizada

La nomenclatura utilizada se ha intentado adaptar en todo lo posible a las recomendaciones de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) recogidas en la versión en castellano del "Compendio de Terminología Química" (*McNaught A.D. y col., 2003*). Asimismo, la terminología de los parámetros utilizados en cromatografía y electroforesis se ha adaptado a las recomendaciones de la IUPAC más recientes encontradas (*García-Domínguez J.A. y col., 2001; Riekkola M.L. y col., 2004*)

Los fármacos se han designado con su nombre común, utilizado por el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España (*Cuéllar Rodríguez S., 1995; <http://www.portalfarma.com>*). Para el resto de compuestos también se ha utilizado su nombre común, a menos que existieran discrepancias en el mismo que pudieran llevar a confusión. En tales casos se ha utilizado además su nombre sistemático.

Tabla III.1.- Relación de los analitos ensayados, de sus distribuidores comerciales y longitud de onda de detección.

COMPUESTOS	DISTRIBUIDORES COMERCIALES^a	λ (nm)
ANESTÉSICOS LOCALES		
Bupivacaína	Laboratorios Inibsa, S.A. ^b	220 ^c ; 254 ^d
Dibucaína clorhidrato	Sigma	220 ^c ; 254 ^d
Lidocaína clorhidrato	Laboratorio Seid, S.A. e Inibsa, S.A. ^b	220 ^c ; 254 ^d
Mepivacaína clorhidrato	Laboratorios Inibsa, S.A. ^b	220 ^c ; 254 ^d
Prilocaina clorhidrato	Laboratorios Inibsa, S.A. ^b	220 ^c ; 254 ^d
Procaína	Laboratorio Seid, S.A. ^b	220 ^c ; 254 ^d
Propanocaína	Laboratorio Seid, S.A. ^b	220 ^c ; 254 ^d
Tetracaína clorhidrato	Sigma	220 ^c ; 254 ^d
ANTIÉPILÉPTICOS		
Clometiazol	Distraneurine [®] , AstraZeneca Farmacéutica Spain, S.A.	240
Clordiazepóxido clorhidrato	Guinama, S.L.	220
Fenitoína sódica	Laboratorios Rubió, S.A. ^b	220
Lamotrigina	Labileno [®] , Faes Farma	240
ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS		
Amineptina	Laboratorios Servier, S.A. ^b	226
Amitriptilina clorhidrato	Guinama, S.L.	240
Amoxapina	Demolox [®] , Wyeth Farma, S.A.	256
Clomipramina clorhidrato	Sigma	220
Desipramina clorhidrato	Sigma	220
Dosulepina clorhidrato	Prothiaden [®] , Laboratorios Alter, S.A.	228
Doxepina clorhidrato	Grupo Farmasierra, S.A. ^b	254
Imipramine clorhidrato	Guinama, S.L.	220
Loxapina clorhidrato	Desconex [®] , Grupo Reig Jofre	280
Maprotilina clorhidrato	Ludiomil [®] , Novartis Farmacéutica, S.A.	230
Melitraceno clorhidrato	Lundbeck España, S.A. ^b	220
Mianserina clorhidrato	Lantanon [®] , Organon Española	240
Nortriptilina clorhidrato	Lilly, S.A. ^b	220
Quinupramina	Aventis Pharma, S.A. ^b	220
Trimipramina maleato	Surmontil [®] , Aventis Pharma, S.A.	226
ANTIISTAMÍNICOS		
Ciproheptadina clorhidrato	Guinama, S.L.	288
Difenhidramina clorhidrato	Guinama, S.L.	220
Hidroxizina clorhidrato	Guinama, S.L.	240
Metapirileno clorhidrato	Sigma	240
Orfenadrina clorhidrato	Sigma	220
Ranitidina clorhidrato	Guinama, S.L.	240
ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS		
Acemetacina	Laboratorios Fher, S.A. ^b	220
Ácido acetilsalicílico	Panreac Química, S.A. (purísimo)	220
Ácido salicílico	Panreac Química, S.A. (purísimo)	220
Diclofenac sódico	Novartis Farmacéutica, S.A. ^b	220
Fenbufeno	Cincopal [®] , Wyeth Farma, S.A.	220
Fentiazac	Donorest [®] 100, Wyeth Farma, S.A.	220
Flurbiprofeno	Froben [®] 50, Abbott Laboratories, S.A.	220
Ibuprofeno	Nurofen [®] 400, Boots Healthcare Iberia	220
Ibuproxam	Grupo Ferrer ^b	220
Indometacina	Laboratorios Llorens, S.A. ^b	220
Ketoprofeno	Aventis Pharma, S.A. ^b	220

(Continúa en la página siguiente)

Tabla III.1.- (Continuación)

COMPUESTOS	DISTRIBUIDORES COMERCIALES ^a	λ (nm)
Nabumetona	GlaxoSmithKline ^b	220
Naproxeno	Roche Farma, S.A. ^b	220
Piketoprofeno	Almirall Prodesfarma, S.A. ^b	220
Sulindac	Sulindal [®] , Merck Sharp & Dohme de España, S.A.	220
Tolmetín sódico dihidratado	Laboratorio Estedi, S.L. ^b	220
ANTIPSIKÓTICOS		
Butirofenonas		
Bromperidol	Janssen Pharmaceutica	254
Droperidol	Sigma	254
Haloperidol	Sigma	254
Fenotiazinas		
Clorpromazina clorhidrato	Largactil [®] , Aventis Pharma, S.A.	254
Etopropazina clorhidrato	Sigma	254
Flufenazina clorhidrato	Guinama, S.L.	254
Metotrimeprazina maleato	Sigma	254
Perfenazina	Sigma	254
Periciazina	Nemactil [®] , Aventis Pharma, S.A.	254
Proclorperazina dimaleato	Sigma	254
Prometazina clorhidrato	Guinama, S.L.	254
Tioridazina clorhidrato	Sigma	254
Trifluoperazina dihidroclorhidrato	Sigma	254
Trimeprazina hemi-(+)-tartrato	Sigma	254
Otros antipsikóticos		
Clorprotixeno clorhidrato	Sigma	254
Pimozida	Sigma	
BARBITÚRICOS		
Alobarbital	Sigma	240
Amobarbital sódico	Sigma	240
Aprobarbital	Sigma	240
Barbital	Sigma	240
Bralobarbital cálcico	UCB Pharma, S.A. ^b	240
Butabarbital	Sigma	240
Butalbital	Sigma	240
Butetal	Sigma	240
Fenobarbital	Química Farmacéutica Bayer, S.A. ^b	240
Hexobarbital	Sigma	240
Mefobarbital	Sigma	240
Pentobarbital	B. Braun Medical Inc. ^b	240
Secobarbital sódico	UCB Pharma, S.A. ^b	240
BENZODIAZEPINAS		
Alprazolam	Trankimazin [®] , Pharmacia Spain	240
Benzazepam	Knoll, S.A. ^b	240
Bromazepam	Lexatin [®] , Roche Farma, S.A.	240
Clobazam	Noiafren [®] , Aventis Pharma, S.A.	240
Clonazepam	Rivotril [®] , Roche Farma, S.A.	240
Diazepam	Guinama, S.L.	240
Flunitrazepam	Rohipnol [®] , Roche Farma, S.A.	240
Lorazepam	Orfidal [®] , Wyeth Farma, S.A.	240
Lormetazepam	Loramet [®] , Wyeth Farma, S.A.	240
Midazolam maleato	Dormicum [®] , Roche Farma, S.A.	240
Oxazepam	Adumbran [®] , Boehringer Ingelheim España, S.A.	240
Tetrazepam	Myolastan [®] , Sanofi Synthelabo	240

(Continúa en la página siguiente)

Tabla III.1.- (Continuación)

COMPUESTOS	DISTRIBUIDORES COMERCIALES ^a	λ (nm)
β-BLOQUEANTES		
Alprenolol clorhidrato	Sigma	280
Metoprolol	Novartis Farmaceutica, S.A. ^b	280
Oxprenolol	Novartis Farmaceutica, S.A. ^b	280
Pindolol	Sigma	280
Propranolol	ICI-Farma ^b	280
DERIVADOS DEL BENCENO MONO- Y DI-SUSTITUIDOS		
Acetanilida	Scharlab, S.L. (purísimo)	254
Acetofenona	Scharlab, S.L. (purísimo)	254
<i>o</i> -Acetotoluidida	Acros Organics	254
Ácido benzoico	Scharlab, S.L. (para análisis)	254
Ácido 2-iodobenzoico	Panreac Química, S.A.	254
Anilina	Scharlab, S.L. (para análisis)	254
Bromobenceno	Scharlab, S.L. (para síntesis)	254
Nitrobenceno	Scharlab, S.L. (para análisis)	254
<i>p</i> -Nitroanilina	Scharlab, S.L. (para síntesis)	254
Resorcinol	Doesder	254
FENILUREAS		
Buturón	Dr. Ehrenstorfer	245
Clorbromurón	Dr. Ehrenstorfer	245
Clorotolurón ^e	Dr. Ehrenstorfer	245
Cloroxurón	Dr. Ehrenstorfer	245
Diurón	Dr. Ehrenstorfer	245
Fenurón ^e	Dr. Ehrenstorfer	245
Fluometurón ^e	Dr. Ehrenstorfer	245
Hexaflumurón	Dr. Ehrenstorfer	245
Isoproturón ^e	Dr. Ehrenstorfer	245
Linurón	Dr. Ehrenstorfer	245
Lufenurón	Dr. Ehrenstorfer	245
Metoxurón	Dr. Ehrenstorfer	245
Monolinurón ^e	Dr. Ehrenstorfer	245
Monurón ^e	Dr. Ehrenstorfer	245
Neburón ^e	Dr. Ehrenstorfer	245
FENOLES		
2-Clorofenol	Dr. Ehrenstorfer	278
4-Cloro-3-metilfenol	Dr. Ehrenstorfer	284
<i>o</i> -Cresol	Fluka	274
<i>p</i> -Cresol	Fluka	274
2,4-Diclorofenol	Dr. Ehrenstorfer	290
2,4-Dimetilfenol	Dr. Ehrenstorfer	286
2,4-Dinitrofenol	Sigma	358
4,6-Dinitro- <i>o</i> -cresol	Aldrich	370
2-Fenilfenol	Dr. Ehrenstorfer	220
Fenol	Dr. Ehrenstorfer	272
2-Nitrofenol	Dr. Ehrenstorfer	280
4-Nitrofenol	Dr. Ehrenstorfer	318
Pentaclorofenol	Dr. Ehrenstorfer	258
2,4,6-Triclorofenol	Dr. Ehrenstorfer	252

(Continúa en la página siguiente)

Tabla III.1.- (Continuación)

COMPUESTOS	DISTRIBUIDORES COMERCIALES ^a	λ (nm)
FENOXIÁCIDOS		
Ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropiónico	Aldrich	230
Ácido 2-(3-clorofenoxi)propiónico	Aldrich	230
Ácido 2-(4-clorofenoxi)propiónico	Aldrich	230
Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético	Dr. Ehrenstorfer	230
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	Dr. Ehrenstorfer	230
Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)propiónico	Chem Service	230
Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico	Dr. Ehrenstorfer	230
Ácido 2-fenoxipropiónico	Chem Service	230
Ácido 4-(2-metil-4-clorofenoxi)butírico	Dr. Ehrenstorfer	230
Ácido (2,4,5-triclorofenoxi)acético	Dr. Ehrenstorfer	230
Ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propiónico	Chem Service	230
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS		
Antraceno	Panreac Química, S.A.	254
Benceno	Probus (grado reactivo)	254
Bifenilo	Scharlab, S.L. (para síntesis)	254
Naftaleno	Scharlab, S.L. (para síntesis)	254
Pireno	Scharlab, S.L. (puro)	254
Tolueno	Scharlab, S.L. (purísimo)	254
OTROS PLAGUICIDAS		
Benfuracarb	Dr. Ehrenstorfer	220
Benomilo	Dr. Ehrenstorfer	220
Bromopropilato	Dr. Ehrenstorfer	220
Buprofezin	Dr. Ehrenstorfer	220
Carbarilo	Dr. Ehrenstorfer	220
Carbendazim	Dr. Ehrenstorfer	220
Clorpirifós	Dr. Ehrenstorfer	220
Diazinón	Dr. Ehrenstorfer	220
Diclorán	Dr. Ehrenstorfer	220
Dicofol	Dr. Ehrenstorfer	220
Dimetoato	Dr. Ehrenstorfer	220
Fentión	Dr. Ehrenstorfer	220
Hexitiazox	Dr. Ehrenstorfer	220
Imazalil	Dr. Ehrenstorfer	220
Malatión	Dr. Ehrenstorfer	220
Metalaxil	Dr. Ehrenstorfer	220
Metidatión	Dr. Ehrenstorfer	220
Metilpirimifós	Dr. Ehrenstorfer	220
Pirimecarb	Dr. Ehrenstorfer	220
Procloraz	Dr. Ehrenstorfer	220
Propargite	Dr. Ehrenstorfer	220
Tetradifón	Dr. Ehrenstorfer	220
Tiabendazol	Dr. Ehrenstorfer	220
Triclopir	Dr. Ehrenstorfer	220
OTROS COMPUESTOS ORGÁNICOS		
Acetato de etilo	Panreac Química, S.A. (para análisis)	254
Antipirina	Panreac Química, S.A.	254
Cafeína	Guinama, S.L.	254
Progesterona	Laboratorio Seid, S.A. ^b	254
Teofilina anhidra	Guinama, S.L.	254

^a Localización de los distribuidores comerciales (ver página siguiente). ^b Cedido por gentileza del laboratorio farmacéutico mencionado. ^c Capítulo VI. ^d Capítulos V y VII. ^e Disoluciones patrón en acetonitrilo (10 ng μL^{-1}).

Localización de los distribuidores comerciales:

- Abbott Laboratories, S.A. (Madrid, España).
- Acros Organics (Geel, Bélgica).
- Aldrich (Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.).
- Almirall Prodesfarma, S.A. (Barcelona, España).
- AstraZeneca Farmaceutica Spain, S.A. (Madrid, España).
- Aventis Pharma, S.A., (Madrid, España).
- B. Braun Medical Inc. (Barcelona, España).
- Boehringer Ingelheim España, S.A. (Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España).
- Boots Healthcare Iberia (Madrid, España).
- Chem Service (West Chester, Pennsylvania, EE.UU).
- Doesder (Barcelona, España).
- Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania).
- Faes Farma (Bilbao, Vizcaya, España).
- Fluka (Butch, Suiza).
- GlaxoSmithKline (Tres Cantos, Madrid, España).
- Grupo Farmasierra, S.A. (San Sebastián de los Reyes, Madrid, España).
- Grupo Ferrer (Barcelona, España).
- Grupo Reig Jofre (Barcelona, España).
- Guinama, S.L. (Valencia, España).
- ICI-Farma (Fogarts de la Serra, Barcelona, España).
- Janssen Pharmaceutica (Beerse, Bélgica).
- Knoll, S.A. (Madrid, Madrid, España).
- Laboratorio Estedi, S.L. (Barcelona, España).
- Laboratorio Seid, S.A. (Lliça de Vall, Barcelona, España).
- Laboratorios Alter, S.A. (Madrid, España).
- Laboratorios Fher, S.A. (Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España).
- Laboratorios Inibsa, S.A. (Lliça de Vall, Barcelona, España).
- Laboratorios Llorens, S.A. (Barcelona, España).
- Laboratorios Servier, S.A. (Madrid, España).
- Lilly, S.A. (Alcobendas, Madrid, España).
- Lundbeck España, S.A. (Barcelona, España).
- Merck Sharp & Dohme de España, S.A. (Barcelona, España).
- Novartis Farmacéutica, S.A. (Barcelona, España).
- Organon Española, (Cornella de Llobregat, Barcelona, España).
- Panreac Química, S.A. (Montcada i Reixac, Barcelona, España).
- Pharmacia Spain (Alcobendas, Madrid, España).
- Probus (Badalona, España).
- Química Farmacéutica Bayer, S.A. (Barcelona, España).
- Roche Farma, S.A. (Madrid, España).
- Rubió, S.A. (Castellbisbal, Barcelona, España).
- Sanofi Synthelabo (Barcelona, España).
- Scharlab, S.L. (La Jota, Barcelona, España).
- Sigma (St. Louis, Missouri, EE.UU.).
- UCB Pharma, S.A. (Molins del Rei, Barcelona, España).
- Wyeth Farma, S.A. (San Sebastián de los Reyes, Madrid, España).

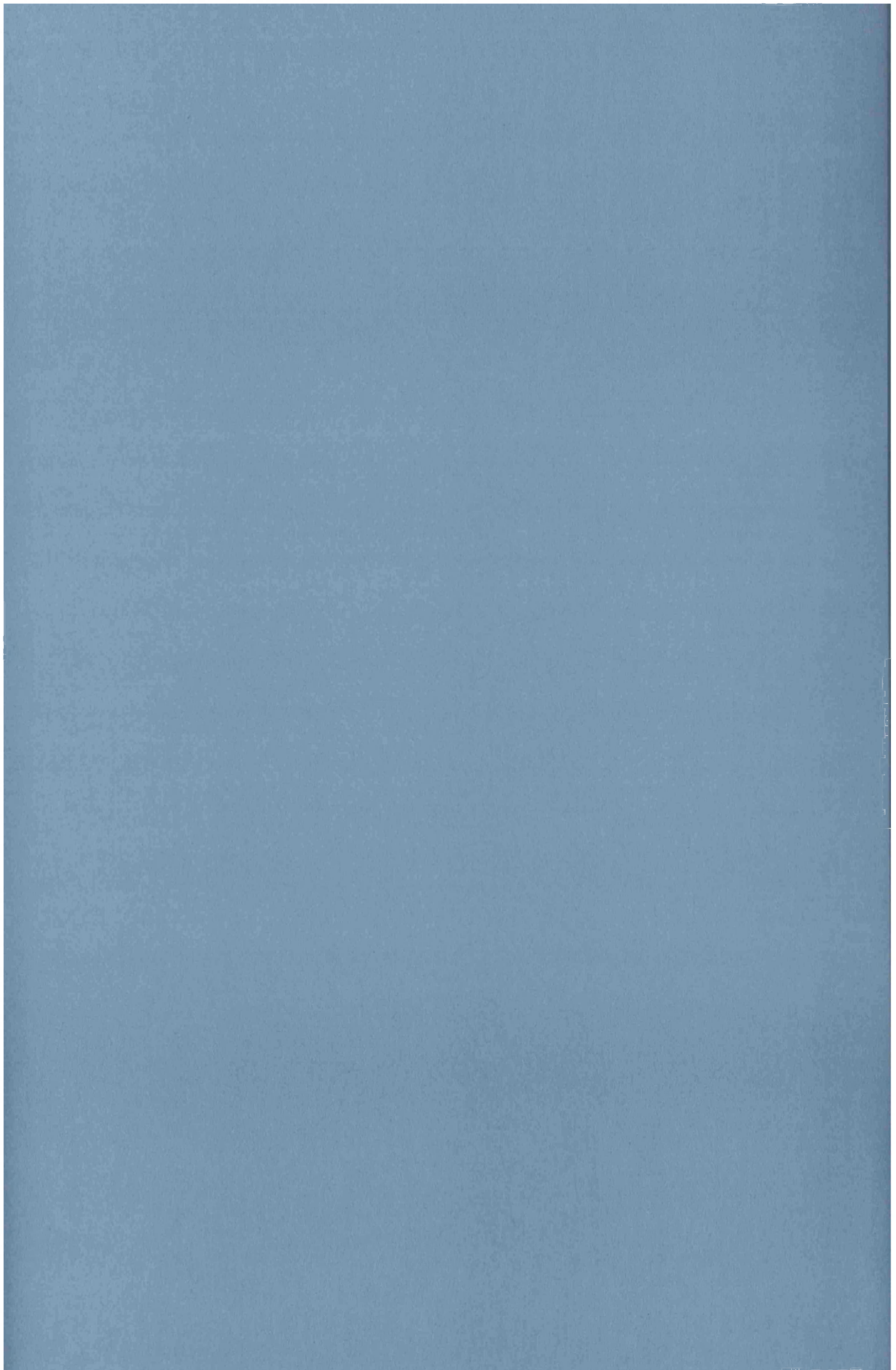
CAPÍTULO IV

Relaciones Cuantitativas Retención-Hidrofobicidad en Cromatografía Líquida Micelar

I.- Compuestos Neutros

IV.1.- Introducción	101
IV.2.- Experimental y metodología	103
IV.2.1.- Experimental	103
IV.2.2.- Datos	104
IV.2.3.- Procedimiento	104
IV.2.4.- Capacidad de descripción y predicción de los modelos	105
IV.3.- Resultados y discusión	111
IV.3.1.- Modelos para la predicción de $\log P$ para diferentes series de compuestos	111
IV.3.2.- Modelos para la predicción de $\log P$ de nuevos compuestos a partir de una serie de calibración independiente	120
IV.4.-Conclusiones	124





IV.1.- Introducción

Tal y como se ha comentado en el apartado I.2, el fundamento de las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSARs) reside en la relación existente entre la actividad biológica de la mayoría de compuestos orgánicos y sus propiedades físico-químicas y/o descriptores estructurales. Entre dichas propiedades físico-químicas, la hidrofobicidad de solutos ha mostrado ser de especial relevancia, por lo que su cuantificación resulta de gran interés (*Hansch C., 1971; 1979; 1990-a; Goldberg L.; 1983*). La hidrofobicidad de los compuestos se cuantifica normalmente por el logaritmo de sus relaciones de reparto en el sistema bifásico *n*-octanol/agua ($\log P$) (*Hansch C. y col., 1962; 1996*). La extracción líquido-líquido es el método convencional para la medida experimental de $\log P$ pero presenta varios inconvenientes como se ha comentado en el apartado I.3.1 (*OECD, 1995; Danielsson L.G. y col., 1996*).

Puesto que la retención de un compuesto en cromatografía líquida en fase inversa (RP-HPLC) está gobernada por las interacciones hidrófobas de los solutos con el sistema cromatográfico, se ha realizado un gran esfuerzo para establecer correlaciones entre los valores de $\log P$ y diferentes parámetros de retención obtenidos en RP-HPLC, lo que conforma un tipo de las denominadas relaciones cuantitativas estructura-retención (QSRRs). Aunque esta área QSRR ha recibido mucha atención, la determinación de $\log P$ a partir de la retención cromatográfica presenta algunos problemas (apartado I.4.2). Por ejemplo, las estimaciones de la hidrofobicidad dependen de la composición de la fase móvil y de la naturaleza de la fase estacionaria, y para fases estacionarias alquil-silano se observan relaciones diferentes para diferentes grupos de compuestos congéneres, debido en gran medida a la presencia de grupos silanol libres en la fase estacionaria (*Nasal A. y col., 2003; Poole S.K y col., 2003-a; Valkó K., 2004*).

El uso de fases móviles micelares en RP-HPLC en lugar de las fases móviles hidro-orgánicas tradicionales presenta varias ventajas para la cuantificación de la hidrofobicidad de compuestos (apartado I.4.3.1), entre las que cabe destacar la existencia de modelos de retención fiables que se han verificado experimentalmente y mostrado su utilidad para una amplia variedad de compuestos (apolares, polares o iónicos con fases móviles a pH constante) y surfactantes (iónicos y no iónicos) (*Medina-Hernández M.J. y col., 1992; Jiménez O. y col., 1987*). De hecho, se puede deducir la retención de un compuesto en cromatografía líquida micelar (MLC) en función de la concentración micelar a partir de la expresión (*Armstrong D.W. y col., 1981; Arunyanart M. y col., 1984*):

$$k = \frac{k_m}{1 + K_{AM}[M]} \quad (\text{IV.1})$$

donde k es el factor de retención; $[M]$ es la concentración total de surfactante en la fase móvil menos la concentración micelar crítica, CMC; K_{AM} es la constante de asociación soluto-micela y k_m es el factor de retención para una concentración de surfactante igual a la CMC.

Varios investigadores han propuesto el uso de MLC para la obtención de relaciones retención-hidrofobicidad (*Gago F. y col., 1987; Lavine B.K. y col., 1991; González V. y col., 1992; García M.A. y col., 1994; Medina-Hernández M.J. y col., 1995-a; 1995-b; Marina M.L. y col., 1995; Rapado-Martínez I. y col., 1997; Benito I. y col., 1998; Beleña-Pozo I. y col., 1999; Gil-Agustí M. y col., 2000; Destroyer A. y col., 2001; 2003*). Sin embargo, existen discrepancias acerca de qué parámetro, k o $\log k$, proporciona mejores correlaciones lineales con $\log P$, ya que los intentos por encontrar modelos lineales $\log k - \log P$ han fallado en ocasiones debido a que estas relaciones en realidad presentan una naturaleza no lineal (*Khaledi M.G. y col., 1989; García M.A. y col., 1994; Medina-Hernández M.J. y col., 1995-b; Benito I. y col., 1998*).

Medina-Hernández y col. (*Medina-Hernández M.J. y col., 1995-b*) observaron que era posible establecer empíricamente un modelo (ecuación IV.2) para describir la dependencia entre $\log k$ en MLC y $\log P$ para un conjunto de compuestos neutros y que dicho modelo era capaz de explicar las discrepancias existentes en la bibliografía:

$$\log k = a_0 + a_1 \log P - \log(1 + [M] 10^{(b_0 + b_1 \log P)}) \quad (\text{IV.2})$$

Los parámetros de ajuste a_0 , a_1 , b_0 y b_1 se determinaron a partir de los valores de k_m y K_{AM} de cada compuesto y su ajuste a dos modelos lineales:

$$\log k_m = a_0 + a_1 \log P \quad (\text{IV.3})$$

$$\log K_{AM} = b_0 + b_1 \log P \quad (\text{IV.4})$$

El problema de esta estrategia reside en que la estimación de k_m y K_{AM} requiere mucho trabajo experimental, ya que dichos valores se estiman mediante el ajuste de los valores de k obtenidos con diversas fases móviles micelares (al menos 5 concentraciones diferentes de surfactante) a la ecuación IV.1 o a dos opciones de linealización de dicha ecuación:

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_m} + \frac{K_{AM}}{k_m} [M] \quad (\text{IV.5})$$

$$k = k_m - K_{AM} k [M] \quad (\text{IV.6})$$

Otro inconveniente a destacar asociado a la estimación de los valores de k_m y K_{AM} , es que dichas estimaciones pueden ser poco fiables e imprecisas, especialmente para compuestos de hidrofobicidad media o elevada debido a que las ecuaciones IV.5 y IV.6 son muy sensibles a la imprecisión de las medidas de k (*Argilés F. y col., 1997*).

En este Capítulo se estudia la validez del modelo representado en la ecuación IV.2 y se desarrolla un algoritmo que permite obtener los parámetros de ajuste de la ecuación IV.2 sin estimación previa sus valores de $\log k_m$ y $\log K_{AM}$. Para ello se utilizaron los datos ($\log P$, $\log k$) de diversos conjuntos de compuestos neutros, eluidos con diferentes fases móviles micelares puras e híbridas y fases estacionarias alquil-silano. Una vez obtenidos los modelos, se utilizaron para

realizar predicciones de $\log P$ empleando un método iterativo. Se realizó un estudio comparativo de la capacidad de descripción y predicción de los modelos obtenidos con la de otros modelos obtenidos por métodos de regresión convencionales lineales o polinómicos. Finalmente, los valores predichos de $\log P$ con la estrategia propuesta se compararon con los obtenidos utilizando programas informáticos de estimación de $\log P$.

IV.2.- Experimental y metodología

IV.2.1.- Experimental

La preparación de las fases móviles y de las disoluciones de los analitos, así como la longitud de onda de detección se indican en el Capítulo III. En el presente apartado sólo se enumeran detalles concretos no especificados en dicho Capítulo:

- **Fases móviles ensayadas:** Brij35 0.02M, 0.04M y 0.06M ajustadas a pH 7. También se han utilizado datos de retención tomados de la bibliografía y obtenidos con otras fases móviles micelares (apartado IV.2.2).
- **Fase estacionaria:** Kromasil C₁₈ ($d_p = 5\mu\text{m}$; $L = 150\text{ mm}$; $d_c = 4.6\text{ mm}$) (Scharlab S.L., La Jota, Barcelona, España).
- **Configuración del cromatógrafo:**
 - Sistema de inyección: válvula de inyección manual Rheodyne (Cotati, California, EE.UU.) con un bucle de 20 μL .
 - Equipo sin compartimento termostatzado para columnas. Las experiencias se realizaron a temperatura ambiente.
 - Flujo de la fase móvil: 1 mL min^{-1} .
 - ChemStation HP (versión A0402, 1996).
- **Cálculo de los factores de retención:** para el cálculo de los factores de retención se utilizó la ecuación III.1. El "tiempo total básico" (t_M^0) se estimó a partir de la primera perturbación que aparece en el cromatograma.

IV.2.2.- Datos

Los datos cromatográficos y los valores de $\log P$ para las series de compuestos mostrados en las Tablas IV.1 – IV.3, series 1 – 14, se obtuvieron de la bibliografía (*Gago F. y col., 1987; Khaledi M.G. y col.; 1989; Foley J.P.; 1990; Medina-Hernández M.J. y col., 1995-b; Cuenca-Benito M. y col., 1998*).

Adicionalmente, se obtuvieron los factores de retención de una serie de fenilureas, (series 15 – 17; Tabla IV.4) y un grupo de siete compuestos que conforman el conjunto de calibración (series 18 – 20; Tabla IV.5) en las condiciones experimentales indicadas en el apartado anterior. Los valores experimentales de $\log P$ del conjunto de calibración y fenilureas (Tablas IV.8 y IV.9) se tomaron de diversas fuentes bibliográficas. Los valores calculados de $\log P$ para fenilureas se obtuvieron mediante programas informáticos que se indican en la Tabla IV.9.

IV.2.3.- Procedimiento

Se desarrolló el algoritmo denominado *s-logP* según los pasos siguientes:

Paso 1.- Construcción de los modelos $\log k - \log P$: se utilizó un algoritmo de búsqueda simplex para obtener los parámetros de ajuste a_0 , a_1 , b_0 y b_1 de la ecuación IV.2, a partir de una serie de n pares de datos ($\log P$, $\log k$).

Paso 2.- Predicción de $\log P$ a partir de valores nuevos de $\log k$: la ecuación IV.2 se reescribió en la siguiente forma:

$$\log P = \frac{\log k - a_0 + \log(1 + [M]10^{(b_0 + b_1 \log P)})}{a_1} \quad (\text{IV.7})$$

Se introdujo como semilla un valor inicial de $\log P = 2.5$ y se realizaron iteraciones hasta que los valores de $\log P$ convergieron (diferencia de $\log P = 1 \times 10^{-6}$).

IV.2.4.- Capacidad de descripción y predicción de los modelos

La capacidad de descripción y predicción de los modelos se evaluó mediante los siguientes parámetros:

- *RMSEC* ("root-mean-square error of calibration"): este parámetro, tal y como se ha comentado en el apartado III.5, ecuación III.5, proporciona información acerca del error de ajuste del modelo a los datos.
- *RMSECV_i* ("root-mean-square error of calibration for interpolated data"): el parámetro estadístico *RMSECV_i* da información acerca del error en predicción del modelo basado en la técnica de validación cruzada "leave-one-out cross-validation" para datos interpolados (apartado III.5). Se utilizó este parámetro y esta técnica de validación ya que las series estudiadas son "series cortas de datos" y la extrapolación puede ser inapropiada, o por lo menos poco fiable, para estas series. Para la obtención del parámetro *RMSECV_i* se utilizó la ecuación III.6 tras excluir los dos datos extremos, previamente ordenados según sus valores de $\log k$.

Cabe esperar que nuevas moléculas similares a los compuestos usados para la calibración del modelo, no se comporten como anómalos. Por tanto, la capacidad de predicción del modelo debe estar bien definida por el parámetro *RMSECV_i*.

Tabla IV.1.- Valores de los logaritmos de las relaciones de reparto *n*-octanol/agua y de los factores de retención de los compuestos de las series 1-5.

Compuesto ^a	log <i>P</i> ^b	log <i>k</i> ^c				
		Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4	Serie 5
Acetofenona	1.58	1.25	1.01	0.82	1.15	0.94
Alcohol bencílico	1.10	1.03	0.85	0.70	0.71	0.58
Anisol	2.11	1.56	1.22	0.99	1.48	1.18
Benceno	2.13	1.53	1.23	1.02	1.46	1.19
Benzaldehido	1.48	1.22	1.04	0.83	1.06	0.89
Benzonitrilo	1.56	1.24	1.01	0.83	1.13	0.93
Bromobenceno	2.99	1.91	1.43	1.16	1.83	1.38
Metilbenzoato	2.12	1.57	1.22	0.98	1.48	1.17
Nitrobenceno	1.85	1.43	1.14	0.93	1.37	1.08
Tolueno	2.69	1.81	1.39	1.14	1.76	1.38

^a Las estructuras de los compuestos se muestran en el Anexo II (apartado XII.2.11).

^b Tomados de *Medina-Hernández M.J. y col., 1995-b*.

^c Condiciones cromatográficas bajo las que se han obtenido los valores de log *k* para cada una de las series (*Gago F. y col., 1987*):

Serie 1: CTAB 0.016 M; Hypersil C₁₈; T = 25 °C.

Serie 2: CTAB 0.05 M; Hypersil C₁₈; T = 25 °C.

Serie 3: CTAB 0.1 M; Hypersil C₁₈; T = 25 °C.

Serie 4: Brij35 0.016 M; Hypersil C₁₈; T = 25 °C.

Serie 5: Brij35 0.05 M; Hypersil C₁₈; T = 25 °C.

Tabla IV.2.- Valores de los logaritmos de las relaciones de reparto *n*-octanol/agua y de los factores de retención de los compuestos de las series 6-9.

Compuesto ^a	log <i>P</i> ^b	log <i>k</i> ^c			
		Serie 6	Serie 7 ^d	Serie 8 ^d	Serie 9
Acetanilida	1.16	0.76	-	-	-
Acetofenona	1.58	1.21	0.89	0.96	-
Alcohol bencílico	1.10	0.89	0.59	0.81	-
Antraceno	4.54	-	1.73	1.41	1.28
Benceno	2.13	1.27	1.23	1.12	0.91
Bencilamina	1.49	1.14	-	-	-
Benzaldehido	1.48	1.08	0.86	0.93	-
Benzonitrilo	1.56	1.11	0.85	1.05	-
Bifenilo	3.97	-	-	-	1.25
1-Bromonaftaleno	4.23	-	-	-	1.26
Butirofenona	2.65	1.56	1.26	1.32	-
Clorobenceno	2.84	-	1.42	1.25	-
Hexanofenona	3.58	1.86	-	-	-
1-Metilnafteleno	3.93	-	-	-	1.24
Naftaleno	3.37	-	1.52	1.30	1.15
Nitrobenceno	1.85	1.17	0.99	1.05	-
Pireno	4.55	-	-	-	1.31
Propiofenona	2.19	1.38	1.09	1.17	-
Tolueno	2.69	-	-	-	1.09
Valerofenona	3.11	1.72	-	-	-
<i>p</i> -Xileno	3.13	-	-	-	1.21

^a Las estructuras de los compuestos se muestran en el Anexo II (apartados XII.2.11, XII.2.17 y XII.2.19).

^b Tomados de *Medina-Hernández y col., 1995-b*.

^c Condiciones cromatográficas bajo las que se han obtenido los valores de log *k* para cada una de las series (*Khaledi M.G. y col., 1989; Foley J.P., 1990; Medina-Hernández M.J. y col., 1995-b*):

Serie 6: SDS 0.1 M; Rainin C₁₈; T = 31 °C.

Serie 7: SDS 0.12 M + 3 % 2-propanol; Altex C₁₈; T = 25 °C.

Serie 8: CTAB 0.12 M + 3 % 2-propanol; Altex C₈; T = 25 °C.

Serie 9: SDS 0.1 M; Waters C₁₈; T = 25 °C.

^d Las series 7bis y 8bis son idénticas a las series 7 y 8, respectivamente, pero no contienen los datos de butirofenona.



Tabla IV.3.- Valores de los logaritmos de las relaciones de reparto *n*-octanol/agua y de los factores de retención de las formas no ionizadas de los barbitúricos, series 10-14.

Compuesto ^a	log <i>P</i> ^b	log <i>k</i> ^c				
		Serie 10	Serie 11	Serie 12	Serie 13	Serie 14
Alobarbital	1.17	0.83	1.03	0.93	0.76	0.74
Aprobarbital	1.27	0.93	1.13	1.02	0.92	0.84
Barbital	0.68	0.57	0.57	0.57	0.53	0.44
Bralobarbital	1.37	0.91	1.27	1.11	0.76	0.90
Butabarbital	1.56	1.03	1.24	1.10	0.99	0.92
Butalbital	1.70	1.07	1.36	1.23	0.99	0.97
Butetal	1.65	1.05	1.28	1.13	1.03	0.94
Fenobarbital	1.42	0.94	1.29	1.11	0.86	0.97
Pentobarbital	2.07	1.24	1.72	1.46	1.32	1.21
Secobarbital	1.97	1.23	1.61	1.46	1.24	1.13

^a Las estructuras de los compuestos se muestran en el Anexo II (apartado XII.2.7).

^b Tomados de *Cuenca-Benito M. y col., 1998*.

^c Condiciones cromatográficas bajo las que se han obtenido los valores de log *k* para cada una de las series (*Cuenca-Benito M. y col., 1998*):

Serie 10: SDS 0.15 M (pH 3.5); Kromasil C₁₈; temperatura ambiente.

Serie 11: Brij35 0.02 M (pH 3.5); Kromasil C₁₈; temperatura ambiente.

Serie 12: Brij35 0.04 M (pH 3.5); Kromasil C₁₈; temperatura ambiente.

Serie 13: Brij35 0.06 M (pH 3.5); Kromasil C₁₈; temperatura ambiente.

Serie 14: CTAB 0.05 M (pH 3.5); Kromasil C₁₈; temperatura ambiente.

Tabla IV.4.- Valores de los logaritmos de las relaciones de reparto *n*-octanol/agua y de los factores de retención de fenilureas, series 15-17.

Compuesto ^a	log <i>P</i> ^b	log <i>k</i> ^c		
		Serie 15	Serie 16	Serie 17
Buturón	3.00	2.11	1.79	1.64
Clorbromurón	3.09	1.98	1.68	1.51
Clorotolurón	2.41	1.75	1.50	1.33
Diurón	2.68	1.84	1.57	1.40
Fenurón	0.98	0.94	0.85	0.77
Fluometurón	2.42	1.81	1.55	1.38
Metoxurón	1.64	1.42	1.21	1.07
Monolinurón	2.30	1.80	1.55	1.37
Monurón	1.94	1.59	1.38	1.21
Neburón	4.10	-	1.99	1.81

^a Las estructuras de los compuestos se muestran en el Anexo II (apartado XII.2.14).

^b *PHYSPROP Database* (Tabla IV.9).

^c Condiciones cromatográficas bajo las que se han obtenido los valores de log *k* para cada una de las series:

Serie 15: Brij35 0.02 M (pH 7); Kromasil C₁₈; temperatura ambiente.

Serie 16: Brij35 0.04 M (pH 7); Kromasil C₁₈; temperatura ambiente.

Serie 17: Brij35 0.06 M (pH 7); Kromasil C₁₈; temperatura ambiente.

Tabla IV.5.- Valores de los logaritmos de las relaciones de reparto *n*-octanol/agua y los factores de retención de los compuestos del conjunto de calibración, series 18-20.

Compuesto ^a	log <i>P</i> ^b	log <i>k</i> ^c		
		Serie 18	Serie 19	Serie 20
Acetanilida	1.21	1.12	0.98	0.88
Acetofenona	1.6633	1.42	1.28	1.17
Bifenilo	4.063	2.29	1.97	1.80
Bromobenceno	2.99	2.11	1.81	1.65
Cafeína	-0.02	0.24	0.21	0.19
Naftaleno	3.347	2.17	1.86	1.70
Antraceno	4.54	2.31	2.00	1.84

^a Las estructuras de los compuestos se muestran en el Anexo II (apartados XII.2.11, XII.2.17 y XII.2.19).

^b Base de datos de valores de log*P* experimentales del programa informático Scilog*P* (versión 1.5 de demostración, SciVision Inc., 1994) (Tabla IV.8).

^c Condiciones cromatográficas bajo las que se han obtenido los valores de log*k* para cada una de las series:

Serie 18: Brij35 0.02 M (pH 7); Kromasil C₁₈; temperatura ambiente.

Serie 19: Brij35 0.04 M (pH 7); Kromasil C₁₈; temperatura ambiente.

Serie 20: Brij35 0.06 M (pH 7); Kromasil C₁₈; temperatura ambiente.

IV.3.- Resultados y discusión

Generalmente, en las relaciones cuantitativas estructura-retención (QSRR) utilizadas para la estimación de la hidrofobicidad de moléculas neutras ($\log P$), esta propiedad físico-química se utiliza como variable independiente y $\log k$ como única variable dependiente en los casos más sencillos ($\log k = f(\log P)$). En otros métodos indirectos para la estimación de $\log P$, como por ejemplo los basados en las relaciones lineales de la energía de solvatación (LSERs, apartado I.3.2), $\log P$ se utiliza como variable dependiente y otros 5 descriptores estructurales de los solutos se utilizan como variables independientes. Sin embargo, cuando se dispone de "series cortas de datos", como es el caso de este Capítulo, los modelos univariantes son estadísticamente más consistentes que los que utilizan diversos descriptores moleculares y regresión lineal múltiple (MLR) (*Molero-Monfort M. y col., 1999; Ferreira M.M.C., 2002*). En este Capítulo, se considera el uso de la retención ($\log k$, en MLC) como única variable independiente para la estimación de $\log P$ de compuestos neutros.

IV.3.1.- Modelos para la predicción de $\log P$ para diferentes series de compuestos

En la Figura IV.1 se muestran, a modo de ejemplo, los gráficos $\log k$ vs. $\log P$ para algunas de las series de compuestos estudiadas. Tal y como se puede observar, los datos experimentales (O) muestran claramente la naturaleza no lineal de esta relación. Tan sólo los datos que cubren un intervalo estrecho de valores de $\log P$, Figura IV.1.C, muestran una aparente relación lineal (*García M.A. y col., 1994; Medina-Hernández M.J. y col., 1995-b*). En la Figura IV.1 se muestra el ajuste del modelo proporcionado por el algoritmo *s-logP* cuando se ejecuta el paso 1. Como puede observarse, el algoritmo es capaz de describir la curvatura observada para cada una de las series de datos. Además, el algoritmo permite el ajuste de los parámetros de la ecuación IV.2 a partir de los datos experimentales de $\log k$ obtenidos para diferentes concentraciones de surfactante (p. ej., Figuras IV.1.A y IV.1.D).

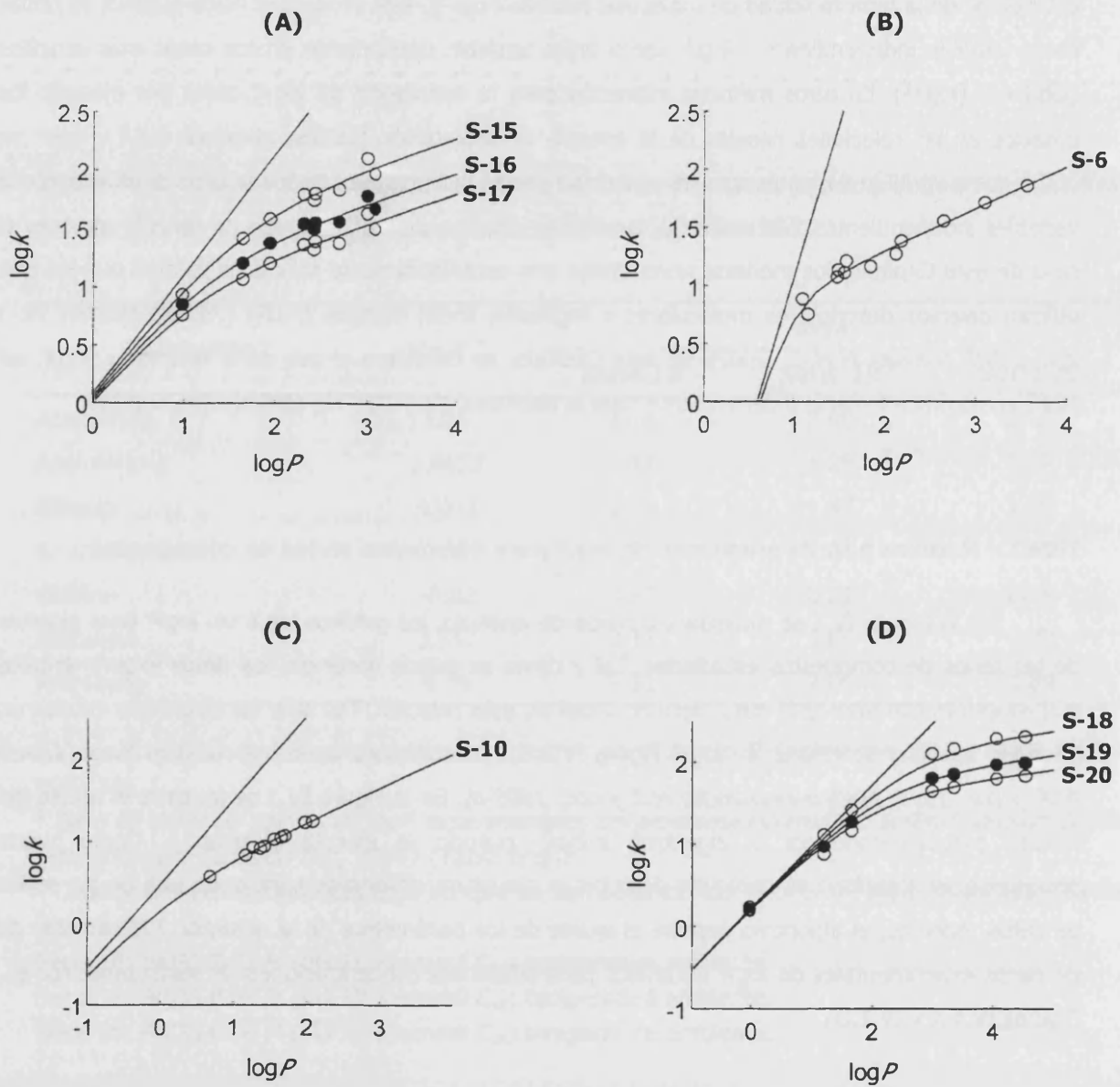


Figura IV.1.- Relaciones $\log k$ - $\log P$ para algunas de las series estudiadas: **(A)** series 15, 16 y 17, **(B)** serie 6, **(C)** serie 10, **(D)** series 18, 19 y 20. Los círculos representan en todos los casos los valores experimentales. Las líneas curvas continuas representan el ajuste de la ecuación IV.2 para cada serie obtenida con el algoritmo s - $\log P$. Las líneas rectas continuas representan las relaciones entre los valores de $\log k_m$ estimados por los modelos y los valores de $\log P$.

La línea recta continua que aparece en la parte superior de los gráficos de la Figura IV.1 corresponde a la curva extrapolada a una concentración de surfactante igual a la CMC, que coincide con la relación de $\log k_m - \log P$. Esto significa que con el algoritmo *s-logP* también es posible estimar los parámetros k_m y K_{AM} de compuestos neutros, a partir incluso de datos de $\log k$ obtenidos con una sola concentración de surfactante. Esto podría resultar de gran interés ya que los modelos existentes en la actualidad (ecuaciones IV.1, IV.5 y IV.6) requieren la obtención de los valores de $\log k$ para cada uno de los compuestos con diferentes fases móviles, al menos 5 concentraciones diferentes de surfactante y aún así se observan dificultades para la estimación de los compuestos con valores de $\log k$ extremos, especialmente para los más retenidos (Argilés F. y col., 1997).

Con el modelo de la ecuación IV.2 probablemente se obtendrán estimaciones de k_m y K_{AM} más razonables para los compuestos más hidrófobos de las series, que las obtenidas con los otros modelos matemáticos. Para comprobar, en parte, la validez de esta afirmación se estimaron los valores de k_m y K_{AM} de fenilureas a partir de los valores de $\log k$ de las series 15-17 haciendo uso de las ecuaciones IV.5 y IV.6, aunque cabe recordar que el uso de 3 fases móviles no es una situación idónea para la realización de estas estimaciones. Los resultados obtenidos se compararon con los estimados con las ecuaciones IV.3 y IV.4 sustituyendo en ellos los valores de los parámetros de ajuste obtenidos con el algoritmo *s-logP* para cada una de las series individuales y también utilizando los datos conjuntos de las tres series.

En la Figura IV.2 se representan, a modo de ejemplo, los gráficos de validación para las estimaciones de $\log k_m$ y $\log K_{AM}$ obtenidos para la serie 17 (Figura IV.2.A y Figura IV.2.B, respectivamente) y para el caso en el que se han incluido los datos de las tres series (Figuras IV.2.C-D). Como valores de referencia en el eje de abscisas se han tomado las estimaciones obtenidas con la ecuación IV.5 que es la habitualmente empleada. El compuesto neburón no se ha incluido en este estudio ya que sólo se disponen de los valores de $\log k$ para dos fases móviles. También se ha excluido el compuesto buturón ya que los valores de k_m y K_{AM} derivados de las ecuaciones IV.5 y IV.6 eran inconsistentes entre sí. Tal y como se puede observar en la Figura IV.2, existe una buena concordancia entre los valores obtenidos con las diferentes estimaciones. De hecho, tal y como se muestra en la Tabla IV.6, los valores de las pendientes y de las ordenadas en el origen obtenidos fueron estadísticamente igual a 1 y 0, respectivamente. No obstante, la validación de esta aplicación del algoritmo *s-logP* requiere una atención mayor. Además, cabe recordar que sólo es aplicable a compuestos neutros y requiere de la construcción del modelo de la ecuación IV.2 para varios analitos.

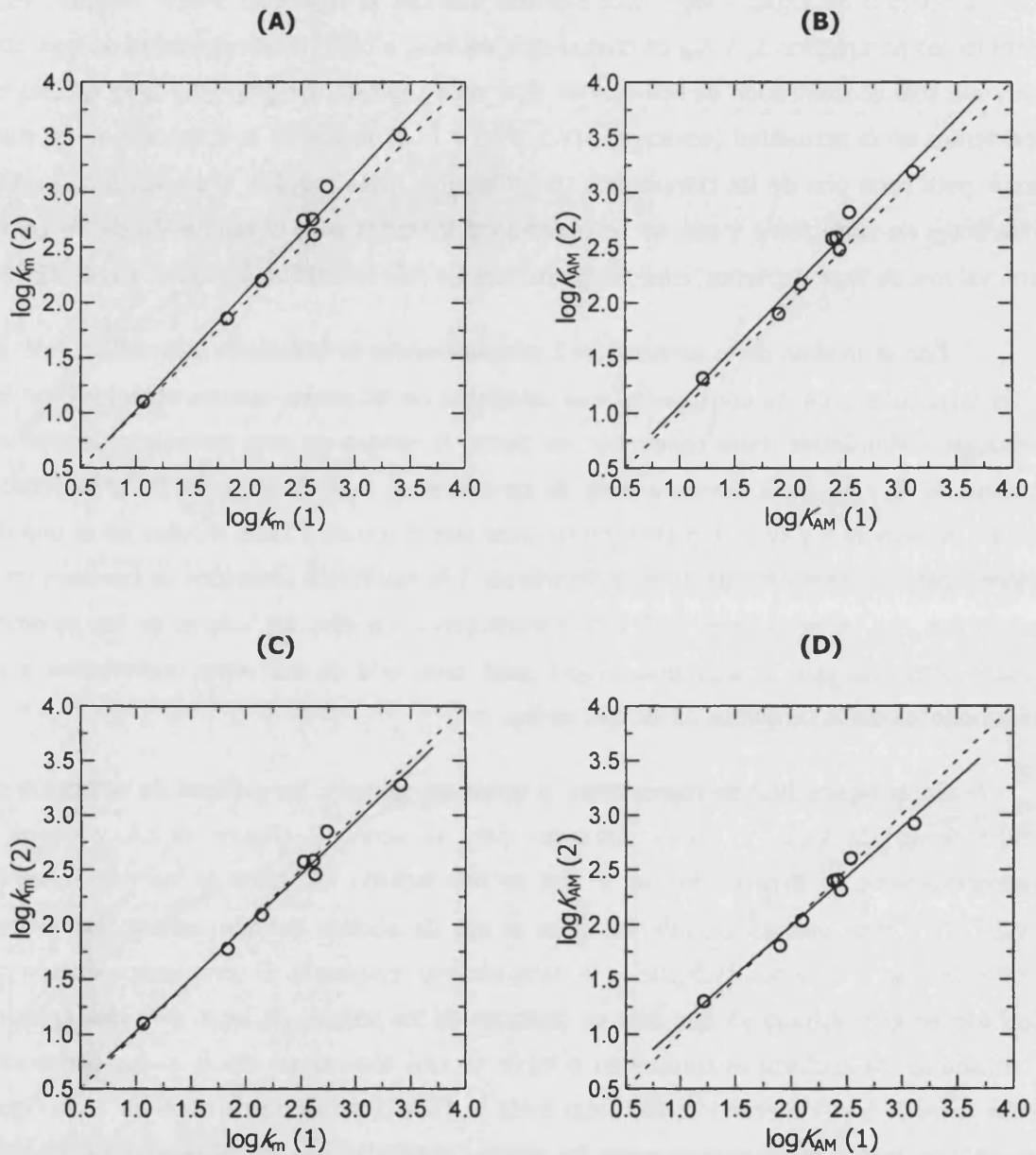


Figura IV.2.- Gráficos de validación de los valores predichos con el algoritmo *s-logP* ($\log k_m(2)$ y $\log K_{AM}(2)$) frente a los estimados con la ecuación IV.5 ($\log k_m(1)$ y $\log K_{AM}(1)$) para las series de fenilureas. **(A)** y **(B)** Valores predichos utilizando los datos de la serie 17, **(C)** y **(D)** valores predichos utilizando los datos de la series 15 – 17. Recta ajustada (—) y recta teórica de pendiente 1 y ordenada 0 (- - - - -). Los valores de K_{AM} están expresados en M^{-1} .

Tabla IV.6.- Análisis estadístico de las relaciones existentes entre los valores de $\log k_m$ o $\log k_{AM}$ estimados con el algoritmo $s\text{-log}P$ (y) y los estimados con la ecuación IV.5 (x) para un conjunto de 8 fenilureas ($y = c_0 + c_1 x$)^a.

Series	Variable	<i>n</i>	$c_0 \pm ts_{c_0}$ (<i>p</i>)	$c_1 \pm ts_{c_1}$ (<i>p</i>)	r^2 (r^2)	<i>F</i> (<i>p</i>)	$S_{y/x}$
17	$\log k_m$	8	0.0 ± 0.4 (0.7545)	1.07 ± 0.14 (< 0.0001)	0.98 (0.98)	325 (< 0.0001)	0.11
17	$\log k_{AM}$	8	0.0 ± 0.4 (0.8487)	1.04 ± 0.17 (< 0.0001)	0.97 (0.97)	225 (< 0.0001)	0.10
15-17	$\log k_m$	8	0.0 ± 0.3 (0.6354)	0.96 ± 0.13 (< 0.0001)	0.98 (0.98)	325 (< 0.0001)	0.10
15-17	$\log k_{AM}$	8	0.2 ± 0.3 (0.2273)	0.90 ± 0.15 (< 0.0001)	0.97 (0.97)	225 (< 0.0001)	0.09

^a Los detalles de los parámetros estadísticos se muestran en el apartado III.5.

Continuando con la ejecución del algoritmo $s\text{-log}P$, una vez obtenido el modelo $\log k - \log P$ para una serie de datos (paso 1), el paso 2 del algoritmo predice valores de $\log P$ a partir de valores nuevos de $\log k$. En este sentido, el algoritmo $s\text{-log}P$ es una alternativa a los modelos de regresión clásicos como los modelos polinómicos.

Una ventaja intrínseca de los modelos de regresión clásicos es que se puede obtener inferencia estadística del análisis de la regresión. Sin embargo, un inconveniente de estos modelos, sobre todo para "series cortas de datos", es que la selección del tipo de modelo y la significación de los coeficientes de la regresión dependen en gran medida de la amplitud del intervalo de $\log P$ y de la calidad de los valores experimentales de $\log k$ y/o datos de $\log P$. Por ejemplo, para los datos de 9 fenilureas (serie 15, Tabla IV.7), se encontró que un modelo lineal era el más apropiado desde el punto de vista estadístico (Figura IV.3), aunque la Figura IV.1.A sugiere una ligera curvatura en la relación $\log k - \log P$.

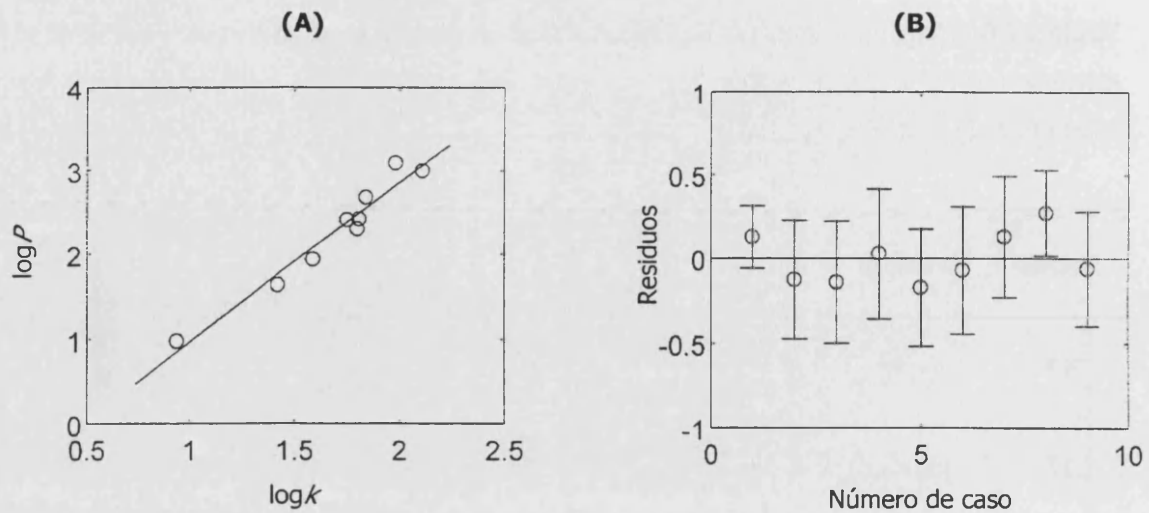


Figura IV.3. (A) Relación $\log P$ - $\log k$ para la serie 15 utilizando regresión clásica (tipo 5: $\log P = \alpha_0 + \alpha_1 \log k$). **(B)** Residuos con sus intervalos de confianza (para un nivel de confianza del 95%) para este modelo.

Para comparar el algoritmo $s\text{-}\log P$ con la regresión clásica, se evaluó su capacidad de predicción mediante el cálculo del error de ajuste ($RMSEC$) y el error en predicción basado en validación cruzada ($RMSECV_i$).

En la Tabla IV.7 se muestran los valores de $RMSEC$ y $RMSECV_i$ obtenidos para las 22 series mediante el algoritmo $s\text{-}\log P$ y los modelos de regresión clásicos. Las series 7bis y 8bis son las mismas que las 7 y 8, respectivamente, tras eliminar un punto (butirofenona) que mostraba una influencia alta ("*leverage*"). En la Tabla se indica el modelo de regresión clásica seleccionado en función de los estadísticos asociados a la regresión y, más particularmente, de la significación de los coeficientes a un nivel de confianza del 95% para cada una de las series. De este modo, se pueden encontrar hasta seis tipos de modelos de regresión. En la Tabla IV.7 se muestra el modelo de regresión que proporcionó los mejores resultados para cada una de las series.

En la Figura IV.4 se muestran los gráficos de barras para una visualización más rápida de los resultados. Tal y como se puede observar, salvo en el caso de la serie 13, los valores de $RMSEC$ obtenidos con el algoritmo $s\text{-}\log P$ son más bajos que los obtenidos con los modelos clásicos, lo que sugiere que la ecuación IV.2 describe mejor los datos experimentales. En cambio, el número de casos con un valor bajo de $RMSECV_i$ es similar para ambas estrategias. Esto implica que la capacidad de predicción del algoritmo $s\text{-}\log P$ es al menos similar a la de los modelos de regresión clásicos, pero con la ventaja adicional de que no es necesario adaptar el modelo a los datos disponibles.

Tabla IV.7.- Propiedades de predicción del algoritmo *s-logP* y los modelos clásicos de regresión para las diferentes series de compuestos estudiadas.

Serie	n	<i>s-logP</i>		Tipo ^a	Regresión clásica	
		RMSEC	RMSECVi		RMSEC	RMSECVi
1	10	0.035	0.051	2	0.042	0.049
2	10	0.045	0.063	4	0.069	0.078
3	10	0.059	0.062	4	0.075	0.086
4	10	0.039	0.058	3	0.050	0.047
5	10	0.080	0.118	3	0.099	0.136
6	12	0.112	0.140	3	0.119	0.132
7	11	0.121	0.181	3	0.147	0.164
7bis	10	0.091	0.151	2	0.182	0.189
8	11	0.218	0.332	4	0.356	0.300
8bis	10	0.090	0.130	1	0.116	0.147
9	9	0.232	0.362	4	0.287	0.363
10	10	0.040	0.055	5	0.042	0.049
11	10	0.085	0.104	6	0.087	0.108
12	10	0.078	0.091	3	0.093	0.096
13	10	0.106	0.126	6	0.104	0.112
14	10	0.088	0.116	3	0.092	0.101
15	9	0.133	0.149	5	0.142	0.182
16	10	0.138	0.198	4	0.158	0.179
17	10	0.163	0.234	5	0.188	0.195
18	7	0.045	0.093	4	0.267	0.298
19	7	0.054	0.108	4	0.250	0.269
20	7	0.058	0.103	4	0.237	0.266

^a Tipo de modelo de regresión clásico:

- (1) $\log P = \alpha_0 + \alpha_1 \log k + \alpha_2 (\log k)^2$
- (2) $\log P = \alpha_1 \log k + \alpha_2 (\log k)^2$
- (3) $\log P = \alpha_0 + \alpha_2 (\log k)^2$
- (4) $\log P = \alpha_2 (\log k)^2$
- (5) $\log P = \alpha_0 + \alpha_1 \log k$
- (6) $\log P = \alpha_1 \log k$

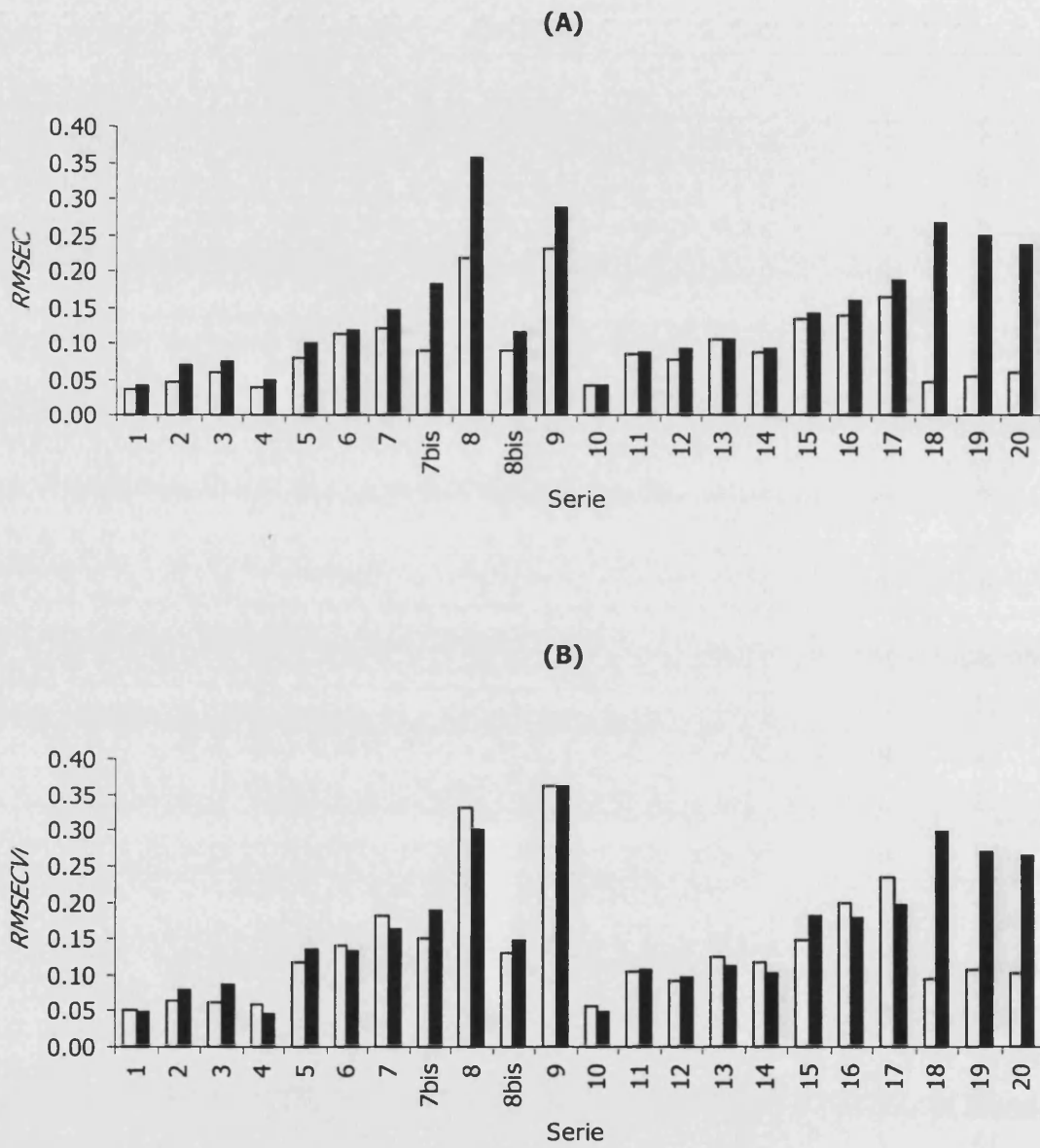


Figura IV.4.- Valores de los parámetros **(A)** *RMSEC* y **(B)** *RMSECVI* obtenidos para cada una de las series estudiadas. (□) Algoritmo *s-logP* y (■) regresión clásica.

En la Figura IV.5 se muestran los valores de $\log P$ de las fenilureas predichos tras el ajuste del modelo (O) y los predichos mediante validación cruzada (+) usando el algoritmo $s\text{-}\log P$ (Figura IV.5.A) y un modelo lineal (Figura IV.5.B), frente a los valores experimentales. En estos gráficos de validación se puede observar la capacidad de los valores de $\log k'$ para describir y predecir la hidrofobicidad de estas moléculas. Aunque en ambos casos, la concordancia tanto entre los valores predichos y experimentales como entre las predicciones realizadas con los modelos y las realizadas en las etapas de validación cruzada es adecuada (salvo para un compuesto en cada caso), los resultados de las dos estrategias son ligeramente diferentes. Los valores de $RMSEC$ y $RMSECV$ para el algoritmo $s\text{-}\log P$ fueron 0.133 y 0.149, respectivamente, un poco más bajos que los obtenidos con el modelo lineal (0.142 y 0.182, respectivamente).

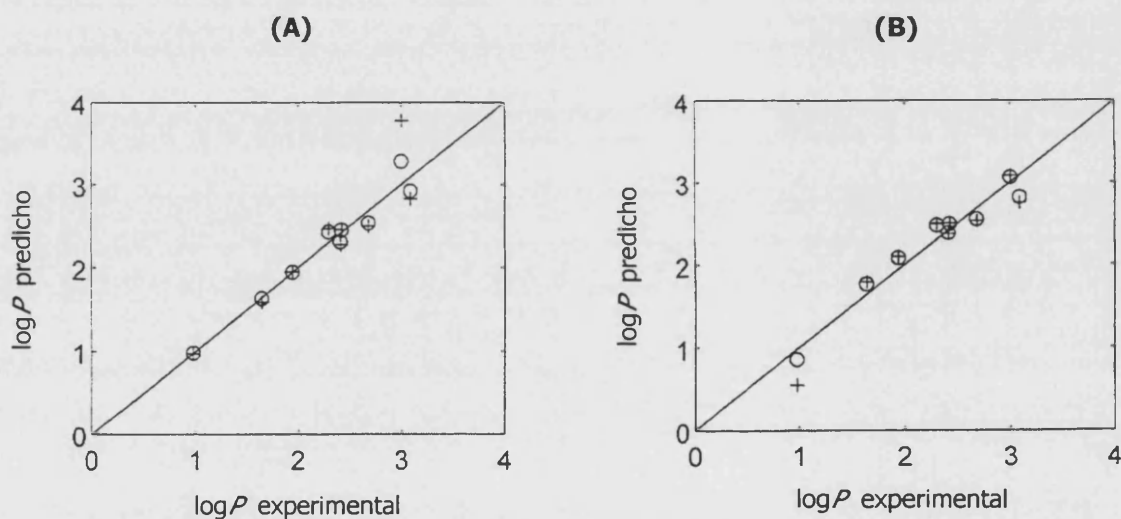


Figura IV.5.- Gráficos de validación para las fenilureas (serie 15): valores de $\log P$ predichos a partir del modelo (+) y en validación cruzada (O) frente a los valores experimentales. **(A)** Algoritmo $s\text{-}\log P$. **(B)** Regresión clásica.

IV.3.2.- Modelos para la predicción de $\log P$ de nuevos compuestos a partir de una serie de calibración independiente

En el apartado anterior se han obtenido modelos para cada una de las series estudiadas. También es posible usar una serie que incluya un conjunto de compuestos seleccionados pertenecientes a diferentes familias para desarrollar un modelo de calibración que sirva para la predicción de los valores de $\log P$ de moléculas nuevas no incluidas en el modelo. El único requisito es que los valores de $\log k$ de todos los compuestos, tanto del conjunto de calibración como de las moléculas de prueba, se obtengan en las mismas condiciones experimentales.

Con este propósito, se seleccionó un conjunto de siete compuestos que cubría un intervalo amplio de valores de $\log P$ (-0.02 – 4.54) y se obtuvieron sus valores de $\log k$ a tres concentraciones de Brij35 (series 18 - 20). Se seleccionó Brij35 ya que este surfactante no discrimina a los compuestos según el carácter dador/aceptor de puentes de hidrógeno (*Beleña-Pozo I. y col., 1999*). En la Tabla IV.8 se muestran los valores experimentales de $\log P$ publicados en diferentes fuentes bibliográficas para estos compuestos. En esta Tabla se pone de manifiesto la dispersión en los datos de $\log P$ disponibles, lo que hace difícil seleccionar el valor de $\log P$ adecuado para obtener el modelo. Finalmente, se utilizaron los valores experimentales de la base de datos del programa informático ScilogP en el paso de calibración como variable dependiente, ya que proporciona los valores de $\log P$ para todos los compuestos del conjunto de calibración estudiados y dichos valores son intermedios a los de las otras fuentes bibliográficas consideradas.

Para controlar la incertidumbre de los datos, los valores de $\log k$ de los compuestos del conjunto de calibración obtenidos a tres concentraciones micelares (series 18 - 20) se usaron conjuntamente para obtener los parámetros de la ecuación IV.2. Una vez obtenido el modelo se aplicó a la predicción de los valores de $\log P$ de las fenilureas utilizando los datos valores de $\log k$ de las series 15 - 17. En la Tabla IV.9 se muestran los valores de $\log P$ predichos (media y desviación estándar), así como valores experimentales encontrados en la bibliografía y otros valores obtenidos mediante programas informáticos (apartado III.6). Tal y como se puede observar, el algoritmo *s-logP* es una herramienta competitiva con los programas informáticos disponibles hoy en día.

Tabla IV.8.- Valores experimentales de $\log P$ para el conjunto de calibración encontrados en la bibliografía.

Compuesto	Referencias							
	a	b	c	d	e	f	g, h	Otras
Cafeína	-0.02	-0.07	-	-	-0.07	-	-	0.01 ⁱ
Acetanilida	1.21	1.16	1.0	-	1.14; 1.17; 1.36	1.16	1.16	-
Acetofenona	1.6633	1.58	1.7	-	1.68	1.63	1.58	1.73 ^j
Bromobenceno	2.99	2.99	3.0	2.99	-	2.99	2.99	-
Naftaleno	3.347	3.30	3.6	3.36	3.59; 3.45; 3.30	3.35	3.37	3.01 ^k
Bifenilo	4.063	3.98	4.0	4.09	3.95; 4.17; 4.09	3.98	-	3.16 ^k ; 4.04 ^l
Antraceno	4.54	4.45	-	4.54	-	4.5	4.45	-

^a Base de datos de valores de $\log P$ experimentales del programa informático ScilogP (versión 1.5 de demostración, SciVision Inc., 1994). ^b *PHYSPROP Database*. ^c *OPPTS 830.7570, 1995*. ^d *Schwarzenbach R.M. y col., 1993*. ^e *Hansch C. y col., 1979*. ^f *Sangster J., 1989*. ^g *Fujita T. y col., 1964*. ^h *Hansch C. y col., 1964*. ⁱ *Lepetit G., 1977*. ^j *Maxwell D.R. y col., 1961*. ^k *Rogers K.S. y col., 1969*. ^l *Terada H., 1972*.

Tabla IV.9.- Valores de $\log P$ predichos (algoritmo *s-logP*), experimentales y calculados (programas informáticos) para las fenilureas estudiadas.

Compuesto	$\log P \pm s^a$	Referencias							
		Valores experimentales de $\log P$					Valores calculados de $\log P^b$		
		c	d	e	f	Otros	j	k	l
Fenurón	0.93±0.08	0.96	0.98	1.04	-	0.98 ^g	1.18	0.98±0.28	1.38
Metoxurón	1.54±0.19	1.64	1.64	-	-	1.5 ^h	1.98	1.92±0.33	2.11
Monurón	1.8±0.2	1.98	1.94	1.94	1.6353	-	1.91	1.89±0.30	2.03
Clorotolurón	2.13±0.2	2.41	2.41	-	-	-	2.55	2.46±0.31	2.58
Monolinurón	2.2±0.2	2.30	2.30	-	-	-	1.99	2.71±0.56	2.35
Fluometurón	2.27±0.19	2.42	2.42	2.36	2.0001	1.34 ⁱ	-	2.36±0.37	2.26
Diurón	2.3±0.25	2.68	2.68	2.77	-	-	2.68	2.78±0.38	2.67
Clorbromurón	2.7±0.2	3.09	3.09	-	-	-	-	3.37±0.61	3.09
Buturón	3.1±0.2	-	3.00	-	-	-	-	2.61±0.41	2.66
Neburón	4.17±0.05	-	4.10	-	-	-	4.31	4.38±0.38	4.15

^a Predichos con el algoritmo *s-logP*. ^b Calculados con programas informáticos. ^c *Briggs G.G., 1981*. ^d *PHYSPROP Database*. ^e *Hansch C. y col., 1979*. ^f *NTP reports. The U.S. National Toxicology Program*. ^g *Hansch C. y col., 1967*. ^h *Leo A., 1983*. ⁱ *Braumann T. y col., 1983*. ^j *Schwarzenbach R.M. y col., 1993*. ^k Programa informático ACD/ $\log P$ (apartado III.6). ^l Programa informático KOWWINTM (apartado III.6).

Para comparar los resultados de las estimaciones realizadas con el algoritmo $s\text{-log}P$ y con los programas informáticos, la media de los valores experimentales de $\log P$ para cada fenilurea se usó como valor de referencia y la desviación estándar como una medida de la incertidumbre asociada a los métodos experimentales. Como medida de la incertidumbre asociada a los valores de $\log P$ predichos mediante el algoritmo propuesto se utilizó su desviación estándar (Tabla IV.9).

Para la comparación de las diferentes estrategias de estimación de los valores de $\log P$, los gráficos de validación (valores de $\log P$ predichos con $s\text{-log}P$ o calculados con programas informáticos frente a valores experimentales) se estudiaron mediante el método de mínimos cuadrados bivalente (BLS, siglas en inglés de "*bivariate least squares*"), regresión lineal que tiene en cuenta los errores existentes en ambos ejes y realiza una comparación conjunta de los valores de la ordenada en el origen y la pendiente con los valores teóricos o ideales 0 y 1, respectivamente. Este modelo de regresión es más fiable para este propósito que el clásico mínimos cuadrados ordinarios (OLS, siglas en inglés de "*ordinary least squares*") y mínimos cuadrados ponderados (WLS, "*weighted least squares*") ya que en ambos casos no se tiene en cuenta los errores asociados a la variable independiente (Riu J. y col., 1996).

La Figura IV.6.A muestra el gráfico $\log P$ predicho (por $s\text{-log}P$) frente a los valores experimentales, junto con los intervalos definidos por la desviación estándar en ambos métodos. La línea recta muestra el modelo lineal BLS (línea continua) definido por la ecuación: $y = -0.16 (\pm 0.10) + 1.05 (\pm 0.03) x$, donde la desviación estándar de la ordenada en el origen y la pendiente están entre paréntesis. Esto sugiere una coincidencia adecuada entre los valores de $\log P$ comparados. La prueba del intervalo de confianza conjunta de la pendiente y la ordenada evalúa si el punto teórico (0, 1) está dentro de la elipse de confianza (Riu J. y col., 1996). La Figura IV.6.B muestra la elipse de confianza (para un nivel de confianza del 95%) correspondiente al modelo BLS, junto con el punto teórico (0, 1). Este punto está dentro de la región BLS de confianza conjunta, lo que indica que para estos datos el algoritmo $s\text{-log}P$ es comparable a los métodos experimentales para determinar $\log P$.

Se repitió esta última prueba para la media de los valores de $\log P$ calculados con los diferentes programas informáticos. La Figura IV.6.C muestra el gráfico de los valores medios de $\log P$ calculados frente a los valores medios experimentales y los intervalos definidos por la desviación estándar para ambos métodos. En este caso se puede observar que la línea recta del modelo lineal BLS (línea continua) se desvía más de la línea ideal (línea discontinua) que en el caso del algoritmo $s\text{-log}P$ (Figura IV.6.A). De hecho, la ecuación BLS es: $y = 0.5 (\pm 0.4) + 0.76 (\pm 0.14) x$, donde tanto la pendiente como la ordenada se desvían de 0 y 1, respectivamente. Esto sugiere un mejor funcionamiento del algoritmo $s\text{-log}P$ que el de los programas informáticos, al menos para estos compuestos. El gráfico del intervalo de confianza conjunta en el último caso (Figura IV.6.D) también confirma este punto, aunque el punto teórico (0, 1) está dentro de la elipse de confianza.

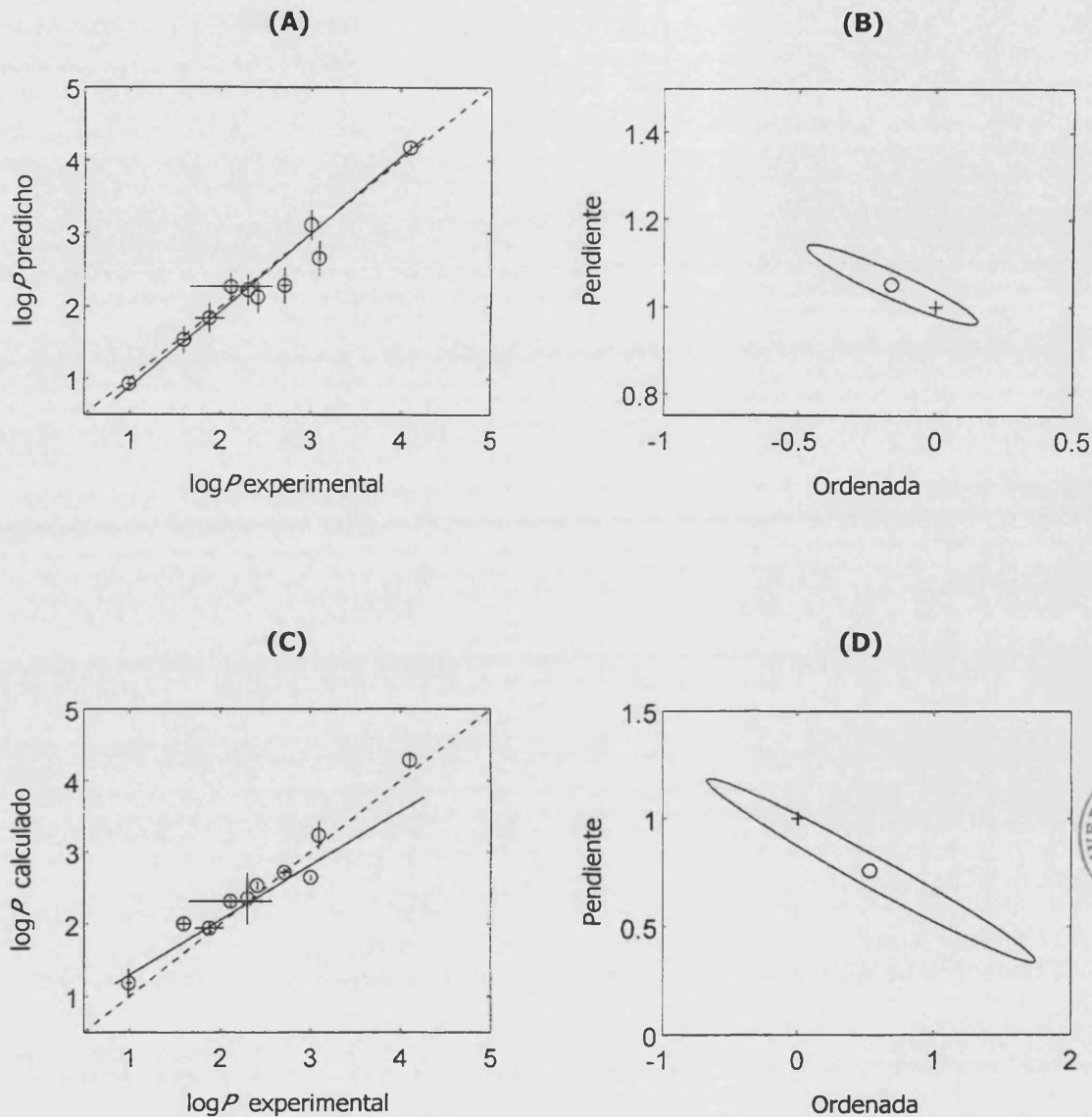


Figura IV.6.- Gráficos de validación con errores en ambos ejes basados en regresión BLS para las fenilureas (series 15 - 17): **(A)** valores de $\log P$ predichos frente a experimentales con su desviación estándar **(B)** e intervalos de confianza conjunta de la ordenada y de la pendiente usando el algoritmo $s\text{-}\log P$. **(C)** Valores de $\log P$ calculados frente a los experimentales con su desviación estándar **(D)** e intervalos de confianza conjunta de la ordenada y de la pendiente usando programas informáticos. (O) Coordenadas de la pendiente y la ordenada en el origen del modelo BLS y (+) punto teórico (0, 1). (—) Recta ajustada y (- - - - -) recta teórica de pendiente 1 y ordenada 0. Las cruces que aparecen sobre cada uno de los puntos representan las desviaciones estándar en ambos ejes.

IV.4.-Conclusiones

Los resultados presentados en este Capítulo demuestran que para las series de compuestos neutros estudiados el uso del logaritmo de los factores de retención de los compuestos ($\log k$), obtenidos en MLC con una fase móvil dada, permite diseñar estrategias para estimar la hidrofobicidad de nuevas moléculas. El uso de un algoritmo simplex para ajustar las relaciones no lineales $\log k - \log P$, seguido de un cálculo iterativo de $\log P$ tiene una capacidad de predicción al menos tan buena como los modelos de regresión clásica y no requiere de una optimización del modelo en función de los datos disponibles.

Esta estrategia (denominada algoritmo *s-logP*) permite obtener un modelo utilizando los datos de retención de un conjunto de calibración en el que se puede interpolar datos de $\log k$ de otras series de compuestos para predecir sus valores de $\log P$. Tales estimaciones, para el conjunto de prueba de 10 fenilureas, coincidieron estadísticamente de forma más estrecha con los valores de $\log P$ experimentales que las obtenidas a partir la media de los valores obtenidos con los programas informáticos.

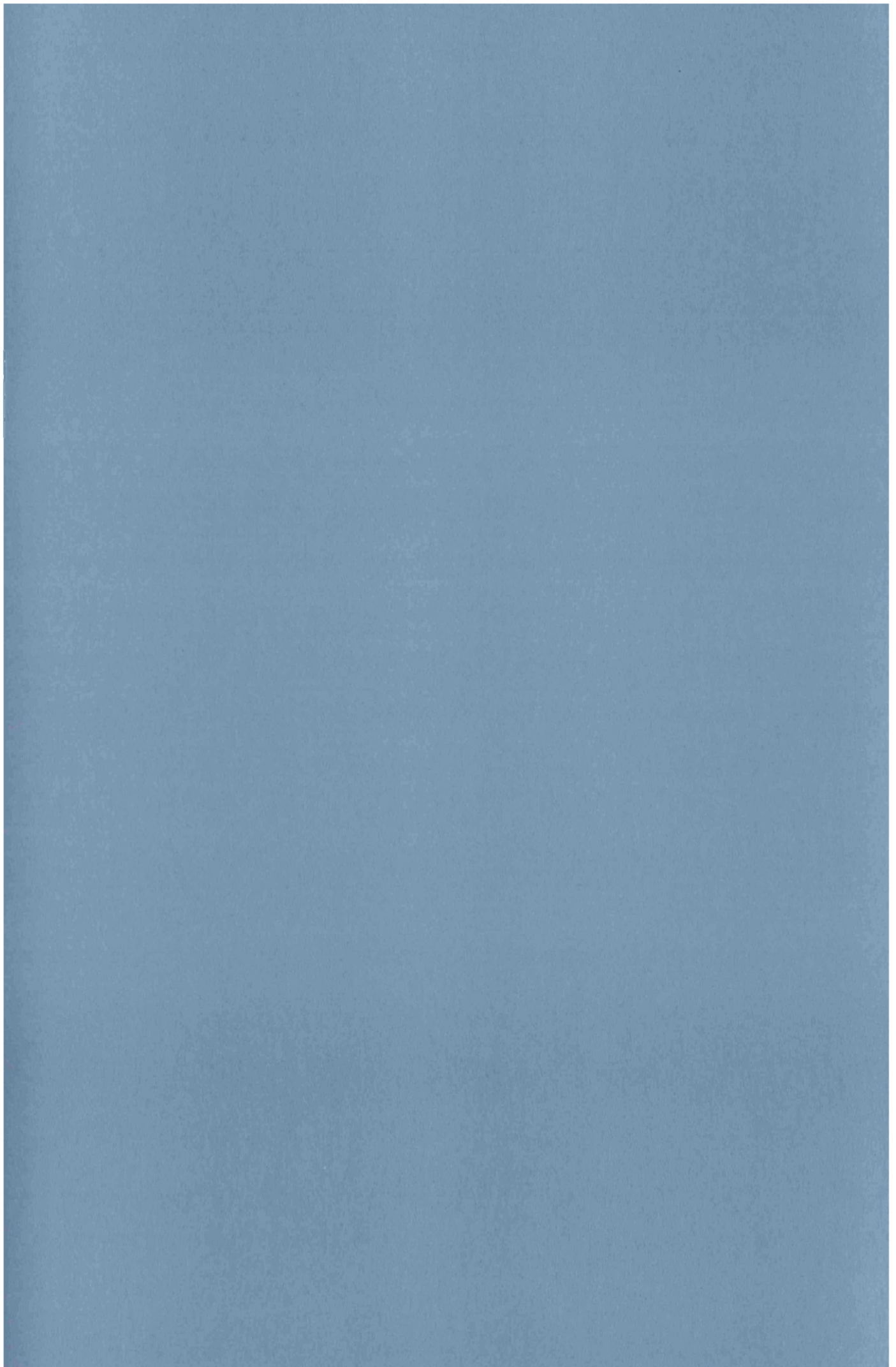
El algoritmo *s-logP* se enmarca dentro del área denominada relaciones cuantitativas estructura-retención (QSRR) y parece ser una alternativa fiable a otras aproximaciones en este campo para obtener una estimación, o por lo menos información cualitativa útil en el caso de "series cortas de datos", sobre la hidrofobicidad de nuevos compuestos.

CAPÍTULO V

Relaciones Cuantitativas Retención-Hidrofobicidad en Cromatografía Líquida Micelar

II.- Compuestos Iónicos

V.1.- Introducción	127
V.2.- Experimental y datos	129
V.3.- Resultados y discusión	136
V.3.1.- Relaciones retención – hidrofobicidad	136
V.3.2.- Relaciones $\log k$ – hidrofobicidad para catecolaminas	138
V.3.3.- Relaciones $\log k$ – hidrofobicidad para diuréticos	141
V.3.4.- Relaciones $\log k$ – hidrofobicidad para derivados OPA-NAC de aminoácidos	145
V.3.5.- Relaciones $\log k$ - hidrofobicidad para anestésicos locales	147
V.3.6.- Relaciones $\log k$ - hidrofobicidad para antiinflamatorios no esteroideos	150
V.4.-Conclusiones	153



V.1.- Introducción

Tal y como se ha comentado en el apartado I.3, el logaritmo de la relación de reparto n -octanol/agua ($\log P$) de los compuestos se refiere al reparto de la forma neutra de los mismos. Sin embargo, muchos compuestos de interés biológico están ionizados al pH fisiológico. En un recuento reciente (Comer J. y col., 2001) se ha encontrado que el 62.9 % de los fármacos son ionizables, de los cuales el 14.5 % son ácidos, el 67.6 % son bases y el 17.9% son compuestos zwitteriónicos. Tradicionalmente, se ha considerado que los compuestos hidrófilos y/o ionizados no atraviesan las membranas biológicas vía transporte pasivo. Sin embargo, investigaciones recientes han invalidado esta asunción (Taillardat-Bertschinger A. y col., 2003). De hecho el comportamiento biológico de xenobióticos ionizables está controlado por la interacción tanto de su forma neutra como de su forma ionizada con las membranas biológicas. Por tanto, cualquier metodología utilizada para la predicción de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de xenobióticos ionizables deben tener en cuenta su grado de ionización. En este contexto, para el desarrollo de metodologías capaces de mimetizar adecuadamente la complejidad de las membranas biológicas es necesario un mejor entendimiento del reparto o distribución de los compuestos ionizados.

Se ha estudiado de forma amplia la influencia de la ionización del soluto sobre la estimación de la hidrofobicidad mediante RP-HPLC (Braumann T., 1986; Kaliszan R., 1987; 1992; Dorsey J.G. y col.; 1993; Nasal A. y col., 2003). Los compuestos orgánicos ionizados, a no ser que sean muy hidrófobos, están débilmente o no retenidos en RP-HPLC convencional. Además, los compuestos ionizados pueden interaccionar con los grupos silanol libres de las partículas de sílice lo que complica la descripción de la retención en términos de hidrofobicidad. En estos casos para obtener relaciones $\log k - \log P$ se han propuesto diferentes soluciones:

- i.- La utilización de fases móviles preparadas a un pH en el que los compuestos no estén ionizados, sin embargo, esto no es siempre posible debido al intervalo de pH de trabajo limitado de las fases estacionarias alquil-silano.
- ii.- La estimación del factor de la retención de la forma no ionizada a partir de un modelo de retención $k = f(\text{pH})$ (Horváth C. y col., 1977; Rittich B. y col., 1990).
- iii.- El uso de pares iónicos en RP-HPLC (Riley C.M. y col., 1979; Kraak J.C. y col., 1986; Taylor R.B. y col., 1989; Zou H. y col., 1992).
- iv.- Tal y como se ha comentado en el apartado I.4.2.1, el uso de fases estacionarias de polímeros orgánicos (De Biasi V. y col., 1986; Bitteur S. y col., 1987; Miyake K. y col., 1987; Lambert W.J. y col., 1989; 1990; Bechalany A. y col., 1991) y de alúmina (Kaliszan R. y col., 1988-a; 1988-b; 1990; 2001; Haky J.E. y col., 1990) es una alternativa atractiva a las columnas alquil-silano debido a su intervalo de pH de trabajo más amplio y a la ausencia de grupos de silanol residuales. Sin embargo, los soportes de sílice son estables en el intervalo de pH fisiológico, lo que es de mayor interés en investigación farmacéutica.

El grupo de investigación dirigido por los Profesores Elisabeth Bosch y Martí Rosés ha dedicado una parte amplia de su investigación al estudio de las relaciones entre la retención de ácidos y bases en RP-HPLC y el pH de la fase móvil medido en diferentes escalas de pH (*Bosch E. y col., 1996; 1998; Rosés M. y col., 1996; 2001; 2002; 2004; Canals I. y col. 2000; 2001-a; 2001-b; 2002-a; 2002-b; Espinosa S. y col., 2000; 2002-a; 2002-b; 2002-c; 2002-d; Castells C.B. y col., 2003; 2004*). Fruto de estas investigaciones, han recomendado la medida del pH de la fase móvil tras la adición del modificador orgánico y el empleo de tampones de calibración del pH-metro preparados en la propia fase móvil (escala ξ pH) o bien en agua por comodidad (escala ω pH). Además, estos autores han estudiado la influencia de la temperatura y de la naturaleza y composición de la fase móvil sobre los valores de las constantes de protonación de los solutos y los desplazamientos observados respecto al medio acuoso puro.

Otra alternativa, que es la que se desarrolla en este Capítulo, es la utilización de fases móviles micelares en cromatografía líquida. Tal y como se ha comentado en el apartado I.4.3, la retención de un compuesto en cromatografía líquida micelar (MLC) depende del tipo de interacciones (electrónicas, hidrófobas y en menor extensión estéricas) con las micelas y la fase estacionaria modificada por los monómeros de surfactante (*Armstrong D.W. y col., 1981; Arunyanart M. y col., 1984; Medina-Hernández M.J. y col., 1992*). Para solutos no ionizados eluidos con fases móviles micelares, la retención debe estar predominantemente determinada por interacciones hidrófobas independientemente de la naturaleza del surfactante y se han obtenido relaciones lineales $\log k - \log P$ adecuadas a bajas concentraciones micelares. Sin embargo, para compuestos muy hidrófobos y concentraciones micelares altas se puede obtener una desviación de la linealidad (*Medina-Hernández y col., 1995-b*). Por otra parte, para solutos ionizados eluidos con fases móviles micelares de surfactantes iónicos, existen interacciones electrostáticas además de hidrófobas y se pueden considerar dos situaciones distintas:

- i.- Las cargas del soluto y el surfactante son del mismo signo. En esta situación, la repulsión electrostática existente entre el soluto y fase estacionaria modificada disminuye o incluso puede impedir su retención. En este caso MLC sólo será útil para medidas de la hidrofobicidad de compuestos muy hidrófobos.
- ii.- Las cargas del soluto y el surfactante son opuestas. En esta situación las interacciones electrostáticas de los solutos con la fase estacionaria modificada aumentan la retención de los compuestos cargados, incluso para los poco hidrófobos. En nuestra opinión, en este caso el uso de fases móviles micelares debe permitir la cuantificación de la hidrofobicidad de compuestos cargados.

El objetivo del presente Capítulo es la obtención de un modelo que permita la predicción de la hidrofobicidad de compuestos iónicos. Para ello se proponen y evalúan diferentes modelos que relacionan la retención en MLC de diferentes series de solutos ionizados con su hidrofobicidad y parámetros relacionados con su grado de ionización. Este estudio se llevó a cabo con diferentes familias de compuestos ionizables (catecolaminas, diuréticos, derivados de los aminoácidos con el reactivo *o*-ftaldehido-*N*-acetil-L-cisteína, anestésicos locales y antiinflamatorios no esteroideos) eluidos con fases móviles micelares de dodecilsulfato sódico (SDS, surfactante aniónico) y polioxietileno(23)lauril éter (Brij35, surfactante no iónico) a diferentes valores de pH.

V.2.- Experimental y datos

La preparación de las fases móviles y de las disoluciones de los analitos, así como la longitud de onda de detección se indican en el Capítulo III. En el presente apartado sólo se enumeran detalles concretos no especificados en dicho Capítulo:

- **Fases móviles ensayadas:** polioxietileno(23)lauril éter (Brij35) 0.02M, 0.04M y 0.06M tamponadas a pH 7.4.
- **Fase estacionaria:**
 - Anestésicos locales: Spherisorb ODS-2 ($d_p = 5\mu\text{m}$; $L = 125\text{ mm}$; $d_c = 4.0\text{ mm}$) (Scharlab, S.L., La Jota, Barcelona, España).
 - Antiinflamatorios no esteroideos: Kromasil C₁₈ ($d_p = 5\mu\text{m}$; $L = 150\text{ mm}$; $d_c = 4.6\text{ mm}$) (Scharlab S.L.).
- **Configuración del cromatógrafo:**
 - Sistema de inyección: válvula de inyección manual Rheodyne (Cotati, California, EE.UU.) con un bucle de 20 μL .
 - Equipo sin compartimento termostatzado para columnas. Las experiencias se realizaron a temperatura ambiente.
 - Flujo de la fase móvil: 1 mL min⁻¹.
 - ChemStation HP (versión A0402, 1996).
- **Cálculo de los factores de retención:** para el cálculo de los factores de retención se utilizó la ecuación III.1. El "tiempo total básico" (t_M^0) se estimó a partir de la primera perturbación que aparece en el cromatograma (Capítulo III, apartado III.4)

Además, se recopilaron los datos experimentales obtenidos en nuestro laboratorio correspondientes a seis catecolaminas (*Villanueva-Camañas R.M. y col., 1995*), doce diuréticos (*Bonet-Domingo E. y col., 1994*) y dieciséis aminoácidos derivatizados con el reactivo *o*-ftaldehido-*N*-acetil-L-cisteína (OPA-NAC) (*Catalá-Icardo M. y col., 1995*) eluidos con fases móviles de SDS a diferentes valores de pH (Tablas V.1 – V.3). En las Tablas V.4 y V.5 se muestran los valores de *k* obtenidos para los anestésicos locales y antiinflamatorios no esteroideos, respectivamente, eluidos con fases móviles micelares de Brij35.

En el Anexo II se muestra la estructura, el logaritmo de las constantes de protonación ($\log K_H$) y los valores bibliográficos de $\log P$ para las formas no ionizadas de los compuestos estudiados.

Tabla V.1.- Factores de retención de catecolaminas obtenidos con fases móviles micelares de SDS 0.1 M a diferentes valores de pH ^a, fracción molar nominal de la especie neutra (δ_j) y expresión de la carga molar total (α).

Compuesto	pH										δ_j	α
	2	3	3.5	4	5	5.4	5.8	6.2	6.6	7		
Adrenalina	8.0	8.6	8.7	8.6	8.9	9.2	9.1	9.4	9.0	9.1	δ_2	$-2 \delta_0 -1 \delta_1 + 1 \delta_3$
L-Dopa	9.5	8.7	6.8	3.6	1.2	0.84	0.65	0.56	0.52	0.55	δ_3	$-3 \delta_0 -2 \delta_1 -1 \delta_2 + 1 \delta_4$
Dopamina	13.2	14.3	14.4	14.2	14.6	14.9	15.0	15.0	14.7	14.7	δ_2	$-2 \delta_0 -1 \delta_1 + 1 \delta_3$
Isoproterenol	13.4	14.3	14.9	14.5	14.9	15.4	15.4	15.6	15.4	14.3	δ_2	$-2 \delta_0 -1 \delta_1 + 1 \delta_3$
2-Metil-L-dopa	14.4	14.8	13	7.6	2.8	1.7	0.90	0.68	0.64	0.65	δ_3	$-3 \delta_0 -2 \delta_1 -1 \delta_2 + 1 \delta_4$
Noradrenalina	6.4	7.0	7.0	7.0	7.2	7.4	7.3	8.0	7.1	7.2	δ_2	$-2 \delta_0 -1 \delta_1 + 1 \delta_3$

^a Columna Spherisorb ODS-2. Temperatura ambiente.

Tabla V.2.- Factores de retención de diuréticos obtenidos con fases móviles micelares de SDS 0.15 M a diferentes valores de pH ^a, fracción molar nominal de la especie neutra (δ_j) y expresión de la carga molar total (α).

Compuesto	pH					δ_j	α
	3.31	4.8	5.36	6.02	6.81		
Acetazolamida	1.3	1.2	1.3	1.2	1.0	δ_2	$-2 \delta_0 -1 \delta_1$
Ácido etacrínico	18.5	7.1	3.8	2.0	1.6	δ_1	$-\delta_0$
Amilorida	8.5	8.3	8.3	7.9	8.1	δ_0	δ_1
Bendroflumetiazida	5.1	4.9	4.9	4.8	4.8	δ_1	$-\delta_0$
Bumetanida	12.3	11.0	9.3	4.9	2.0	δ_3	$-3 \delta_0 -2 \delta_1 -1 \delta_2$
Clortalidona	3.8	3.7	3.7	3.6	3.6	δ_1	$-\delta_0$
Espironolactona	27.2	29.2	28.3	25.1	29.4	1	0
Furosemida	5.7	3.6	2.2	0.9	0.4	δ_2	$-2 \delta_0 -1 \delta_1$
Hidroclorotiazida	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	δ_2	$-2 \delta_0 -1 \delta_1$
Probenecid	16.7	12.7	8.4	3.0	1.1	δ_1	$-\delta_0$
Triamtereno	17.5	17.5	17.6	17.1	17.1	δ_0	δ_1
Xipamida	16.8	15.9	15.0	10.8	4.7	δ_2	$-2 \delta_0 -1 \delta_1$

^a Columna Spherisorb ODS-2. Temperatura ambiente.

Tabla V.3.- Factores de retención de los derivados de los aminoácidos con el reactivo OPA-NAC obtenidos con fases móviles micelares de SDS 0.05 M a diferentes valores de pH ^a, fracción molar nominal de la especie neutra (δ) y expresión de la carga molar total (α).

Compuesto	pH					δ_i	α
	3.1	3.2	3.45	3.5	3.6		
Ácido aspártico	1.8	1.8	1.0	0.6	0.4	δ_2	$-2 \delta_0 -1 \delta_1$
Ácido glutámico	-	-	-	1.4	0.9	δ_2	$-2 \delta_0 -1 \delta_1$
Alanina	3.2	3.2	-	1.9	1.6	δ_1	$-\delta_0$
Arginina	26.0	25.8	23.4	21.7	20.6	δ_1	$-\delta_0 + \delta_2$
Cisteína	3.4	5.6	-	2.0	2.1	δ_2	$-2 \delta_0 -1 \delta_1$
Fenilalanina	24.2	23.8	19.4	11.1	6.0	δ_1	$-\delta_0$
Glicina	3.1	3.1	3.0	1.5	1.0	δ_1	$-\delta_0$
Histidina	16.2	16.8	5.7	-	-	δ_1	$-\delta_0 + \delta_2$
Isoleucina	28.8	28.8	21.7	18.0	13.6	δ_1	$-\delta_0$
Leucina	27.7	28.0	22.9	15.7	11.5	δ_1	$-\delta_0$
Lisina	27.8	27.2	-	12.6	8.0	δ_1	$-\delta_0 + \delta_2$
Metionina	12.9	13.2	5.6	2.1	1.6	δ_1	$-\delta_0$
Tirosina	8.5	-	-	2.4	1.9	δ_2	$-2 \delta_0 -1 \delta_1$
Treonina	2.9	3.0	1.9	1.2	0.8	δ_1	$-\delta_0$
Triptófano	22.6	22.4	20.0	12.1	8.0	δ_1	$-\delta_0$
Valina	20.7	21.1	8.8	5.7	2.2	δ_1	$-\delta_0$

^a Columna Spherisorb ODS-2. Temperatura ambiente.



Tabla V.4.- Media y desviación estándar de los valores de los factores de retención de anestésicos locales obtenidos con fases móviles micelares de Brij35 a pH 7.4 a diversas concentraciones de surfactante ^a, fracción molar nominal de la especie neutra (δ_i) y expresión de la carga molar total (α).

Compuesto	[Brij35]			δ_i	α
	0.02 M	0.04 M	0.06 M		
Bupivacaína	110 ± 8	54 ± 3	39.5 ± 1.4	δ_0	δ_1
Dibucaína	-	129 ± 4	99 ± 3	δ_0	δ_1
Lidocaína	34.6 ± 0.2	21.0 ± 0.8	17.54 ± 0.15	δ_0	δ_1
Mepivacaína	18.3 ± 0.3	12.1 ± 0.2	11.5 ± 0.2	δ_0	δ_1
Prilocaina	27.0 ± 0.7	18.1 ± 0.9	15.8 ± 0.8	δ_0	δ_1
Procaína	13.2 ± 0.8	10.1 ± 0.9	8.5 ± 0.4	δ_0	δ_1
Propanocaína	-	-	158 ± 9	δ_0	δ_1
Tetracaína	96.4 ± 0.3	51 ± 2	33.7 ± 0.2	δ_0	δ_1

^a Columna Spherisorb ODS-2. Temperatura ambiente.

Tabla V.5.- Media y desviación estándar de los valores de los factores de retención de antiinflamatorios no esteroideos obtenidos con fases móviles micelares de Brij35 a pH 7.4 a diversas concentraciones de surfactante ^a, fracción molar nominal de la especie neutra (δ) y expresión de la carga molar total (α).

Compuesto	[Brij35]			δ_i	α
	0.02 M	0.04 M	0.06 M		
Acemetacina	38.15 ± 0.05	20.97 ± 0.18	14.51 ± 0.08	δ_1	$-\delta_0$
Ácido acetilsalicílico	5.0 ± 0.3	3.86 ± 0.11	3.19 ± 0.15	δ_1	$-\delta_0$
Ácido salicílico	4.93 ± 0.13	4.24 ± 0.05	3.81 ± 0.03	δ_2	$-2 \delta_0 -1 \delta_1$
Diclofenac	42.8 ± 0.8	22.46 ± 0.07	15.24 ± 0.07	δ_1	$-\delta_0$
Fenbufeno	18.42 ± 0.06	10.82 ± 0.14	7.70 ± 0.03	δ_1	$-\delta_0$
Fentiazac	61.5 ± 1.1	32.0 ± 0.3	21.65 ± 0.08	δ_1	$-\delta_0$
Flurbiprofeno	29.8 ± 0.4	16.51 ± 0.09	11.43 ± 0.05	δ_1	$-\delta_0$
Ibuprofeno	29.5 ± 0.2	19.7 ± 0.3	14.78 ± 0.07	δ_1	$-\delta_0$
Ibuproxam	78.6 ± 0.7	45.90 ± 0.14	32.1 ± 0.2	1	0
Indometacina	41.2 ± 0.2	23.0 ± 1.2	15.94 ± 0.10	δ_1	$-\delta_0$
Ketoprofeno	11.69 ± 0.05	8.5 ± 0.2	6.68 ± 0.04	δ_1	$-\delta_0$
Nabumetona	97.0 ± 0.2	52.2 ± 1.2	35.61 ± 0.10	1	0
Naproxeno	14.8 ± 0.4	9.5 ± 0.7	6.99 ± 0.03	δ_1	$-\delta_0$
Piketoprofeno	141.2 ± 0.3	74.4 ± 0.2	50.6 ± 0.5	1	0
Sulindac	8.41 ± 0.03	5.067 ± 0.006	3.61 ± 0.09	δ_1	$-\delta_0$
Tolmetín	11.08 ± 0.02	7.73 ± 0.05	5.97 ± 0.05	δ_1	$-\delta_0$

^a Columna Kromasil C₁₈. Temperatura ambiente.

V.3.- Resultados y discusión

V.3.1.- Relaciones retención - hidrofobicidad

En RP-HPLC en general y en MLC en particular, cuando la retención de compuestos iónicos, expresada como $\log k$, obtenida con una cierta fase móvil se correlaciona con los valores de $\log P$ correspondientes a las formas no ionizadas de los compuestos, generalmente no se obtienen buenas correlaciones. Este comportamiento es debido por un lado, a que los valores de $\log P$ están referidos a la molécula neutra y por otro lado a que la retención de compuestos iónicos no sólo depende de las propiedades hidrófobas sino también de su grado de ionización. Así, para compuestos iónicos con diferentes grados de ionización es de esperar que no se obtengan buenas relaciones de $\log k - \log P$; además, este hecho puede verse magnificado en MLC cuando se cromatografían solutos ionizados con surfactantes iónicos, ya que las interacciones electrostáticas de los solutos con el surfactante presente en el sistema cromatográfico pueden ser de especial relevancia frente a las interacciones hidrófobas. Sin embargo, cuando el grado de ionización es el mismo para compuestos relacionados estructuralmente, la diferencia en su retención es debida a las diferencias en su hidrofobicidad.

Para relacionar la retención con la hidrofobicidad se ensayaron diferentes modelos. En el **modelo I** se utilizó la ecuación V.1. Esta ecuación se ha utilizado por diversos autores para correlacionar la retención de compuestos iónicos con sus relaciones de distribución *n*-octanol/agua (*Belsner K. y col., 1993; Kaliszan R. y col., 1994; Demare S. y col., 1999*):

$$\log k = b_0 + b_1 \log D \quad (\text{V.1})$$

donde D es la relación de distribución *n*-octanol/agua al pH considerado (apartado I.3).

Considerando la ionización del compuesto en la fase acuosa, la relación entre $\log D$ y $\log P$ se puede calcular a partir de la siguiente expresión:

$$\log D = \log P + \log \delta_i = \log P + \log \left(\frac{\beta_{H_1} h^1}{1 + \beta_{H_1} h + \beta_{H_2} h^2 + \dots + \beta_{H_n} h^n} \right) \quad (\text{V.2})$$

donde δ_i es la fracción molar de la especie neutra i del compuesto, h la concentración de protones al pH considerado y β_{H_1} es la constante de protonación acumulativa ($\beta_{H_n} = K_{H_1} \cdot K_{H_2} \cdot \dots \cdot K_{H_n}$), siendo K_{H_n} la constante de protonación sucesiva n del compuesto.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta expresión para la estimación de $\log D$ asume que sólo la especie neutra puede pasar a la fase *n*-octanol y que todas las especies ionizadas permanecen en la fase acuosa.

Continuando con el desarrollo de los modelos retención - hidrofobicidad, si se sustituye la ecuación V.2 en la ecuación V.1 del modelo I, se obtiene la siguiente expresión:

$$\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \log \delta_i \quad (V.3)$$

Una limitación adicional del modelo I (ecuación V.3) es que considera que las contribuciones de la hidrofobicidad y de la carga de los compuestos a la retención es la misma. Para superar esta limitación, se puede desarrollar un modelo nuevo (**modelo II**) basado en la independencia de estas contribuciones a la retención, según la siguiente ecuación:

$$\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \log \delta_i \quad (V.4)$$

Las ecuaciones V.1 y V.4 tienen en cuenta la ionización de los compuestos, pero ambas presentan una restricción importante, su aplicación se limita a valores de pH cercanos a los valores de $\log K_{Hi}$ de los compuestos. Así, por ejemplo, la retención de un compuesto con carácter básico eluido con fases móviles preparadas a valores de pH muy alejados de su constante de protonación ($\text{pH} < \log K_{Hi}$) es independiente del pH de la fase móvil mientras que los valores de $\log D$ y $\log \delta_i$ disminuyen sistemáticamente al disminuir el pH. Por ejemplo, isotretenerol presenta en su molécula tres grupos funcionales susceptibles de ionización, dos de ellos muestran un carácter ácido ($\log K_{H1} = 12$ y $\log K_{H2} = 10.1$) y el tercero un carácter básico ($\log K_{H3} = 8.6$), los valores de k (Tabla V.1), $\log D$ y $\log \delta_i (= \log \delta_2)$ que se obtienen en el intervalo de pH 2 - 7 son los siguientes:

pH	k	$\log D$	$\log \delta_i$	pH	k	$\log D$	$\log \delta_i$
2.0	13.4	-6.35	-6.60	5.4	15.4	-2.95	-3.20
3.0	14.3	-5.35	-5.60	5.8	15.4	-2.55	-2.80
3.5	14.9	-4.85	-5.10	6.2	15.6	-2.15	-2.40
4.0	14.5	-4.35	-4.60	6.6	15.4	-1.75	-2.00
5.0	14.9	-3.35	-3.60	7.0	14.3	-1.36	-1.61

El grado de ionización de los dos grupos con carácter ácido es despreciable en todo el intervalo de pH considerado y el del grupo básico es prácticamente constante en el intervalo 2 - 7. Sin embargo, $\log D$ y $\log \delta_2$ varían de -6.35 a -1.36 y de -6.60 a -1.61, respectivamente, de pH 2 a pH 7.

Para superar estas limitaciones, se ensayó un modelo de retención nuevo (**modelo III**, ecuación V.5) que incluye la variable α . Esta variable mide la carga molar total de compuesto a un valor de pH dado.

$$\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \alpha \quad (\text{V.5})$$

Para compuestos polipróticos, los valores de α se pueden calcular como:

$$\alpha = \sum_{j=0}^n a_j \delta_j \quad (\text{V.6})$$

donde a_j es el valor de la carga con su signo de la especie considerada (p. ej., -2, -1, 0, +1, +2) y δ_j es la fracción molar de la especie considerada al pH considerado. Por ejemplo, para compuestos monoproticos ácidos o básicos, los valores de α se pueden calcular mediante las ecuaciones V.7 y V.8, respectivamente:

$$\alpha = a_0 \delta_0 = \frac{-1}{1 + K_H h} \quad (\text{V.7})$$

$$\alpha = a_1 \delta_1 = (+1) \frac{K_H h}{1 + K_H h} \quad (\text{V.8})$$

De acuerdo con el modelo III (ecuación V.5), la retención predicha de un compuesto ionizable para valores de pH alejados de $\log K_{H_i}$ permanece constante como se observa experimentalmente.

V.3.2.- Relaciones $\log k$ - hidrofobicidad para catecolaminas

En la Tabla V.1 se muestran, para cada una de las catecolaminas estudiadas, los valores de los factores de retención obtenidos con fases móviles de SDS 0.1 M a diferentes valores de pH (2 - 7) tomados de la bibliografía (*Villanueva-Camañas R.M. y col., 1995*) junto con las expresiones utilizadas para el cálculo de $\log \delta_i$ y α a los valores de pH considerados.

En el Anexo II (apartado XII.2.10) se muestran las estructuras y los valores de $\log P$ y $\log K_{H_i}$ de las catecolaminas estudiadas. Como se puede observar, las catecolaminas son compuestos de hidrofobicidad muy baja ($-0.88 \leq \log P \leq 0.25$) y presentan en función del pH una carga global positiva o neutra. En todo el intervalo de pH estudiado (2 - 7) adrenalina, dopamina, isoproterenol y noradrenalina presentan un grupo amino que está ionizado ($\alpha \sim +1$), mientras que L-dopa y 2-metil-L-dopa que presentan además un grupo carboxilo en su molécula, están en forma zwitteriónica con carga neta cero a pH 7 y próxima a +1 a pH 2 (p. ej., los valores de α para L-dopa son -0.02, 0.39 y 0.98 a pH 7, 4 y 2, respectivamente). En los cálculos se consideró la

constante de protonación del grupo carboxilo de L-dopa y 2-metil-L-dopa en medio micelar de SDS ($\log K_{H4} = 3.8$ y 4.2 , respectivamente).

Cuando se relacionó directamente $\log k$ con $\log P$, como era de esperar, sólo se obtuvieron buenos resultados a pH 2 y 3 ($r^2 = 0.96$; $r'^2 = 0.95$; $F = 95$; $p = 0.0006$; $s_{y/x} = 0.03$, para el modelo a pH 2 y $r^2 = 0.89$; $r'^2 = 0.86$; $F = 32$; $p = 0.0048$; $s_{y/x} = 0.05$, para el modelo a pH 3), ya que a estos valores de pH los compuestos presentan un grado de ionización similar ($\alpha \sim +1$) y las diferencias en su retención son debidas a las diferencias en su hidrofobicidad. Sin embargo, en el intervalo de pH 3.5 – 7, en el que la ionización del grupo carboxilo de L-dopa y 2-metil-L-dopa es significativa, se obtuvieron muy malos resultados (p. ej., $r^2 = 0.69$ y 0.007 , a pH 3.5 y 7, respectivamente) lo que confirma la importancia del grado de ionización de los compuestos en su retención.

Los valores de $\log k$, $\log D$, $\log P$, el logaritmo de la fracción molar de la forma neutra de los compuestos ($\log \delta_2$ para adrenalina, dopamina, isoproterenol y noradrenalina y $\log \delta_3$ para L-dopa y 2-metil-L-dopa) y la carga molar total de los compuestos a los diferentes valores de pH de la fase móvil se ajustaron a los modelos I, II y III (ecuaciones V.1, V.4 y V.5). En la Tabla V.6 se muestran los resultados obtenidos del análisis de regresión de los datos.

Como se pueda observar, el modelo I sólo proporcionó resultados relativamente adecuados para valores de pH superiores a los valores de $\log K_{H4}$ de L-dopa y 2-metil-L-dopa. Para valores de pH inferiores a 5 las relaciones lineales fueron peores de forma considerable y no fueron estadísticamente significativas, para un nivel de confianza (NC) del 95% ($p > 0.05$). Este hecho indica que $\log D$ no refleja adecuadamente las interacciones de las catecolaminas en el sistema cromatográfico micelar de SDS que son de naturaleza hidrófoba y electrostática.

Para cada uno de los valores individuales de pH de la fase móvil, los resultados proporcionados por el modelo II fueron claramente mejores que los del modelo I y los modelos fueron estadísticamente significativos a un NC = 95 %. Sin embargo, en algunos casos los coeficientes de ajuste b_1 y b_2 no fueron estadísticamente significativos ($p > 0.05$; $b_i < t_{\alpha/2, \nu} \cdot s_{b_i}$), debido probablemente a problemas asociados a los grados de libertad ($b_i > s_{b_i}$) ya que se trata de una regresión lineal múltiple con 2 variables y sólo 6 compuestos, lo cual no es aconsejable desde el punto de vista estadístico. En tales casos, tal y como se ha comentado en el apartado III.5 el modelo obtenido sólo puede utilizarse como una herramienta cualitativa y si se pretende utilizar con fines cuantitativos, se recomienda volver a construir el modelo eliminando el coeficiente de ajuste no significativo. Por otro lado, los coeficientes de ajuste b_1 y b_2 en el modelo II fueron diferentes, esto indica que la contribución de la hidrofobicidad y la carga de los compuestos a la retención es diferente y explica los malos resultados obtenidos con el modelo I.

Tabla V.6.- Análisis estadístico de las regresiones lineales para catecolaminas ^a.

pH	n	$b_0 \pm ts_{b_0}$ (p)	$b_1 \pm ts_{b_1}$ (p)	$b_2 \pm ts_{b_2}$ (p)	r^2 (r ²)	F (p)	$s_{y/x}$
Modelo I: $\log k = b_0 + b_1 \log D$							
2	6	1.1 ± 0.4 (0.0015)	0.02 ± 0.07 ^b (0.4051)	-	0.18 (<0.0001)	0.9 (0.4051) ^c	0.14
3	6	1.1 ± 0.4 (0.0012)	0.01 ± 0.08 ^b (0.6263)	-	0.06 (<0.0001)	0.3 0.6263	0.15
3.5	6	1.0 ± 0.4 (0.0021)	0.00 ± 0.09 ^b (0.9365)	-	0.002 (<0.0001)	0.007 (0.9365) ^c	0.18
4	6	0.7 ± 0.4 (0.0088)	-0.05 ± 0.11 ^b (0.2223)	-	0.34 (0.18)	2 (0.2223) ^c	0.20
5	6	0.3 ± 0.5 ^b (0.1855)	-0.18 ± 0.17 (0.0418)	-	0.69 (0.61)	9 (0.0418)	0.27
5.4	6	0.1 ± 0.6 ^b (0.5418)	-0.2 ± 0.2 (0.0265)	-	0.75 (0.68)	12 (0.0265)	0.30
5.8	6	0.0 ± 0.6 ^b (0.8788)	-0.3 ± 0.2 (0.0193)	-	0.78 (0.73)	14 (0.0193)	0.32
6.2	6	-0.1 ± 0.7 ^b (0.6714)	-0.4 ± 0.3 (0.0188)	-	0.78 (0.73)	15 (0.0188)	0.35
6.6	6	-0.1 ± 0.8 ^b (0.7236)	-0.5 ± 0.4 (0.0313)	-	0.73 (0.66)	11 (0.0313)	0.39
7	6	0.0 ± 0.8 ^b (0.8650)	-0.5 ± 0.5 (0.0443)	-	0.68 (0.59)	8 (0.0443)	0.42
2-7	60	0.45 ± 0.17 (<0.0001)	-0.15 ± 0.05 (<0.0001)	-	0.33 (0.32)	28 (<0.0001)	0.39
Modelo II: $\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \log \delta_i$							
2	6	1.08 ± 0.12 (0.0001)	0.30 ± 0.12 (0.0038)	0.00 ± 0.02 ^b (0.8962)	0.96 (0.93)	36 (0.0080)	0.04
3	6	1.06 ± 0.15 (0.0002)	0.31 ± 0.17 (0.0114)	-0.01 ± 0.03 ^b (0.4358)	0.91 (0.85)	16 (0.0257)	0.05
3.5	6	0.97 ± 0.18 (0.0004)	0.3 ± 0.2 (0.0190)	-0.03 ± 0.04 ^b (0.1161)	0.88 (0.80)	11 (0.0404)	0.07
4	6	0.7 ± 0.2 (0.0016)	0.3 ± 0.3 ^b (0.0317)	-0.09 ± 0.06 (0.0144)	0.92 (0.86)	16 (0.0242)	0.08
5	6	0.3 ± 0.2 (0.0372)	0.3 ± 0.3 ^b (0.0527)	-0.24 ± 0.08 (0.028)	0.97 (0.94)	41 (0.0065)	0.10
5.4	6	0.09 ± 0.19 ^b (0.2319)	0.3 ± 0.3 ^b (0.0313)	-0.32 ± 0.07 (0.0017)	0.990 (0.98)	101 (<0.0001)	0.08
5.8	6	-0.10 ± 0.04 (0.0048)	0.29 ± 0.06 (0.0007)	-0.43 ± 0.02 (<0.0001)	0.9994 (0.9990)	2486 (<0.0001)	0.02
6.2	6	-0.20 ± 0.06 (0.0016)	0.26 ± 0.08 (0.0021)	-0.54 ± 0.03 (<0.0001)	0.9991 (0.9990)	1736 (<0.0001)	0.03
6.6	6	-0.23 ± 0.05 (0.0010)	0.29 ± 0.08 (0.0013)	-0.66 ± 0.03 (<0.0001)	0.9992 (0.9990)	1927 (<0.0001)	0.02
7	6	-0.21 ± 0.05 (0.0009)	0.26 ± 0.07 (0.0014)	-0.80 ± 0.04 (<0.0001)	0.9993 (0.9990)	2174 (<0.0001)	0.02
2-7	60	-0.45 ± 0.16 (<0.0001)	0.2 ± 0.2 ^b (0.0616)	-0.15 ± 0.05 (<0.0001)	0.42 (0.40)	21 (<0.0001)	0.37
Modelo III: $\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \alpha$							
2	6	-7 ± 10 ^b (0.1124)	0.30 ± 0.07 (0.0007)	8 ± 10 ^b (0.0822)	0.990 (0.98)	118 (0.0014)	0.02
3	6	0.5 ± 1.0 ^b (0.2334)	0.30 ± 0.13 (0.0048)	0.6 ± 1.1 ^b (0.1471)	0.95 (0.0108)	29 (0.0108)	0.04
3.5	6	0.5 ± 0.4 (0.0177)	0.31 ± 0.12 (0.0035)	0.6 ± 0.4 (0.0165)	0.97 (0.94)	42 (0.0064)	0.04
4	6	0.34 ± 0.12 (0.0028)	0.30 ± 0.08 (0.0014)	0.77 ± 0.14 (0.0004)	0.992 (0.990)	183 (0.0007)	0.03
5	6	0.2 ± 0.2 ^b (0.0622)	0.3 ± 0.3 ^b (0.0285)	0.9 ± 0.3 (0.0013)	0.98 (0.97)	72 (0.0029)	0.08
5.4	6	0.05 ± 0.16 ^b (0.4349)	0.3 ± 0.2 (0.0208)	1.1 ± 0.2 (0.0005)	0.990 (0.98)	142 (0.0011)	0.07
5.8	6	-0.12 ± 0.04 (0.0021)	0.29 ± 0.05 (0.0004)	1.25 ± 0.05 (<0.0001)	0.9995 (0.9992)	3298 (<0.0001)	0.017
6.2	6	-0.20 ± 0.02 (0.0001)	0.26 ± 0.03 (0.0001)	1.34 ± 0.03 (<0.0001)	0.99990 (0.9998)	13567 (<0.0001)	0.009
6.6	6	-0.22 ± 0.03 (0.0002)	0.29 ± 0.05 (0.0003)	1.36 ± 0.04 (<0.0001)	0.9997 (0.9995)	5027 (<0.0001)	0.015
7	6	-0.19 ± 0.06 (0.0016)	0.26 ± 0.08 (0.0019)	1.33 ± 0.07 (<0.0001)	0.9991 (0.9990)	1726 (<0.0001)	0.02
2-7	60	-0.07 ± 0.05 (0.0085)	0.30 ± 0.06 (<0.0001)	1.21 ± 0.06 (<0.0001)	0.97 (0.96)	800 (<0.0001)	0.09

^a Detalles acerca de los parámetros estadísticos en el apartado III.5.

^b Coeficiente de ajuste estadísticamente no significativo para un nivel de confianza del 95%: $b_i < t_{\alpha/2, \nu} \cdot s_{b_i}$; $p > 0.05$.

^c Modelo estadísticamente no significativo para un nivel de confianza del 95% ($p > 0.05$).

Cuando se utilizó el modelo III se obtuvieron buenos resultados en todos los casos. Además, los coeficientes de ajuste relacionados con la hidrofobicidad, b_1 , fueron estadísticamente significativos y se mantuvieron prácticamente constantes cuando se modificó el pH de la fase móvil. Este hecho indica que el modelo aísla correctamente la contribución de la hidrofobicidad de los compuestos a la retención. Los coeficientes b_2 relacionados con la ionización fueron positivos, lo que indica que las atracciones electrostáticas entre los compuestos y la fase estacionaria modificada por los monómeros de surfactante aumentan la retención de las catecolaminas. En algunos casos, los valores de los coeficientes de ajuste b_0 y b_2 no fueron estadísticamente significativos probablemente debido a problemas relacionados con los grados de libertad de los modelos.

Por otro lado, se detectó un problema de homogeneidad en los datos de retención. Así, tal y como se muestra en la Tabla V.1, las catecolaminas L-dopa y 2-metil-L-dopa presentan valores de k más pequeños que el resto de compuestos en el intervalo de pH 5 – 7 como cabe esperar por la presencia del grupo carboxilo. Por tanto, los modelos obtenidos a dichos valores de pH podrían estar distorsionados y mostrar falsas correlaciones debido a la alta influencia ("*leverage*") de estos compuestos. Con el fin de investigar esta situación y de incrementar el número de puntos existente en las regresiones se obtuvieron los modelos I, II y III utilizando todos los datos conjuntamente a los diferentes valores de pH. Tal y como se puede observar en la Tabla V.6, se obtuvo una correlación muy pobre para el modelo I, así como para el modelo II y sólo se obtuvieron buenos resultados para el modelo III con la regresión global. Este hecho indica que los buenos resultados obtenidos con el modelo II para cada uno de los valores de pH individuales están falseados por la influencia de los datos de L-dopa y 2-metil-L-dopa y que sólo el modelo III es capaz de describir adecuadamente el comportamiento de retención de las catecolaminas en función de su hidrofobicidad y grado de ionización a todos los valores de pH de la fase móvil ensayados.



V.3.3.- Relaciones $\log k$ - hidrofobicidad para diuréticos

Los diuréticos son compuestos con una amplia variedad de estructuras químicas y propiedades físico-químicas (Anexo II, apartado XII.2.13). Acetazolamida, bendroflumetazida, clortalidona, hidroclorotiazida y xipamida son ácidos débiles; ácido etacrínico, bumetanida, furosemida y probenecid son diuréticos con un carácter ácido más fuerte, amilorida y triamtereno son compuestos básicos, y espironolactona es neutro.

Los factores de retención mostrados en la Tabla V.2 para una serie de diuréticos eluidos con fases móviles de SDS 0.15 M preparadas a diferentes valores de pH (pH 3.31 - 6.81) se tomaron de la bibliografía (*Bonet-Domingo E. y col., 1994*). En dicha Tabla también se muestran las expresiones utilizadas para el cálculo de los valores de $\log \delta_i$ y α a los valores de pH de las fases

móviles consideradas. En los cálculos se utilizaron las constantes de protonación en medio de micelar de SDS de ácido etacrínico ($\log K_{H1}$), bumetanida ($\log K_{H3}$), furosemida ($\log K_{H2}$), probenecid ($\log K_{H1}$) y xipamida ($\log K_{H2}$).

Los factores de retención de estos diuréticos obtenidos con SDS 0.15 M a diferentes valores de pH (pH 3.31 - 6.81), junto con los valores de $\log P$, $\log D$ y los valores correspondientes de $\log \delta_i$ y α se ajustaron a los modelos I, II y III. En la Tabla V.7 se muestran los estadísticos de regresión obtenidos.

En primer lugar cabe destacar que cuando los valores de $\log k$ obtenidos para los diuréticos se correlacionaron directamente con sus valores $\log P$, se obtuvieron resultados muy malos ($r^2 = 0.65$; $r'^2 = 0.62$; $F = 19$; $p = 0.0015$; $s_{y/x} = 0.28$, para el modelo a pH 3.31 y $r^2 = 0.05$; $r'^2 < 0.0001$; $F = 0.6$; $p = 0.4703$; $s_{y/x} = 0.56$, para el modelo a pH 6.81) como consecuencia de la diversidad estructural y de los diferentes grados de ionización de los diuréticos estudiados. Además, los parámetros estadísticos de los modelos fueron empeorando a medida que el pH aumentó de 3.31 a 6.81. Este hecho es debido a que a pH 3.31 sólo amilorida y triamtereno están ionizados ($\alpha \sim +1$) y para el resto de diuréticos predomina la forma neutra del compuesto ($\alpha \sim 0$). Mientras que a medida que aumenta el pH de la fase móvil existen mayores diferencias entre los grados de ionización de cada uno de los diuréticos y su carga.

Como se puede observar en la Tabla V.7, el modelo I proporcionó los peores resultados y ninguno de los modelos obtenidos para cada uno de los valores de pH individuales fue estadísticamente significativo para un $NC = 95\%$ ($r^2 \leq 0.28$; $r'^2 \leq 0.21$; $F \leq 4$; $p \geq 0.0783$; $s_{y/x} \geq 0.42$). El modelo II mejoró las correlaciones pero las regresiones y los coeficientes de ajuste sólo fueron estadísticamente significativos en los modelos obtenidos para pH 3.31 y 4.8 ($0.20 \leq r^2 \leq 0.89$; $0.02 \leq r'^2 \leq 0.87$; $1 \leq F \leq 38$; $p \geq 0.0001$; $s_{y/x} \geq 0.16$). Como se puede observar, los coeficientes b_1 y b_2 obtenidos para el modelo II a pH 3.31 (el mejor de los resultados) fueron estadísticamente diferentes, lo que sugiere que la contribución de los valores de $\log P$ y de $\log \delta_i$ a la retención de los diuréticos es diferente. El resto de modelos I y II proporcionaron muy malos resultados debido a que los compuestos muestran diferencias significativas en su grado de ionización.

Tabla V.7.- Análisis estadístico de las regresiones lineales para diuréticos ^a.

pH	<i>n</i>	$b_0 \pm ts_{b_0}$ (<i>p</i>)	$b_1 \pm ts_{b_1}$ (<i>p</i>)	$b_2 \pm ts_{b_2}$ (<i>p</i>)	r^2 (r'^2)	<i>F</i> (<i>p</i>)	<i>S_{y/x}</i>
Modelo I: $\log k = b_0 + b_1 \log D$							
3.31	12	0.8 ± 0.3 (0.0002)	0.07 ± 0.10 ^b (0.1822)	-	0.17 (0.09)	2 (0.1822) ^c	0.44
4.8	12	0.7 ± 0.3 (0.0008)	0.09 ± 0.12 ^b (0.1315)	-	0.21 (0.13)	3 (0.1315) ^c	0.42
5.36	12	0.6 ± 0.3 (0.0018)	0.09 ± 0.13 ^b (0.1403)	-	0.20 (0.12)	3 (0.1403) ^c	0.42
6.02	12	0.5 ± 0.4 (0.0126)	0.11 ± 0.16 ^b (0.1559)	-	0.19 (0.11)	2 (0.1559) ^c	0.45
6.81	12	0.3 ± 0.4 ^b (0.0925)	0.17 ± 0.19 ^b (0.0783)	-	0.28 (0.21)	4 (0.0783) ^c	0.49
3.31-6.81	60	0.58 ± 0.13 (<0.0001)	0.10 ± 0.05 (0.0004)	-	0.19 (0.18)	14 (0.0004)	0.44
Modelo II: $\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \log \delta_i$							
3.31	12	0.3 ± 0.2 (0.0144)	0.25 ± 0.07 (<0.0001)	-0.14 ± 0.07 (0.0014)	0.89 (0.87)	38 (<0.0001)	0.16
4.8	12	0.3 ± 0.3 ^b (0.0964)	0.22 ± 0.10 (0.0010)	-0.18 ± 0.17 (0.0346)	0.73 (0.67)	12 (0.0029)	0.26
5.36	12	0.3 ± 0.4 ^b (0.1223)	0.17 ± 0.14 (0.0245)	-0.1 ± 0.3 ^b (0.3153)	0.46 (0.34)	4 (0.0623) ^c	0.37
6.02	12	0.4 ± 0.5 ^b (0.1019)	0.11 ± 0.18 ^b (0.1840)	0.1 ± 0.4 ^b (0.6486)	0.20 (0.02)	1 (0.3762) ^c	0.47
6.81	12	0.5 ± 0.5 (0.0457)	0.14 ± 0.19 ^b (0.1381)	0.3 ± 0.3 (0.0484)	0.40 (0.27)	3 (0.1002) ^c	0.47
3.31-6.81	60	0.40 ± 0.19 (0.0001)	0.15 ± 0.06 (<0.0001)	0.00 ± 0.10 ^b (0.9430)	0.27 (0.25)	11 (0.0001)	0.42
Modelo III: $\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \alpha$							
3.31	12	0.26 ± 0.16 (0.0063)	0.26 ± 0.05 (<0.0001)	0.6 ± 0.3 (0.0004)	0.92 (0.90)	52 (<0.0001)	0.14
4.8	12	0.3 ± 0.2 (0.0085)	0.27 ± 0.08 (<0.0001)	0.5 ± 0.3 (0.0010)	0.87 (0.84)	30 (0.0001)	0.18
5.36	12	0.3 ± 0.2 (0.0119)	0.26 ± 0.09 (0.0001)	0.6 ± 0.3 (0.0009)	0.84 (0.80)	23 (0.0003)	0.17
6.02	12	0.3 ± 0.2 (0.0315)	0.25 ± 0.11 (0.0004)	0.7 ± 0.3 (0.0004)	0.81 (0.76)	19 (0.0006)	0.23
6.81	12	0.3 ± 0.3 ^b (0.0140)	0.23 ± 0.11 (0.0012)	0.8 ± 0.3 (0.0001)	0.83 (0.79)	22 (0.0004)	0.25
3.31-6.81	60	0.27 ± 0.08 (<0.0001)	0.26 ± 0.3 (<0.0001)	0.68 ± 0.10 (<0.0001)	0.83 (0.82)	136 (<0.0001)	0.21

^a Detalles acerca de los parámetros estadísticos en el apartado III.5.

^b Coeficiente de ajuste estadísticamente no significativo para un nivel de confianza del 95%: $b_i < t_{\alpha/2, \nu} \cdot s_{b_i}$; $p > 0.05$.

^c Modelo estadísticamente no significativo para un nivel de confianza del 95% ($p > 0.05$).

El modelo III proporcionó, aunque moderados, los mejores resultados y tanto los coeficientes de ajuste como los modelos fueron estadísticamente significativos para todos los valores de pH estudiados ($r^2 \geq 0.81$; $r'^2 \geq 0.76$; $F \geq 19$; $p < 0.0006$; $s_{y/x} \leq 0.25$). Sin embargo, se obtuvieron resultados más pobres a medida que aumentó el pH de la fase móvil. Este hecho es posiblemente atribuible a que no se disponía del valor de $\log K_H$ del triamtereno en medio micelar de SDS y se utilizó el valor en medio acuoso ($\log K_H = 6.2$). Tal y como se ha comentado en el apartado I.4.3, los medios micelares (especialmente con surfactantes iónicos) pueden modificar las constantes de protonación de los compuestos debido a la diferente afinidad de las especies ácido-base por las micelas, observándose un aumento en las mismas cuando se utilizan surfactantes aniónicos. De este modo, los valores de α obtenidos con $\log K_H$ del triamtereno en medio acuoso variaron de $\alpha = 0.9987$ (a pH 3.31) hasta $\alpha = 0.1971$ (a pH 6.81) mientras que los factores de retención (Tabla V.2) se mantuvieron constantes a lo largo de todo el intervalo de pH ensayado.

Por otro lado, con los modelos globales obtenidos utilizando los datos para todas las fases móviles, se confirman los resultados obtenidos para los modelos individuales y el modelo III proporcionó de nuevo los mejores resultados.

Los resultados obtenidos sugieren que para compuestos con carga neta diferente sólo parece ser válido el modelo III debido a que el modelo considera que la retención depende de la hidrofobicidad y de las interacciones electrostáticas (variable α) que pueden ser atractivas o repulsivas y pueden aumentar o disminuir la retención.

V.3.4.- Relaciones $\log k'$ - hidrofobicidad para derivados OPA-NAC de aminoácidos

Los datos de retención utilizados en este estudio se tomaron de la bibliografía (*Catalá-Icardo M. y col., 1995*), donde los derivados OPA-NAC de 16 aminoácidos proteicos primarios se cromatografiaron en una columna C_{18} con fases móviles de SDS 0.05 M a diferentes valores de pH en el intervalo 3.1-3.6 (Tabla V.3).

En el Anexo II (apartado XII.2.12) se muestran las estructuras y los valores de $\log P$ y $\log K_{Hi}$ de los aminoácidos derivatizados con el reactivo OPA-NAC. El grupo amino primario de los aminoácidos reacciona con OPA ("*o*-*phtalaldehyde*") en presencia de NAC ("*N*-*acetyl-L-cysteine*") para formar isoindoles 1-alquiltio-2-alquil sustituidos (derivados OPA-NAC). Tal y como se puede observar en el Anexo II, los derivados de aminoácidos estudiados sólo difieren en la naturaleza de los sustituyentes R_1 . De modo que las interacciones electrostáticas entre los derivados y un surfactante cargado sólo son posibles para el grupo α -carboxilo del aminoácido y para los aminoácidos con un grupo R_1 ionizable (ácido aspártico y ácido glutámico que presentan un grupo carboxilo; arginina, histidina y lisina que presentan un grupo amino, cisteína que contiene un grupo tiol y tirosina un grupo fenol).

Cuando los valores de retención, $\log k'$, de los derivados OPA-NAC de aminoácidos se correlacionaron con sus valores de $\log P$ se obtuvieron correlaciones muy pobres ($r^2 \leq 0.34$; $r'^2 \leq 0.29$; $F \leq 7$; $p \geq 0.0218$; $s_{y/x} \geq 0.37$) debido a las grandes diferencias existentes en los grados de ionización de los compuestos estudiados a los valores de pH ensayados. Por tanto, para la obtención de modelos $\log k'$ - hidrofobicidad es necesario incluir algún tipo de parámetro que tenga en cuenta la ionización de los compuestos.

En la Tabla V.8 se muestran los estadísticos de regresión obtenidos para los modelos I, II y III. Como se puede observar, el modelo I proporcionó los peores resultados para todos los valores de pH individuales estudiados ($r^2 \leq 0.31$; $r'^2 \leq 0.23$; $F \leq 5$; $p \geq 0.0480$; $s_{y/x} \geq 0.22$). Con el modelo II se obtuvieron correlaciones ligeramente mejores, pero los estadísticos de regresión fueron muy pobres ($r^2 \leq 0.47$; $r'^2 \leq 0.39$; $F \leq 5$; $p \geq 0.0214$; $s_{y/x} \geq 0.35$) y tanto los coeficientes de ajuste como los modelos no fueron estadísticamente significativos a un $NC = 95\%$ en la mayoría de casos. En contraste, el modelo III proporcionó, aunque moderados, los mejores resultados en todos los casos ($r^2 \leq 0.93$; $r'^2 \leq 0.91$; $F \leq 51$; $s_{y/x} \geq 0.15$) y tanto los coeficientes de ajuste como los modelos fueron estadísticamente significativos a un $NC = 95\%$ ($p \leq 0.0024$).

Los resultados obtenidos con los modelos para cada valor de pH fueron consistentes con los obtenidos al realizar las regresiones globales con los datos de todas las fases móviles estudiadas. Este comportamiento sugiere, como en el caso de los diuréticos, que para compuestos con carga neta diferente sólo es válido el modelo III.

Tabla V.8.- Análisis estadístico de las regresiones lineales para derivados con OPA-NAC de aminoácidos ^a.

pH	n	$b_0 \pm ts_{b_0}$ (p)	$b_1 \pm ts_{b_1}$ (p)	$b_2 \pm ts_{b_2}$ (p)	r^2 (r ²)	F (p)	$s_{y/x}$
Modelo I: $\log k = b_0 + b_1 \log D$							
3.1	15	0.7 ± 0.3 (0.0007)	0.2 ± 0.2 (0.0480)	-	0.27 (0.21)	5 (0.0480)	0.39
3.2	14	0.8 ± 0.4 (0.0007)	0.2 ± 0.2 (0.0492)	-	0.29 (0.23)	5 (0.0492)	0.39
3.45	11	0.5 ± 0.5 ^b (0.0545)	0.2 ± 0.3 ^b (0.0745)	-	0.31 (0.23)	4 (0.0745) ^c	0.42
3.5	15	0.3 ± 0.4 ^b (0.1081)	0.2 ± 0.2 (0.0428)	-	0.28 (0.22)	5 (0.0428)	0.45
3.6	15	0.2 ± 0.4 ^b (0.3050)	0.2 ± 0.2 ^b (0.0799)	-	0.22 (0.16)	4 (0.0799) ^c	0.48
3.1-3.6	70	0.48 ± 0.18 (<0.0001)	0.22 ± 0.09 (<0.0001)	-	0.24 (0.23)	22 (<0.0001)	0.46
Modelo II: $\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \log \delta_i$							
3.1	15	0.3 ± 0.6 ^b (0.3215)	0.3 ± 0.2 (0.0070)	-0.8 ± 1.0 ^b (0.1110)	0.47 (0.39)	5 (0.0214)	0.35
3.2	14	0.6 ± 0.6 ^b (0.0676)	0.2 ± 0.2 (0.0362)	-0.3 ± 1.1 ^b (0.5804)	0.34 (0.22)	3 (0.1008) ^c	0.39
3.45	11	0.6 ± 1.1 ^b (0.2282)	0.2 ± 0.3 ^b (0.1705)	0.5 ± 1.7 ^b (0.5414)	0.32 (0.15)	2 (0.2151) ^c	0.45
3.5	15	0.8 ± 0.9 ^b (0.0740)	0.2 ± 0.2 ^b (0.1707)	1.1 ± 1.5 ^b (0.1239)	0.37 (0.27)	4 (0.0609) ^c	0.44
3.6	15	1.0 ± 0.9 (0.0312)	0.1 ± 0.2 ^b (0.2949)	1.4 ± 1.3 (0.0309)	0.43 (0.34)	5 (0.0335)	0.42
3.1-3.6	70	0.7 ± 0.3 (<0.0001)	0.18 ± 0.10 (0.0009)	0.7 ± 0.5 (0.0110)	0.28 (0.26)	13 (<0.0001)	0.45
Modelo III: $\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \alpha$							
3.1	15	0.58 ± 0.18 (<0.0001)	0.32 ± 0.09 (<0.0001)	0.8 ± 0.2 (<0.0001)	0.89 (0.87)	47 (<0.0001)	0.16
3.2	14	0.61 ± 0.16 (<0.0001)	0.34 ± 0.08 (<0.0001)	0.8 ± 0.2 (<0.0001)	0.91 (0.89)	52 (<0.0001)	0.15
3.45	11	0.4 ± 0.2 (0.0043)	0.41 ± 0.11 (<0.0001)	0.9 ± 0.2 (<0.0001)	0.93 (0.91)	51 (<0.0001)	0.15
3.5	15	0.5 ± 0.3 (0.0006)	0.27 ± 0.11 (<0.0001)	0.9 ± 0.3 (0.0002)	0.84 (0.82)	32 (<0.0001)	0.22
3.6	15	0.5 ± 0.3 (0.0024)	0.23 ± 0.13 (<0.0001)	0.9 ± 0.3 (0.0020)	0.80 (0.77)	25 (0.0001)	0.25
3.1-3.6	70	0.53 ± 0.11 (<0.0001)	0.31 ± 0.05 (<0.0001)	0.90 ± 0.12 (<0.0001)	0.82 (0.82)	156 (<0.0001)	0.22

^a Detalles acerca de los parámetros estadísticos en el apartado III.5.

^b Coeficiente de ajuste estadísticamente no significativo para un nivel de confianza del 95%.

^c Modelo estadísticamente no significativo para un nivel de confianza del 95%.

V.3.5.- Relaciones $\log k$ - hidrofobicidad para anestésicos locales

Los anestésicos locales son compuestos hidrófobos con valores de $\log P$ comprendidos entre 1.75 (mepivacaína) y 4.63 (propanocaína) y con carácter básico que le confiere la presencia de un grupo amino en su molécula ($\log K_H \geq 7.53$) (Anexo II, apartado XII.2.1). A pH 7.4, todos ellos presentan carga positiva y a excepción de la propanocaína ($\alpha = 0.5743$) y mepivacaína ($\alpha = 0.6661$) no existen diferencias significativas en su grado de ionización ($\alpha > 0.75$).

En la Tabla V.4 se muestran los factores de retención de los anestésicos locales obtenidos a tres concentraciones diferentes de Brij35 (surfactante no iónico) en la fase móvil, todas ellas a pH 7.4.

Los valores de $\log k$, $\log P$, $\log D$, $\log \delta$ y α se ajustaron a los modelos I, II y III mediante técnicas de regresión lineal simple y múltiple. En la Tabla V.9 se muestran los estadísticos de regresión obtenidos.

A diferencia de lo observado hasta ahora para los compuestos estudiados en este Capítulo, se obtuvieron buenas correlaciones directas $\log k - \log P$, en todos los casos (p. ej., $r^2 = 0.94$; $r^2 = 0.93$; $F = 94$; $p = 0.0001$; $s_{y/x} = 0.12$, para el modelo obtenido con una concentración de Brij35 0.06 M). Estos resultados indican que las diferencias en la retención de los anestésicos locales son debidas a las diferencias en su hidrofobicidad a pH 7.4 y que las diferencias en su grado de ionización a dicho pH no son tan importantes como en los otros casos estudiados. Además, hay que tener en cuenta que el Brij35 es un surfactante no iónico, por tanto, no existen interacciones electrostáticas entre los solutos cargados y el Brij35 presente en el sistema cromatográfico.

Estos resultados son consistentes con los obtenidos con los modelos I, II y III. Como se puede observar en la Tabla V.9, los tres modelos proporcionaron resultados similares y fueron estadísticamente significativos para un $NC = 95\%$. Los modelos II y III proporcionaron coeficientes de determinación similares y ligeramente mejores a los obtenidos con el modelo I. Sin embargo, los coeficientes de ajuste b_2 no fueron estadísticamente significativos poniendo de manifiesto, como se ha comentado anteriormente, que las diferencias en la retención de los anestésicos locales bajo las condiciones cromatográficas estudiadas son principalmente debidas a las diferencias en su hidrofobicidad y que las diferencias en su grado de ionización no son significativas. Este hecho explica los buenos resultados proporcionados por los modelos I y II, y concuerda con las afirmaciones realizadas en los apartados anteriores, según las cuales cabe esperar que estos modelos sólo proporcionen buenos resultados cuando los compuestos no muestran diferencias significativas en su carga y grado de ionización.



Tabla V.9.- Análisis estadístico de las regresiones lineales para anestésicos locales ^a.

[Brij35]	<i>n</i>	$b_0 \pm ts_{b_0}$ (<i>p</i>)	$b_1 \pm ts_{b_1}$ (<i>p</i>)	$b_2 \pm ts_{b_2}$ (<i>p</i>)	r^2 (<i>r</i> ²)	<i>F</i> (<i>p</i>)	<i>S_{y/x}</i>
Modelo I: $\log k = b_0 + b_1 \log D$							
0.02 M	6	0.8 ± 0.2 (0.0006)	0.43 ± 0.13 (0.0007)	-	0.96 (0.95)	88 (0.0007)	0.09
0.04 M	7	0.7 ± 0.3 (0.0031)	0.42 ± 0.16 (0.0010)	-	0.90 (0.88)	47 (0.0010)	0.14
0.06 M	8	0.7 ± 0.2 (0.0005)	0.36 ± 0.10 (0.0001)	-	0.93 (0.92)	80 (0.0001)	0.13
Modelo II: $\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \log \delta_j$							
0.02 M	6	0.7 ± 0.3 (0.0087)	0.45 ± 0.11 (0.0010)	0.3 ± 0.3 ^b (0.0492)	0.98 (0.97)	83 (0.0024)	0.06
0.04 M	7	0.5 ± 0.3 (0.0081)	0.40 ± 0.09 (0.0003)	0.1 ± 0.2 ^b (0.2190)	0.98 (0.97)	84 (0.0005)	0.10
0.06 M	8	0.5 ± 0.3 (0.0123)	0.38 ± 0.08 (0.0001)	0.2 ± 0.2 ^b (0.1137)	0.97 (0.95)	70 (0.0002)	0.08
Modelo III: $\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \alpha$							
0.02 M	6	1.1 ± 0.8 (0.0248)	0.48 ± 0.14 (0.0017)	-0.9 ± 1.1 ^b (0.0824)	0.98 (0.96)	60 (0.0038)	0.08
0.04 M	7	0.8 ± 0.6 (0.0225)	0.41 ± 0.09 (0.0002)	-0.6 ± 0.8 ^b (0.1391)	0.98 (0.97)	102 (0.0004)	0.07
0.06 M	8	0.8 ± 0.5 (0.0103)	0.37 ± 0.02 (<0.0001)	-0.6 ± 0.6 ^b (0.0495)	0.97 (0.96)	95 (0.0001)	0.09

^a Detalles acerca de los parámetros estadísticos en el apartado III.5.

^b Coeficiente de ajuste estadísticamente no significativo para un nivel de confianza del 95%.

Si se compararan los valores obtenidos para el coeficiente de ajuste b_1 relacionado con la hidrofobicidad de las moléculas para cada uno de los modelos se observa que al aumentar la concentración de Brij35 en la fase móvil los valores del coeficiente de ajuste de b_1 disminuyen. Esta observación puede deberse a que al aumentar la concentración de surfactante en la fase móvil disminuye la retención de todos los anestésicos locales, pero esta disminución es más acusada para los compuestos más hidrófobos, por tanto, las diferencias de retención entre los anestésicos son menores, haciendo que el sistema cromatográfico sea menos sensible a la hidrofobicidad.

Finalmente, aunque los coeficientes de ajuste b_2 en los modelos II y III no son estadísticamente significativos se puede extraer información cualitativa. Así en el modelo II, los valores de los coeficientes de ajuste b_2 relacionados con $\log \delta_i$ ($\log \delta_i < 0$) son positivos, lo que indica que los anestésicos locales ionizados eluidos con un tensioactivo no iónico como el Brij35 se retienen menos que su forma neutra, como era de esperar. Este resultado está en concordancia con los valores negativos de b_2 ($\alpha > 0$) obtenidos en el modelo III.

Para confirmar los resultados obtenidos se realizaron modelos globales utilizando los datos de retención obtenidos con las tres fases móviles y se incluyó la concentración de Brij35 en la fase móvil como variable independiente adicional. En la Tabla V.10 se muestran los valores de los parámetros estadísticos obtenidos para cada uno de los modelos. Tal y como se puede observar, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con las fases móviles individuales, a excepción de los valores del coeficiente asociado a la ionización, b_2 , en los modelos II y III que en este caso fueron estadísticamente significativos y su signo indica que la forma ionizada de anestésicos locales se retiene menos que la neutra, tal y como se ha comentado anteriormente. Finalmente, los valores del coeficiente asociado a la concentración de Brij35 en la fase móvil, b_3 , fueron negativos en los tres modelos, lo que es consistente con la disminución en la retención de los anestésicos locales al aumentar la concentración de Brij35.

Tabla V.10.- Análisis estadístico de las regresiones en las que se incluye como variable independiente la concentración de surfactante en la fase móvil para anestésicos locales ^a.

Modelo ^b	<i>n</i>	$b_0 \pm ts_{b_0}$ (<i>p</i>)	$b_1 \pm ts_{b_1}$ (<i>p</i>)	$b_2 \pm ts_{b_2}$ (<i>p</i>)	$b_3 \pm ts_{b_3}$ (<i>p</i>)	r^2 (<i>r</i> ²)	<i>F</i> (<i>p</i>)	<i>S_{y/x}</i>
I	21	1.02 ± 0.17 (<0.0001)	0.39 ± 0.06 (<0.0001)	-	-7 ± 3 (0.0004)	0.92 (0.95)	106 (<0.0001)	0.12
II	21	0.82 ± 0.15 (<0.0001)	0.40 ± 0.04 (<0.0001)	0.18 ± 0.11 (0.0019)	-7 ± 2 (<0.0001)	0.96 (0.96)	151 (<0.0001)	0.08
III	21	1.2 ± 0.3 (<0.0001)	0.40 ± 0.04 (<0.0001)	-0.6 ± 0.3 (0.0013)	-7 ± 2 (<0.0001)	0.97 (0.96)	157 (<0.0001)	0.08

^a Detalles acerca de los parámetros estadísticos en el apartado III.5.

^b Modelos:

I: $\log k = b_0 + b_1 \log D + b_3$ [Brij35]

II: $\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \log \delta_i + b_3$ [Brij35]

III: $\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \alpha + b_3$ [Brij35]

V.3.6.- Relaciones $\log k'$ - hidrofobicidad para antiinflamatorios no esteroideos

En el Anexo II (apartado XII.2.5) se muestran las estructuras, los valores de $\log P$ y $\log K_{H_i}$ de los 16 antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) incluidos en el estudio. Tal y como se puede observar, los AINEs estudiados cubren un amplio intervalo de hidrofobicidad ($1.19 \leq \log P \leq 5.19$) y a excepción de ibuproxam, nabumetona y piketoprofeno, presentan un grupo carboxilo en su molécula ($2.97 \leq \log K_{H_i} \leq 5.20$, en medio acuoso). Ibuproxam y piketoprofeno son amidas ($\log K_{H_i} < 0$, en medio acuoso), piketoprofeno además presenta un nitrógeno piridínico ($\log K_{H_i} \sim 2 - 4$, en medio acuoso) y nabumetona posee un grupo carbonilo y un grupo alcoxilo no ionizables. Por tanto, a pH 7.4 la mayoría de los AINEs presentan carga negativa ($\alpha \sim -1$) e ibuproxam, nabumetona y piketoprofeno no están cargados ($\alpha = 0$).

En la Tabla V.5 se muestran los factores de retención de los AINEs obtenidos a tres concentraciones diferentes de Brij35 en la fase móvil a pH 7.4. Cuando los valores de $\log k'$ de los AINEs obtenidos para una fase móvil dada se correlacionaron con los valores correspondientes de $\log P$ relativos a las formas no ionizadas de los compuestos, se obtuvieron estadísticos muy pobres ($r^2 \leq 0.41$; $r'^2 \leq 0.36$; $F \leq 10$; $p \geq 0.0075$; $s_{y/x} \geq 0.35$). Estos resultados sugieren que es necesario tener en cuenta el grado de ionización de los AINEs para establecer relaciones $\log k' -$ hidrofobicidad.

En la Tabla V.11 se muestran los estadísticos de regresión obtenidos para los modelos I, II y III. Como se puede observar, en general los resultados proporcionados por el modelo III ($r^2 \geq 0.88$; $r'^2 \geq 0.87$; $F \geq 50$; $p < 0.0001$; $s_{y/x} \leq 0.14$) fueron mejores que los del modelo I y II. Los modelos I y II también mostraron resultados adecuados debido probablemente al uso del tensioactivo no iónico Brij35 y a que sólo tres compuestos marcan las diferencias en los grados de ionización. Por otro lado, la similitud entre los valores de los coeficientes de ajuste, b_1 y b_2 , obtenidos para el modelo II indica que para estos compuestos y en estas condiciones cromatográficas, la contribución de la hidrofobicidad y de la carga de los compuestos a la retención es similar, lo que justifica la concordancia entre los estadísticos obtenidos para los modelos I y II.

Por otro lado, al aumentar la concentración de Brij35 en la fase móvil se observa que los valores del coeficiente de ajuste b_1 disminuyen en los tres modelos al igual que en el caso de los anestésicos locales. Como se ha comentado anteriormente, este comportamiento puede atribuirse a la disminución más acusada de la retención de los compuestos más hidrófobos al aumentar la concentración de surfactante en la fase móvil.

Tabla V.11.- Análisis estadístico de las regresiones lineales para antiinflamatorios no esteroideos ^a.

[Brij35]	<i>n</i>	$b_0 \pm ts_{b_0}$ (<i>p</i>)	$b_1 \pm ts_{b_1}$ (<i>p</i>)	$b_2 \pm ts_{b_2}$ (<i>p</i>)	r^2 (<i>r</i> ²)	<i>F</i> (<i>p</i>)	<i>S_{y/x}</i>
Modelo I: $\log k = b_0 + b_1 \log D$							
0.02 M	16	1.22 ± 0.10 (<0.0001)	0.23 ± 0.05 (<0.0001)	-	0.87 (0.86)	96 (<0.0001)	0.16
0.04 M	16	1.02 ± 0.09 (<0.0001)	0.20 ± 0.05 (<0.0001)	-	0.86 (0.85)	85 (<0.0001)	0.15
0.06 M	16	0.90 ± 0.09 (<0.0001)	0.19 ± 0.05 (<0.0001)	-	0.84 (0.82)	71 (<0.0001)	0.15
Modelo II: $\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \log \delta_i$							
0.02 M	16	1.1 ± 0.4 (0.0001)	0.26 ± 0.10 (0.0001)	0.22 ± 0.07 (<0.0001)	0.88 (0.86)	47 (<0.0001)	0.17
0.04 M	16	1.0 ± 0.4 (0.0001)	0.21 ± 0.09 (<0.0001)	0.20 ± 0.06 (0.0002)	0.86 (0.84)	40 (<0.0001)	0.16
0.06 M	16	0.9 ± 0.4 (0.0002)	0.19 ± 0.09 (0.0008)	0.19 ± 0.06 (<0.0001)	0.84 (0.81)	33 (<0.0001)	0.16
Modelo III: $\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \alpha$							
0.02 M	16	1.0 ± 0.3 (<0.0001)	0.31 ± 0.08 (<0.0001)	0.8 ± 0.2 (<0.0001)	0.91 (0.90)	66 (<0.0001)	0.14
0.04 M	16	0.9 ± 0.3 (<0.0001)	0.25 ± 0.08 (<0.0001)	0.72 ± 0.19 (<0.0001)	0.90 (0.88)	57 (<0.0001)	0.13
0.06 M	16	0.8 ± 0.3 (0.0001)	0.23 ± 0.08 (<0.0001)	0.7 ± 0.18 (<0.0001)	0.88 (0.87)	50 (<0.0001)	0.13

^a Detalles acerca de los parámetros estadísticos en el apartado III.5.

Finalmente, en el modelo II los valores del coeficiente de ajuste b_2 asociado a $\log \delta_i$ ($\log \delta_i < 0$) son positivos, lo que indica que la retención de la forma iónica de los AINEs eluidos con Brij35 es menor que la de su forma neutra. Este hecho está de acuerdo con los resultados obtenidos en el modelo III, que muestra valores positivos de b_2 ($\alpha \sim -1$).

Al igual que en el caso de los anestésicos locales, se realizaron modelos globales en los que se incluyó la concentración de Brij35 en la fase móvil como variable adicional y se utilizaron todos los datos de retención obtenidos con las tres fases móviles. En la Tabla V.12 se muestran los valores de los parámetros estadísticos obtenidos para cada uno de los modelos. Tal y como se puede observar, se obtuvieron resultados consistentes con los obtenidos con las fases móviles individuales. Además, los valores del coeficiente de ajuste relacionado con la concentración de Brij35 en la fase móvil (b_3) fueron negativos en los tres modelos, lo que concuerda con la disminución en los valores de $\log k$ observada al aumentar la concentración de Brij35.

Tabla V.12.- Análisis estadístico de las regresiones en las que se incluye la concentración de surfactante en la fase móvil para antiinflamatorios no esteroideos ^a.

Modelo ^b	<i>n</i>	$b_0 \pm ts_{b_0}$ (<i>p</i>)	$b_1 \pm ts_{b_1}$ (<i>p</i>)	$b_2 \pm ts_{b_2}$ (<i>p</i>)	$b_3 \pm ts_{b_3}$ (<i>p</i>)	r^2 r'^2	<i>F</i> (<i>p</i>)	<i>S_{y/x}</i>
I	48	1.4 ± 0.13 (<0.0001)	0.21 ± 0.03 (<0.0001)	-	-9 ± 3 (<0.0001)	0.87 (0.86)	147 (<0.0001)	0.16
II	48	1.3 ± 0.2 (<0.0001)	0.22 ± 0.05 (<0.0001)	0.20 ± 0.03 (<0.0001)	-9 ± 3 (<0.0001)	0.87 (0.86)	97 (<0.0001)	0.16
III	48	1.2 ± 0.2 (<0.0001)	0.26 ± 0.04 (<0.0001)	0.73 ± 0.10 (<0.0001)	-9 ± 2 (<0.0001)	0.90 (0.90)	135 (<0.0001)	0.14

^a Detalles acerca de los parámetros estadísticos en el aparte III.5.

^b Modelos:

I: $\log k = b_0 + b_1 \log D + b_3$ [Brij35]

II: $\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \log \delta_i + b_3$ [Brij35]

III: $\log k = b_0 + b_1 \log P + b_2 \alpha + b_3$ [Brij35]

V.4.- Conclusiones

A partir de los resultados mostrados se pueden extraer algunas conclusiones. Para establecer relaciones $\log k'$ - hidrofobicidad para compuestos ionizables, es necesario tener en cuenta el grado de ionización de los compuestos. De los tres modelos ensayados, el modelo III proporcionó mejores resultados que los obtenidos con los modelos I y II, y los resultados obtenidos con el modelo II fueron mejores que los correspondientes obtenidos con el modelo I.

Una limitación del modelo I es que considera que las contribuciones de la hidrofobicidad y de la carga de los compuestos a la retención son las mismas. Cuando estas contribuciones son diferentes (p. ej., catecolaminas, diuréticos, derivados OPA-NAC de aminoácidos eluidos con fases móviles micelares de SDS) se obtienen correlaciones pobres con el modelo I y cuando son similares se obtienen buenos resultados (p. ej., antiinflamatorios no esteroideos eluidos con Brij35).

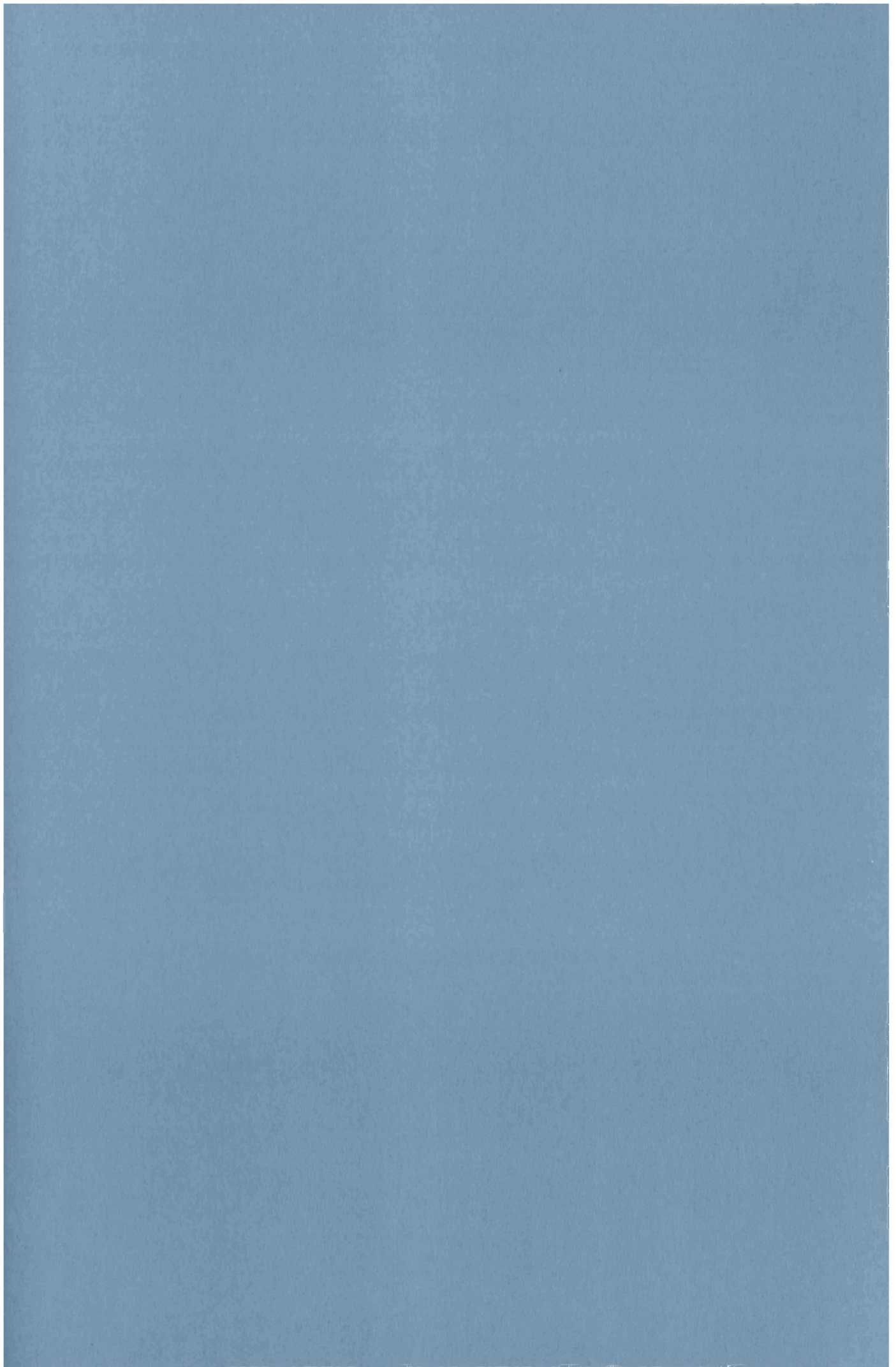
Para compuestos con grado de ionización similar y carga del mismo signo (p. ej., anestésicos locales y antiinflamatorios no esteroideos eluidos con fases móviles de Brij35), los resultados obtenidos con los modelos II y III son equivalentes. Sin embargo, para compuestos con carga neta diferente (p. ej., diuréticos y aminoácidos) sólo el modelo III proporcionó correlaciones adecuadas. Además en estos casos, para una serie de compuestos el coeficiente de ajuste k_1 en el modelo III permanece constante a todos los valores de pH. Este comportamiento indica que la contribución de la hidrofobicidad a la retención no varía al variar el pH de la fase móvil. Por tanto, el modelo III aísla correctamente la contribución de la hidrofobicidad de los compuestos a la retención.

CAPÍTULO VI

Relaciones Cuantitativas Retención-Hidrofobicidad en Cromatografía Líquida Micelar

III.- Modelos Generales en Cromatografía Micelar de Bio-Reperto

VI.1.- Introducción	157
VI.2.- Experimental y metodología	159
VI.2.1.- Experimental	159
VI.2.2.- Cálculo de los factores de retención	160
VI.2.3.- Capacidad de descripción y predicción de los modelos	160
VI.3.- Resultados y discusión	164
VI.3.1.- Interacciones que gobiernan la retención en CMB. Estudio univariante	171
VI.3.2.- Variables para la descripción de la retención en CMB. Estudio multivariante	177
VI.3.3.- Modelos de retención	179
VI.3.3.1- Modelos MLR	179
VI.3.3.2- Modelos no lineales alternativos	183
VI.4.-Conclusiones	187



VI.1.- Introducción

Las relaciones cuantitativas estructura-retención (QSRRs) representan una de las aplicaciones de las relaciones extratermodinámicas denominadas relaciones lineales de energía libre (LFERs) de uso más extendido. Tal y como se ha comentado en el apartado I.4, en los modelos QSRR se establecen relaciones entre un parámetro de retención cromatográfica obtenido en un determinado sistema cromatográfico para una serie de compuestos y una serie de descriptores moleculares (propiedades físico-químicas y/o descriptores estructurales) de dichos compuestos (*Kaliskan R., 1987*).

Cuando se obtiene un modelo QSRR estadísticamente significativo y con sentido físico-químico para un determinado sistema cromatográfico, dicho modelo se puede emplear con los siguientes propósitos (*Kaliskan R., 1993*):

- i.- La predicción de la retención de un nuevo analito (no incluido en el modelo QSRR) en el sistema cromatográfico bajo estudio.
- ii.- La identificación de los descriptores moleculares más informativos de la retención de los compuestos en el sistema cromatográfico considerado.
- iii.- La elucidación del mecanismo de separación que opera en un determinado sistema cromatográfico.
- iv.- La evaluación de los descriptores moleculares de solutos.
- v.- El estudio de los requerimientos estructurales de los sistemas cromatográficos para emular "in vitro" los procesos de reparto de xenobióticos en las biomembranas.

La estrategia de trabajo aplicada en los estudios QSRR se adoptó de las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSARs). A pesar de la gran variedad de descriptores utilizados como variables independientes en la construcción de los modelos QSRR, se pueden agrupar en las tres mismas categorías que en QSARs: hidrófobos, electrónicos y estéricos (*Kaliskan R., 1993*). También en analogía a los estudios QSAR, la regresión lineal múltiple (MLR) es la estrategia quimiométrica más utilizada para la construcción de los modelos QSRR, por tanto, si se pretende obtener un modelo QSRR que cubra alguno de los objetivos arriba expuestos se deben tener en cuenta los requerimientos de MLR (al menos 5 compuestos por variable y ausencia de colinealidad entre variables). Adicionalmente, se han publicado una serie de recomendaciones que debe presentar un modelo QSRR (*Al-Haj M.A. y col., 1999*):

- i.- Los compuestos seleccionados deben presentar una amplia variedad de propiedades físico-químicas así como una distribución homogénea de las variables dependiente e independientes seleccionadas.

- ii.- Todas las variables independientes incluidas en el modelo QSRR deben ser estadísticamente significativas.
- iii.- El valor del parámetro estadístico desviación estándar de los residuos de y ($s_{y/x}$) debe ser menor de 0.25.

En la actualidad, la mayoría de modelos QSRR desarrollados en cromatografía líquida en fase inversa (RP-HPLC) utilizan como variable dependiente el logaritmo del factor de retención ($\log k$) o su valor extrapolado a una fase móvil acuosa pura sin modificador orgánico ($\log k_w$). Se han recomendado tres tipos de modelos QSRR para solutos neutros (*Al-Haj M.A. y col., 1999; Jiskra J. y col., 2002*):

- i.- La correlación directa de los valores de $\log k$ (o $\log k_w$) de los compuestos con sus respectivos valores del logaritmo de la relación de reparto *n*-octanol/agua ($\log P$) (apartado I.4).
- ii.- El uso de la relación lineal de la energía de solvatación (LSERs) con los descriptores solvatocrómicos de Abraham (ecuación I.8, apartado I.2.4).
- iii.- El uso de descriptores estructurales derivados de programas informáticos de modelado molecular.

Adicionalmente, existen otros modelos QSRR en los que se correlacionan los valores de $\log k$ de una serie de solutos neutros con parámetros relacionados con la polaridad de los solutos, de la fase móvil y de la fase estacionaria, que también han mostrado muy buenos resultados (*Bosch E. y col., 1994; Torres-Lapasó J.R. y col., 2002; 2004*).

En el Capítulo I.4 se han comentado las relaciones existentes entre $\log k$ en RP-HPLC y los valores de $\log P$ para compuestos neutros y "series cortas de datos" de compuestos iónicos congéneres. Estas relaciones son los ejemplos más sencillos de modelos QSRR y se utilizan para estimar los valores de $\log P$ de los compuestos. Sin embargo, estas relaciones fallan cuando el conjunto de compuestos estudiados presentan diversidad estructural y grandes diferencias en su carácter dador/aceptor de puentes de hidrógeno (*Nasal A. y col., 2003; Poole S.K y col., 2003-a; Berthod A. y col., 2004; Valkó K. y col., 2004*). Para la descripción del comportamiento de retención de compuestos no congéneres se han desarrollado ecuaciones multiparamétricas entre las que cabe destacar las basadas en LSERs (*Abraham M.H. y col., 1993; 1997; Tan L.C. y col., 1998; Al-Haj M.A. y col., 1999; García M.A. y col., 2000; 2001*). En todos estos modelos el grado de ionización de los compuestos es cero o constante. Recientemente, se ha desarrollado con éxito un modelo LSERs que incluye un parámetro que considera el grado de ionización de los compuestos y ha mostrado su validez para la predicción de los valores de $\log k$ de un amplio conjunto de compuestos neutros e ionizados en un sistema cromatográfico de fase inversa con fases móviles hidroorgánicas (*Canals I. y col., 2002-b; Espinosa S. y col., 2002-b*).

Los objetivos de este Capítulo son, por un lado, la identificación de los descriptores moleculares responsables de la retención de un compuesto en cromatografía micelar de bio-reparto (CMB) y por otro, el desarrollo de un modelo QSRR que permita la estimación de la retención basado en dichos descriptores. Con este fin, se han obtenido los datos de retención de un conjunto de 151 compuestos no relacionados estructuralmente con diferentes propiedades de hidrofobicidad, tamaño molecular, carácter dador/aceptor de puentes de hidrógeno y propiedades ácido-base y se han evaluado diferentes modelos QSRR multivariantes.

VI.2.- Experimental y metodología

VI.2.1.- Experimental

La preparación de las fases móviles y de las disoluciones de los analitos, así como la longitud de onda de detección se indica en el Capítulo III. En el presente apartado sólo se enumeran detalles concretos no especificados en dicho Capítulo:

- **Fases móviles ensayadas:** polioxietileno(23)lauril éter (Brij35) 0.02M, 0.04M y 0.06M tamponadas a pH 7.4.
- **Fase estacionaria:**
 - Kromasil C₁₈ ($d_p = 5\mu\text{m}$; $L = 50\text{ mm}$; $d_c = 4.6\text{ mm}$) (Scharlab S.L., La Jota, Barcelona, España).
- **Configuración del cromatógrafo:**
 - Sistema de inyección: inyector automático (Serie Agilent 1100), el volumen de inyección fue de 20 μL .
 - Equipo con compartimento termostatzado para columnas HP 1100. Las experiencias se realizaron a 25 °C.
 - Flujo de la fase móvil: 1.5 mL min⁻¹.
 - ChemStation HP (versión A.07.01 [682], ©HP 1999).
- **Analitos:** 151 compuestos no congéneres que se listan en la Tabla VI.1.



VI.2.2.- Cálculo de los factores de retención

Para mejorar la precisión de los factores de retención se utilizó un método basado en el uso de un estándar externo cuyo factor de retención (k_{REF}) se considera constante para una determinada fase estacionaria y fase móvil (*Escuder-Gilabert L. y col., 2004-b*). Como estándar externo se seleccionó acetanilida, compuesto neutro y de hidrofobicidad intermedia. Para la obtención de k_{REF} se inyectó por quintuplicado una disolución de acetanilida en un sistema cromatográfico cuyo tiempo de extra-columna fuese despreciable y se calculó como la media de los factores de retención obtenidos con la ecuación III.1. Posteriormente, a lo largo de la secuencia de trabajo se realizaron inyecciones control de acetanilida cuyo tiempo total de retención ($t_{R(REF)}^g$) en el sistema cromatográfico utilizado permite calcular el factor de retención de un analito ($k_{R,i}$) a partir de la siguiente expresión:

$$k_{R,i} = \frac{t_{R,i}^g}{t_{R(REF)}^g} (1 + k_{REF}) - 1 \quad (VI.1)$$

donde ($t_{R,i}^g$) es el tiempo total de retención del analito. Esta metodología para la obtención de los factores de retención ha mostrado proporcionar estimaciones más fiables y precisas, especialmente en condiciones de precisión intermedia (diferentes equipos, días, columnas). Además, asegura la fiabilidad de estudios a largo plazo. Estas características son de especial interés en aquellos casos en los que se utilizan los factores de retención para la construcción de modelos (p. ej., QSRR y QRAR). Los valores de k_{REF} se obtuvieron para cada una de las fases móviles utilizadas y a una temperatura de 25 °C.

IV.2.3.- Capacidad de descripción y predicción de los modelos

En el presente Capítulo se utilizaron "series largas de datos" por lo que la capacidad de descripción y predicción de los modelos se evaluó mediante los parámetros *RMSEC* ("root-mean-square error of calibration") y *RMSECV* ("root-mean-square error of cross-validation") basado en la técnica de validación cruzada "*Venetian-blinds cross-validation*" utilizando bloques aleatorios de datos (apartado III.5).

Tabla VI.1.- Media y desviación estándar de los valores de los factores de retención obtenidos con fases móviles micelares de Brij35 a pH 7.4 y una columna Kromasil C₁₈ (25 °C).

[Brij35] (M)	0.02	0.04	0.06
Acemetacina	35.06 ± 0.19	17.234 ± 0.003	11.94 ± 0.03
Acetanilida ^a	15.33 ^a	11.06 ^a	8.79 ^a
Acetato de etilo	4.49 ± 0.07	4.41 ± 0.04	4.22 ± 0.04
Acetofenona	30.59 ± 0.11	21.69 ± 0.19	16.94 ± 0.03
<i>o</i> -Acetotoluidida	8.22 ± 0.05	6.693 ± 0.008	5.79 ± 0.02
Ácido benzoico	1.480 ± 0.04	1.353 ± 0.014	1.312 ± 0.004
Ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropiónico	12.204 ± 0.016	8.32 ± 0.07	6.303 ± 0.012
Ácido 2-(3-clorofenoxi)propiónico	4.416 ± 0.012	3.682 ± 0.015	3.134 ± 0.017
Ácido 2-(4-clorofenoxi)propiónico	4.656 ± 0.02	3.805 ± 0.009	3.225 ± 0.017
Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético	10.977 ± 0.016	7.32 ± 0.05	5.624 ± 0.014
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	11.84 ± 0.10	7.879 ± 0.014	6.012 ± 0.016
Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)propiónico	14.03 ± 0.10	9.231 ± 0.06	6.96 ± 0.03
Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico	1.902 ± 0.013	1.71 ± 0.04	1.6002 ± 0.006
Ácido 2-fenoxipropiónico	1.332 ± 0.013	1.1810 ± 0.0014	1.185 ± 0.007
Ácido 2-iodobenzoico	1.617 ± 0.003	1.493 ± 0.006	1.434 ± 0.008
Ácido 4-(2-metil-4-clorofenoxi)butírico	26.30 ± 0.07	14.72 ± 0.03	10.473 ± 0.019
Ácido salicílico	5.208 ± 0.08	4.0764 ± 0.0002	3.428 ± 0.009
Ácido (2,4,5-triclorofenoxi)acético	21.06 ± 0.09	12.20 ± 0.06	8.75443 ± 0.00005
Ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propiónico	24.17 ± 0.11	13.92 ± 0.04	9.896 ± 0.006
Alobarbital	18.37 ± 0.07	13.756 ± 0.02	11.422 ± 0.012
Alprazolam	54.83 ± 0.14	29.526 ± 0.07	20.63 ± 0.06
Alprenolol	65.56 ± 0.11	44 ± 2	31.3 ± 0.4
Amineptina	24.77 ± 0.03	15.78 ± 0.04	11.79 ± 0.02
Amitriptilina	446 ± 14	241 ± 12	153 ± 9
Amobarbital	64.91 ± 0.05	37.82 ± 0.02	27.279 ± 0.08
Amoxapina	239 ± 3	124.0 ± 1.9	78.8 ± 1.6
Anilina	16.63 ± 0.03	12.78 ± 0.04	10.57 ± 0.03
Antipirina	3.374 ± 0.006	3.092 ± 0.017	2.920 ± 0.002
Antraceno	208.0 ± 0.5	101.4 ± 0.7	65.62 ± 0.06
Aprobarbital	25.78 ± 0.03	18.057 ± 0.003	14.35 ± 0.03
Barbital	6.80 ± 0.03	5.782 ± 0.014	5.2031 ± 0.011
Benceno	69.70 ± 0.16	45.6 ± 0.2	33.50 ± 0.15
Bentazepam	99.09 ± 0.18	47.98 ± 0.12	31.98 ± 0.11
Bifenilo	203.9 ± 0.6	99.33 ± 0.07	64.8 ± 0.3
Bralobarbital	30.267 ± 0.02	20.075 ± 0.003	15.674 ± 0.011
Bromazepam	40.976 ± 0.014	23.43 ± 0.04	16.637 ± 0.05
Bromobenceno	134.53 ± 0.10	70.4 ± 0.8	46.43 ± 0.13
Bromperidol	232.3 ± 1.6	114.7 ± 0.7	75.2 ± 0.4
Bupivacaína	67.0 ± 0.5	48.79 ± 0.16	36.70 ± 0.11
Butabarbital	35.06 ± 0.15	23.079 ± 0.02	17.66 ± 0.04
Butalbital	42.6 ± 0.3	27.57 ± 0.04	20.99 ± 0.08
Butetal	37.49 ± 0.16	24.55 ± 0.03	18.85 ± 0.04
Buturón	108.33 ± 0.17	54.9 ± 0.3	37.19 ± 0.03
Cafeína	2.893 ± 0.002	2.668 ± 0.004	2.572 ± 0.007
Ciproheptadina	550 ± 20	275 ± 11	186 ± 4
Clobazam	52.14 ± 0.03	28.51 ± 0.05	19.80 ± 0.09
Clometiazol	46.4 ± 0.5	30.2 ± 0.4	22.25 ± 0.05
Clomipramina	475 ± 13	250 ± 11	155 ± 7
Clonazepam	68.9 ± 0.5	34.94 ± 0.07	23.72 ± 0.12
Clorbromurón	86.68 ± 0.16	43.073 ± 0.010	29.35 ± 0.06
Clordiazepóxido	74.2 ± 0.4	39.0 ± 0.7	26.350 ± 0.016
4-Cloro-3-metilfenol	89.99 ± 0.04	44.49 ± 0.03	29.33 ± 0.03
2-Clorofenol	67.62 ± 0.06	35.82 ± 0.08	24.14 ± 0.09

(Continúa en la página siguiente)

Tabla VI.1.- Continuación.

[Brij35] (M)	0.02	0.04	0.06
Clorotolurón	55.36 ± 0.18	29.389 ± 0.019	20.0 ± 0.4
Cloroxurón	92.17 ± 0.07	45.84 ± 0.18	30.79 ± 0.04
Clorpromazina	640 ± 20	340 ± 11	218 ± 8
Clorprotixeno	632 ± 19	329 ± 5	213 ± 8
o-Cresol	62.32 ± 0.04	34.65 ± 0.08	23.916 ± 0.010
p-Cresol	54.69 ± 0.05	31.00 ± 0.11	21.50 ± 0.03
Desipramina	160 ± 4	86.3 ± 1.3	55.6 ± 1.4
Diazepam	89.128 ± 0.019	44.63 ± 0.04	30.01 ± 0.04
Dibucaína	204.6 ± 1.5	114 ± 2	67 ± 8
Diclofenac	39.03 ± 0.08	19.274 ± 0.006	13.60 ± 0.04
2,4-Diclorofenol	102.55 ± 0.18	50.35 ± 0.13	33.06 ± 0.07
Difenhidramina	159 ± 7	99 ± 3	73 ± 3
2,4-Dimetilfenol	84.53 ± 0.07	43.90 ± 0.10	29.41 ± 0.04
2,4-Dinitrofenol	16.025 ± 0.09	9.47 ± 0.13	6.781 ± 0.007
4,6-Dinitro-o-cresol	20.76 ± 0.04	11.35 ± 0.11	7.839 ± 0.011
Diurón	63.64 ± 0.14	32.47 ± 0.04	22.15 ± 0.07
Dosulepina	306 ± 15	165 ± 8	102 ± 4
Doxepina	260 ± 11	160 ± 9	101 ± 4
Droperidol	115.6 ± 1.0	57.47 ± 0.02	38.3 ± 0.2
Etopropazina	284 ± 2	148 ± 0.42	97.6 ± 1.2
Fenbufeno	18.93 ± 0.02	10.27 ± 0.03	7.52 ± 0.03
Fenitoína	66.8 ± 1.3	34.49 ± 0.11	23.10 ± 0.12
Fenobarbital	30.107 ± 0.008	19.4155 ± 0.008	15.11 ± 0.10
Fenol	34.223 ± 0.006	21.84 ± 0.07	16.045 ± 0.017
Fentiazac	54.10 ± 0.05	26.5537 ± 0.0019	18.56 ± 0.03
Fenurón	10.215 ± 0.013	8.015 ± 0.011	6.611 ± 0.011
Flufenazina	199.6 ± 1.4	97.1 ± 0.7	63.5 ± 0.4
Flunitrazepam	62.77 ± 0.05	33.18 ± 0.04	22.78 ± 0.05
Fluometurón	62.20 ± 0.19	33.0 ± 0.4	22.8 ± 0.4
Flurbiprofeno	28.22 ± 0.03	14.89 ± 0.02	10.80 ± 0.09
Haloperidol	200 ± 3	102.2 ± 0.7	70.35 ± 0.12
Hexobarbital	33.756 ± 0.005	23.158 ± 0.009	18.069 ± 0.005
Hidroxizina	122 ± 2	60.9 ± 0.50	40.802 ± 0.09
Ibuprofeno	29.30 ± 0.07	17.77 ± 0.03	13.773 ± 0.03
Ibuproxam	94.3 ± 0.2	45.88 ± 0.17	31.32 ± 0.07
Imipramina	331 ± 22	187 ± 9	120 ± 6
Indometacina	37.6 ± 0.2	18.823 ± 0.009	13.25 ± 0.03
Isoproturón	60.72 ± 0.09	33.23 ± 0.096	23.0 ± 0.3
Ketoprofeno	11.493 ± 0.014	7.707 ± 0.004	6.104 ± 0.008
Lamotrigina	28.8 ± 0.3	16.33 ± 0.14	11.7 ± 0.2
Lidocaína	22.2 ± 0.3	18.88 ± 0.04	15.35 ± 0.03
Linurón	83.39 ± 0.11	41.88 ± 0.05	28.38 ± 0.09
Lorazepam	61.982 ± 0.07	30.99 ± 0.04	20.816 ± 0.018
Lormetazepam	61.499 ± 0.011	31.24 ± 0.06	21.15 ± 0.05
Loxapina	382 ± 6	184.5 ± 0.8	125.6 ± 1.4
Maprotilina	171 ± 4	87.0 ± 1.7	55.7 ± 0.8
Mefobarbital	49.86 ± 0.09	30.235 ± 0.012	22.39 ± 0.05
Melitraceno	550 ± 30	279 ± 8	174 ± 5
Mepivacaína	8.53 ± 0.03	7.620 ± 0.018	6.58 ± 0.04
Metapirileno	119 ± 10	86 ± 6	60.7 ± 1.6
Metoprolol	6.77 ± 0.06	5.73 ± 0.13	5.204 ± 0.017
Metotrimeprazina	278 ± 7	147 ± 2	94 ± 2
Metoxurón	27.60 ± 0.04	16.55 ± 0.017	12.097 ± 0.006
Mianserina	333 ± 5	169 ± 3	112 ± 2
Midazolam	113.01 ± 0.05	54.98 ± 0.06	37.03 ± 0.06

(Continúa en la página siguiente)

Tabla VI.1.- Continuación.

[Brij35] (M)	0.02	0.04	0.06
Monolinurón	59.74 ± 0.10	32.4 ± 0.2	22.3 ± 0.4
Monurón	39.52 ± 0.03	22.52 ± 0.14	16.05 ± 0.03
Nabumetona	109.06 ± 0.09	52.680 ± 0.012	35.41 ± 0.15
Naftaleno	155.9 ± 0.3	77.64 ± 0.12	50.76 ± 0.19
Naproxeno	12.729 ± 0.003	8.102 ± 0.003	6.323 ± 0.013
p-Nitroanilina	39.54 ± 0.15	22.27 ± 0.17	15.37 ± 0.04
Nitrobenzeno	48.13 ± 0.12	30.71 ± 0.06	22.309 ± 0.03
2-Nitrofenol	26.91 ± 0.07	18.8 ± 0.3	14.50 ± 0.05
4-Nitrofenol	40.70 ± 0.07	24.1 ± 0.2	17.25 ± 0.02
Nortriptilina	191 ± 5	98.0 ± 1.8	62.4 ± 1.0
Orfenadrina	272 ± 9	152 ± 2	105 ± 2
Oxazepam	58.86 ± 0.05	29.69 ± 0.02	20.03 ± 0.04
Oxprenolol	17.8 ± 0.3	13.58 ± 0.17	11.27 ± 0.09
Pentaclorofenol	41.97 ± 0.16	21.1 ± 0.6	13.78 ± 0.14
Pentobarbital	108.85 ± 0.07	56.26 ± 0.09	39.29 ± 0.16
Perfenazina	160.3 ± 1.0	78.05 ± 0.13	51.6 ± 0.3
Periciazina	85.91 ± 0.17	44.0 ± 0.6	29.1 ± 0.5
Piketoprofeno	154.55 ± 0.12	72.97 ± 0.05	49.10 ± 0.13
Pimozida	377.0 ± 0.4	178.6 ± 0.2	115.21 ± 0.16
Pindolol	7.89 ± 0.14	5.92 ± 0.02	5.056 ± 0.019
Pireno	200 ± 3	96.25 ± 0.06	62.29 ± 0.08
Prilocaina	14.21 ± 0.11	12.38 ± 0.04	10.22 ± 0.04
Procaína	6.33 ± 0.07	5.75 ± 0.06	4.94 ± 0.04
Proclorperazina	950 ± 80	560 ± 40	360 ± 40
Progesterona	158 ± 2	79.10 ± 0.16	52.89 ± 0.16
Prometazina	454 ± 10	235 ± 4	157 ± 3
Propanocaína	168 ± 2	122 ± 3	80.6 ± 1.6
Propranolol	75.1 ± 0.8	41.9 ± 1.0	28.96 ± 0.19
Quinupramina	297 ± 13	167 ± 7	107 ± 5
Ranitidina	1.67 ± 0.16	1.56 ± 0.03	1.44210 ± 0.00004
Resorcinol	21.6 ± 0.11	13.77 ± 0.03	10.211 ± 0.019
Secobarbital	88.8 ± 0.2	47.63 ± 0.15	33.650 ± 0.012
Sulindac	9.052 ± 0.016	5.412 ± 0.009	4.16 ± 0.06
Teofilina	2.581 ± 0.006	2.3275 ± 0.0012	2.2308 ± 0.014
Tetracaína	143 ± 0.9	84.9 ± 0.9	57.6 ± 0.5
Tetrazepam	130.87 ± 0.07	64.34 ± 0.09	42.966 ± 0.019
Tioridazina	620 ± 15	319 ± 9	206 ± 7
Tolmetín	11.030 ± 0.008	7.07107 ± 0.00002	5.44 ± 0.04
Tolueno	130.6 ± 1.1	73.3 ± 0.8	50.6 ± 0.5
2,4,6-Triclorofenol	54.97 ± 0.09	27.9 ± 0.4	18.53 ± 0.09
Trifluoperazina	1090 ± 30	530 ± 30	349 ± 18
Trimeprazina	320 ± 8	173 ± 2	113 ± 2
Trimipramina	316 ± 7	164 ± 4	104.4 ± 1.7

^a Los valores de *k* de acetanilida (ecuación III.1) se tomaron como *k*_{REF}.

VI.3.- Resultados y discusión

En la Tabla VI.1 se muestran las medias de los factores de retención junto con su desviación estándar obtenidos utilizando fases móviles de Brij35 de concentración 0.02, 0.04 y 0.06 M a pH 7.4 para los 151 compuestos neutros e iónicos estructuralmente no relacionados estudiados.

Para realizar el estudio QSRR se utilizaron los datos de retención (expresados como $\log k_R$) y 7 descriptores moleculares de tipo hidrófobo, electrónico y estérico cuyos valores se muestran en la Tabla VI.2:

- Descriptor hidrófobo: $\log P$.
- Descriptores electrónicos: la carga molar negativa (α_A), la carga molar positiva (α_B) y la polarizabilidad.
- Descriptores estéricos: refracción molar (R_m , también se utiliza como un descriptor de tipo electrónico), volumen molar (V_m) y "parachor" (Pr).

Los valores de los descriptores polarizabilidad, R_m , V_m y Pr se obtuvieron con el programa informático ACD/ChemSketch (apartado III.6). Los valores de α_A y α_B se calcularon a partir de las siguientes expresiones:

$$\alpha_A = \sum_{i=0}^n a_i \delta_i \quad (\text{VI.2})$$

$$\alpha_B = \sum_{j=0}^n b_j \delta_j \quad (\text{VI.3})$$

donde a_i es el valor de la carga de la especie aniónica considerada (p. ej., -1, -2) y δ_i su fracción molar al pH de trabajo, b_j es el valor de la carga de la especie catiónica considerada (p. ej., +1, +2) y δ_j su fracción molar al pH de trabajo. Para compuestos neutros $\alpha_A = \alpha_B = 0$. Por ejemplo a pH 7.4, para el ácido benzoico: $\alpha_A = -0.9994$, $\alpha_B = 0$; antraceno: $\alpha_A = 0$, $\alpha_B = 0$; amineptina: $\alpha_A = -0.3375$, $\alpha_B = +0.0046$; amitriptilina: $\alpha_A = 0$, $\alpha_B = +0.9905$ y pindolol: $\alpha_A = 0$, $\alpha_B = +1.963$ (Tabla VI.2). Los valores de los logaritmos de las constantes de protonación (en medio acuoso, a 25°C) utilizados para el cálculo de las fracciones molares de los compuestos se tomaron de la bibliografía (*Reynolds J.E.F, 1982; Hansch, C. 1990-b; Hardman J.G. y col., 1996; Yoshida F. y col., 2000; PHYSPROP Database*).

Tabla VI.2.- Valores de los descriptores moleculares estudiados en los modelos QSRR.

Compuesto	Familia	$\log K_H$	α_A	α_B	$\log P(\text{Exp})$	CLOGP	KOWWIN	ACD/logP	$\log P$ seleccionado	R_m (cm^3)	V_m (cm^3)	Pr (cm^3)	Polarizabilidad ($\times 10^{24}$) (cm^3)
Acemetacina	1	4 (A)	-0.9996	0	-	-	4.13	3.30 ± 0.47	4.13	106	305	810	42.0
Acetanilida	2	0.5 (B)	0	1.26×10^{-7}	1.16	1.16	1.1	1.08 ± 0.2	1.16	40.5	123	311	16.1
Acetato de etilo	15	(N)	0	0	0.73	-	0.86	0.71 ± 0.20	0.73	22.4	98.0	216	8.86
Acetofenona	2	(N)	0	0	1.58	-	1.67	1.66 ± 0.22	1.58	36.3	121	292	14.4
o-Acetotoluidida	2	(N)	0	0	0.85	-	1.08	1.54 ± 0.20	0.85	45.3	139	349	18.0
Ácido benzoico	2	4.2 (A)	-0.9994	0	1.87	1.88	1.87	1.89 ± 0.21	1.87	33.2	102	269	13.2
Ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropiónico	3	3.1 (A)	-0.9999	0	3.13	-	2.94	2.83 ± 0.34	3.13	53.4	170	436	21.2
Ácido 2-(3-clorofenoxi)propiónico	3	<5 ^H (A)	-1	0	-	-	2.39	2.52 ± 0.34	2.39	44.0	137	361	17.5
Ácido 2-(4-clorofenoxi)propiónico	3	<5 ^H (A)	-1	0	2.31	-	2.39	2.34 ± 0.34	2.31	44.0	137	361	17.5
Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético	3	3.13 (A)	-0.9999	0	3.25	-	2.52	2.49 ± 0.34	3.25	48.8	153	399	19.4
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	3	2.73 (A)	-1.0000	0	2.81	-	2.62	2.60 ± 0.35	2.81	48.9	148	397	19.4
Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)propiónico	3	3.1 (A)	-0.9999	0	3.43	-	3.03	2.95 ± 0.36	3.43	53.5	165	434	21.2
Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico	3	1.97 (A)	-1.0000	0	2.21	-	2.14	2.77 ± 0.35	2.21	49.7	150	398	19.7
Ácido 2-fenoxipropiónico	3	<5 ^H (A)	-1	0	-	-	1.75	1.69 ± 0.25	1.75	43.7	141	363	17.3
Ácido 2-iodobenzoico	2	2.93 (A)	-1.0000	0	2.40	-	2.7	2.16 ± 0.32	2.40	41.0	110	298	16.3
Ácido 4-(2-metil-4-clorofenoxi)butírico	3	6.2 (A)	-0.9406	0	2.79	-	3.5	3.11 ± 0.32	3.50	58.1	186	479	23.0
Ácido salicílico	2, 1	13.4 (A); 2.97 (A)	-1.0000	0	2.26	2.19	2.24	2.06 ± 0.25	2.26	35.1	100	284	13.9
Ácido (2,4,5-triclorofenoxi)acético	3	2.83 (A)	-1.0000	0	3.31	-	3.26	3.23 ± 0.37	3.31	53.8	160	433	21.3
Ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propiónico	3	2.84 (A)	-1.0000	0	3.80	-	3.68	3.57 ± 0.37	3.80	58.4	177	470	23.2
Alobarbitol	4, 5	7.77 (A)	-0.2990	0	1.05	0.63	1.31	1.17 ± 0.36	1.05	52.8	185	448	20.9
Alprazolam	6	6.2 (B)	0	0.0594	2.12	3.20	3.87	3.13 ± 0.64	2.12	88.2	226	606	34.5
Alprenolol	7	9.65 (B)	0	0.9944	3.10	2.59	2.81	2.88 ± 0.21	3.10	75.1	247	608	29.8
Amineptina	8	7.69 ^I (B); 5.24 ^I (A)	-0.3375	0.0046	-	4.74	2.66	4.80 ± 0.34	2.66	101	296	793	40.0
Amitriptilina	8	9.42 (B)	0	0.9905	5.04	4.64	4.95	6.14 ± 0.33	5.04	91.5	258	675	36.3
Amobarbital	4, 5	7.8 (A)	-0.2847	0	2.07	2.11	2	2.09 ± 0.27	2.07	58.0	211	507	23.0
Amoxapina	8	7.6 (B)	0	0.6131	-	3.89	3.38	2.59 ± 0.65	3.38	86.7	228	613	34.4
Anilina	2	4.6 (B)	0	1.58×10^{-3}	0.90	-	1.08	0.94 ± 0.19	0.90	30.5	91.7	233	12.1
Antipirina	15	1.45 (B)	0.0000	0	0.38	0.19	0.59	0.27 ± 0.33	0.38	54.6	163	416	21.6
Antraceno	9	(N)	0	0	4.45	-	4.35	4.68 ± 0.17	4.45	61.9	158	415	24.6
Aprobarbital	4	7.99 (A)	-0.2045	0	1.15	1.04	1.38	1.27 ± 0.27	1.15	53.0	188	456	21.0
Barbital	4	7.97 (A)	-0.2121	0	0.65	0.65	0.60	0.38 ± 0.26	0.65	44.1	162	389	17.5
Benceno	9	(N)	0	0	2.13	-	1.99	2.22 ± 0.15	2.13	26.3	89.4	207	10.4

(Continúa en la página siguiente)

Tabla VI.2.- Continuación.

Compuesto	Familia	$\log K_{ft}$	α_A	α_B	$\log P(\text{Exp})$	CLOGP	KOWWIN	ACD/logP	$\log P$ seleccionado	R_m (cm^3)	V_m (cm^3)	Pr (cm^3)	Polarizabilidad ($\times 10^{24}$) (cm^3)
Bentazepam	6	(N)	0	0	-	3.36	-	3.59 ± 0.62^v	3.36	90.1	223	615	25.7
Bifenilo	9	(N)	0	0	3.98	-	3.76	3.98 ± 0.23	3.98	50.8	155	380	20.2
Bralobarbital	4	7.7 (A)	-0.3339	0	1.37 ⁱⁱⁱ	0.97	1.71	2.13 ± 0.40	1.71	60.4	198	497	23.9
Bromazepam	6	11 (A); 2.9 (B)	-2.51×10^{-4}	3.16×10^{-5}	2.05	1.83	1.93	2.41 ± 0.50^v	2.05	77.0	197	539	30.5
Bromobenceno	2	(N)	0	0	2.99	-	2.88	2.99 ± 0.28	2.99	33.9	106	258	13.5
Bromperidol	14	8.65 (B)	0	0.9468	-	3.67	4.45	4.24 ± 0.51	4.45	104	308	812	41.2
Bupivacaína	10	8.1 (B)	0	0.8337	3.41	3.38	3.44	3.64 ± 0.27	3.41	88.6	279	709	35.1
Butabarbital	4	7.9 (A)	-0.2403	0	1.65	1.58	1.51	1.56 ± 0.27	1.65	53.3	193	467	21.1
Butalbital	4	7.79 (A)	-0.2895	0	-	1.57	1.87	1.80 ± 0.27	1.87	57.7	207	496	22.9
Butetal	4	8.1 (A)	-0.1663	0	1.73	-	1.59	1.75 ± 0.26	1.73	53.4	195	469	21.2
Buturón	11	(N)	0	0	3.00	-	2.66	2.61 ± 0.41	3.00	65.5	192	508	26.0
Cafeína	15	14 (A); 0.6 (B)	-2.51×10^{-7}	1.58×10^{-7}	-0.07	0.07	0.16	-0.07 ± 0.35	-0.07	50.4	133	365	20.0
Ciproheptadina	12	8.87 (B)	0	0.9672	4.69	4.92	5.15	6.62 ± 0.36	4.69	91.6	263	676	35.2
Clobazam	6	(N)	0	0	2.12	2.65	1.82	2.51 ± 0.48	2.12	79.9	225	607	31.7
Clometiazol	5	3.2 (B)	0	0.0001	2.12	-	2.83	1.56 ± 0.32	2.12	42.0	133	337	16.6
Clomipramina	8	9.38 (B)	0	0.9896	5.19	5.3	5.65	5.19 ± 0.41	5.19	93.8	281	715	37.2
Clonazepam	6, 5	10.5 (A); 1.5 (B)	-7.92×10^{-4}	0	2.41	2.84	2.53	4.11 ± 0.81^v	2.41	81.2	210	589	32.2
Clorbromurón	11	(N)	0	0	3.09	-	3.15	3.37 ± 0.61	3.09	63.2	181	483	25.1
Clordiazepóxido	5	4.76 (B)	0	0.0023	2.44	-	2.42	2.48 ± 0.64	2.44	84.0	231	608	33.3
4-Cloro-3-metilfenol	13, 2	9.55 (A)	-0.0070	0	3.10	-	2.7	2.89 ± 0.22	3.10	37.9	116	296	15.0
2-Clorofenol	13, 2	8.56 (A)	-0.0647	0	2.15	-	2.16	2.04 ± 0.21	2.15	33.0	99.8	258	13.1
Clorotolurón	11	(N)	0	0	2.41	-	2.58	2.46 ± 0.31	2.41	58.6	175	450	23.2
Cloroxurón	11	(N)	0	0	3.70	-	4.08	4.38 ± 0.38	3.70	80.2	229	603	31.8
Clorpromazina	14	9.3 (B)	0	0.9876	5.35	5.20	5.20	5.36 ± 0.27	5.35	92.8	263	687	36.7
Clorprotixeno	14	7.6 (B)	0	0.6131	5.18	5.30	5.14	6.03 ± 0.38	5.18	95.4	251	685	37.8
<i>o</i> -Cresol	13, 2	10.3 (A)	-0.0013	0	1.95	-	2.06	1.94 ± 0.19	1.95	33.0	104	260	13.1
<i>p</i> -Cresol	13, 2	10.3 (A)	-0.0013	0	1.94	-	2.06	1.94 ± 0.19	1.94	33.0	104	260	13.1
Desipramina	8	10.44 (B)	0	0.9991	4.90	4.09	4.80	3.97 ± 0.36	4.90	84.2	254	639	33.4
Diazepam	6, 5	3.3 (B)	0	0.0001	2.80	3.18	2.70	2.15 ± 0.61^v	2.80	80.9	226	589	37.1
Dibucaína	10	8.85 (B)	0	0.9657	4.40	4.62	4.04	4.40 ± 0.42	4.40	103	320	819	40.9
Diclofenac	1	4.5 (A)	-0.9987	0	4.40	4.77	4.02	3.28 ± 0.39	4.40	76.5	207	571	30.3
2,4-Diclorofenol	13, 2	7.89 (A)	-0.2445	0	3.06	-	2.8	2.99 ± 0.31	3.06	37.9	112	294	15.0

(Continúa en la página siguiente)

Tabla VI.2.- Continuación.

Compuesto	Familia	$\log A_{ri}$	α_A	α_B	$\log P(\text{Exp})$	CLOGP	KOWWIN	ACD/logP	$\log P$ seleccionado	R_m (cm^3)	V_m (cm^3)	P_r (cm^3)	Polarizabilidad ($\times 10^{24}$) (cm^3)
Difenhidramina	12	9 (B)	0	0.9755	3.27	3.36	3.11	3.66 ± 0.37	3.27	79.6	249	621	31.5
2,4-Dimetilfenol	13, 2	10.6 (A)	-0.0006	0	2.30	-	2.61	2.40 ± 0.2	2.30	37.8	120	298	15.0
2,4-Dinitrofenol	13, 2	4.09 (A)	-0.9995	0	1.67	-	1.73	1.74 ± 0.32	1.67	41.2	112	333	16.3
4,6-Dinitro- <i>o</i> -cresol	13	4.31 (A)	-0.9992	0	2.12	-	2.27	2.20 ± 0.33	2.12	46.1	128	371	18.3
Diurón	11	(N)	0	0	2.68	-	2.67	2.78 ± 0.38	2.68	58.7	170	448	23.3
Dosulepina	8	9.25 (B)	0	0.9861	4.49	4.52	4.51	5.56 ± 0.39	4.49	95.1	257	687	37.7
Doxepina	8	9 (B)	0	0.9755	4.29	3.88	3.99	5.08 ± 0.35	4.29	88.5	249	655	35.1
Droperidol	14	7.6 (B)	0	0.6131	3.50	3.50	3.46	4.10 ± 0.70	3.50	104.1	299	800	41.3
Etopropazina	14	9.6 (B)	0	0.9937	4.77	5.54	5.47	5.75 ± 0.26	4.77	97.1	284	728	38.5
Fenbufeno	1	4.51 (A)	-0.9987	0	3.62	3.21	3.18	3.04 ± 0.29	3.62	71.7	214	567	28.4
Fenitoína	5	8.3 (A)	-0.1118	0	2.47	2.09	2.16	2.52 ± 0.38	2.47	69.6	201	531	27.6
Fenobarbital	4, 5	7.4 (A)	-0.5000	0	1.47	1.36	1.33	1.71 ± 0.28	1.47	59.2	188	483	23.5
Fenol	13, 2	9.99 (A)	-0.0026	0	1.46	-	1.51	1.48 ± 0.19	1.46	28.1	87.8	222	11.2
Fentiazac	1	3.6 (A)	-0.9998	0	5.19	4.63	4.60	4.85 ± 0.43	5.19	87.9	242	666	34.9
Fenurón	11	(N)	0	0	0.98	-	1.38	0.98 ± 0.28	0.98	48.9	146	376	19.4
Flufenazina	14	8.1 (B); 3.9 (B)	0	0.8340	4.36	5.90	4.13	4.84 ± 0.46	4.36	114	344	886	45.3
Flunitrazepam	6	1.8 (B)	0	2.51×10^{-6}	2.06	2.35	1.91	1.65 ± 0.65^N	2.06	81.8	225	605	32.4
Fluometurón	11	(N)	0	0	2.42	-	2.35	2.36 ± 0.37	2.42	53.9	180	434	21.4
Flurbiprofeno	1	4.27 (A)	-0.9993	0	4.16	3.75	3.81	4.12 ± 0.37	4.16	66.6	204	525	26.4
Haloperidol	14	8.3 (B)	0	0.8882	3.36	3.52	4.20	4.06 ± 0.45	3.36	101	303	798	40.0
Hexobarbital	4	8.2 (A)	-0.1368	0	1.49	1.57	2.02	1.49 ± 0.31	1.49	60.4	193	502	23.9
Hidroxizina	12	7.1 (B); 2.1 (B)	0	0.3339	-	4.16	2.36	3.00 ± 0.46	2.36	106	317	834	42.0
Ibuprofeno	1	5.2 (A)	-0.9937	0	3.50	3.68	3.79	3.72 ± 0.23	3.50	60.8	200	498	24.1
Ibuproxam	1	(N)	0	0	-	2.61	2.79	3.14 ± 0.55	2.79	64.4	209	526	25.5
Imipramina	8	9.5 (B)	0	0.9921	4.80	4.41	5.01	4.47 ± 0.38	4.80	88.9	269	678	35.3
Indometacina	1	4.5 (A)	-0.9987	0	4.27	4.23	4.23	3.10 ± 0.40	4.27	94.6	270	708	37.5
Isoproturón	11	(N)	0	0	2.87	-	2.84	2.32 ± 0.29	2.87	63.1	196	492	25.0
Ketoprofeno	1	4.6 (A)	-0.9984	0	3.12	2.79	3.00	2.81 ± 0.33	3.12	71.8	212	564	28.5
Lamotrigina	5	5.7 (B)	0	0.0196	-	2.08	-	-0.19 ± 0.81	2.08	63.4	163	486	25.1
Lidocaína	10	7.9 (B)	0	0.7597	2.26	1.98	1.66	2.36 ± 0.26	2.26	72.4	228	571	28.7
Linurón	11	(N)	0	0	3.20	-	2.91	3.15 ± 0.57	3.20	60.4	177	468	24.0
Lorazepam	6	11.5 (A); 1.3 (B)	-7.94×10^{-5}	7.94×10^{-7}	2.51	2.40	2.41	2.89 ± 0.63^N	2.51	81.0	211	578	32.1

(Continúa en la página siguiente)



Tabla VI.2.- Continuación.

Compuesto	Familia	$\log K_{ow}$	α_A	α_B	$\log A(\text{Exp})$	CLOGP	KOWWIN	ACD/logP	$\log P$ seleccionado	R_m (cm^3)	V_m (cm^3)	Pr (cm^3)	Polarizabilidad ($\times 10^{24}$) (cm^3)
Lormetazepam	6	(N)	0	0	-	2.80	2.23	2.50 ± 0.64^v	2.23	86.4	232	623	34.2
Loxapina	8	6.6 (B)	0	0.1368	-	4.75	3.60	2.99 ± 0.65	3.60	92.1	250	659	36.5
Maprotilina	8	10.5 (B)	0	0.9992	-	4.22	4.52	4.51 ± 0.34	4.52	87.8	257	670	34.8
Mefobarbital	4	7.8 (A)	-0.2847	0	1.84	1.85	1.54	1.85 ± 0.30	1.84	64.1	203	521	25.4
Melitraceno	8	7.38 ^l (B)	0	0.4885	-	5.12	4.81	6.30 ± 0.35	4.81	96.2	278	711	38.1
Mepivacaína	10	7.7 (B)	0	0.6661	1.75	1.80	1.96	2.04 ± 0.27	1.75	74.7	229	589	29.6
Metapirileno	12	8.9 (B); 3.7 (B)	0	0.9695	2.87	2.50	2.55	3.02 ± 0.39	2.87	84.0	240	640	33.3
Metoprolol	7	9.7 (B)	0	0.9950	1.88	1.20	1.69	1.76 ± 0.23	1.88	77.1	259	638	30.6
Metotrimeprazina	14	9.2 (B)	0	0.9844	4.68	4.64	5.06	5.05 ± 0.27	4.68	99.1	292	746	39.3
Metoxurón	11	(N)	0	0	1.64	-	2.11	1.92 ± 0.33	1.64	60.5	182	469	24.0
Mianserina	8	7.1 (B)	0	0.3339	-	4.26	-	3.75 ± 0.42	4.26	82.9	224	606	32.9
Midazolam	6, 5	6.2 (B)	0	0.0594	-	3.70	4.33	2.80 ± 0.93	4.33	89.7	240	625	35.5
Monolinurón	11	(N)	0	0	2.30	-	2.26	2.25 ± 0.56	2.30	60.3	181	470	23.9
Monurón	11	(N)	0	0	1.94	-	2.03	1.89 ± 0.30	1.94	53.8	158	412	21.3
Nabumetona	1	(N)	0	0	3.08	2.77	3.22	2.82 ± 0.23	3.08	69.6	211	529	27.6
Naftaleno	9	(N)	0	0	3.30	-	3.17	3.45 ± 0.16	3.30	44.1	124	311	17.5
Naproxeno	1	4.2 (A)	-0.9994	0	3.18	2.82	3.10	3.00 ± 0.24	3.18	66.5	192	505	26.4
<i>p</i> -Nitroanilina	2	1 (B)	0	3.98×10^{-7}	1.39	-	1.47	1.39 ± 0.24	1.39	37.0	104	289	14.7
Nitrobenceno	2	(N)	0	0	1.85	-	1.81	1.95 ± 0.20	1.85	32.8	101	263	13.0
2-Nitrofenol	13, 2	7.23 (A)	-0.5966	0	1.79	-	1.91	1.71 ± 0.23	1.79	34.7	99.7	278	13.7
4-Nitrofenol	13, 2	7.15 (A)	-0.6401	0	1.91	-	1.91	1.57 ± 0.22	1.91	34.7	99.7	278	13.7
Nortriptilina	8	9.7 (B)	0	0.9950	4.28	4.32	4.74	5.65 ± 0.32	4.28	86.8	243	637	34.4
Orfenadrina	12	8.4 (B)	0	0.9091	3.77	3.86	3.65	4.12 ± 0.37	3.77	84.4	266	659	33.5
Oxazepam	6	11.6 (A); 1.7 (B)	-6.31×10^{-5}	2.00×10^{-6}	2.24	2.10	2.32	2.29 ± 0.63^v	2.24	76.4	202	549	30.3
Oxprenolol	7	9.5 (B)	0	0.9921	2.18	1.62	1.83	2.29 ± 0.24	2.18	76.8	255	628	30.5
Pentaclorofenol	13	4.7 (A)	-0.9980	0	5.12	-	4.74	4.78 ± 0.36	5.12	52.6	148	402	20.9
Pentobarbital	4	8 (A)	-0.2008	0	2.07	2.11	2.00	2.09 ± 0.27	2.07	57.9	209	507	23.0
Perfenazina	12, 14	7.8 (B); 3.7 (B)	0	0.7154	4.20	5.57	3.82	4.48 ± 0.42	4.20	114	322	861	45.3
Periclazina	14	8.3 (B)	0	0.8882	3.52	3.71	3.93	3.76 ± 0.38	3.52	106	277	803	42.1
Piketoprofeno	1	(N)	0	0	-	4.24	-	4.00 ± 0.41	4.24	102	288	773	40.6
Pimozida	14	8.6 (B); 7.3 (B)	0	1.3937	6.30	6.30	6.23	6.08 ± 0.55	6.30	128	377	988	50.9

(Continúa en la página siguiente)

Tabla VI.2.- Continuación.

Compuesto	Familia	$\log K_{H^+}$	α_A	α_B	$\log P(\text{Exp})$	CLOGP	KOWWIN	ACD/logP	$\log P$ seleccionado	R_m (cm^3)	V_m (cm^3)	P_r (cm^3)	Polarizabilidad ($\times 10^{24}$) (cm^3)
Pindolol	7	9.7 (B); 8.8 (B)	0	1.9613	1.75	1.65	1.48	1.94 ± 0.22	1.75	73.4	215	566	29.1
Pireno	9	(N)	0	0	4.88	-	4.93	5.15 ± 0.17	4.88	67.5	171	468	26.8
Prilocaina	10	7.89 (B)	0	0.7555	2.11	1.65	1.88	2.45 ± 0.30	2.11	67.4	214	533	26.7
Procaína	10	8.8 (B)	0	0.9617	1.87	2.24	1.99	3.18 ± 0.37	1.87	69.1	219	563	24.4
Proclorperazina	14	8.1 (B); 3.78 (B)	0	0.8339	4.88	6.15	4.79	4.76 ± 0.39	4.88	108	307	804	42.8
Progesterona	15	(N)	0	0.0003	3.87	3.85	3.67	4.04 ± 0.28	3.87	91.0	289	732	36.1
Prometazina	12, 14	9.1 (B)	0	0.9804	4.81	4.65	4.49	4.69 ± 0.26	4.81	87.8	251	648	34.8
Propanocaína	10	7.53 (B)	0	0.5743	-	4.20	4.63	5.43 ± 0.34	4.63	94.0	295	747	37.3
Propranolol	7	9.45 (B)	0	0.9912	3.56	2.75	2.60	3.10 ± 0.19	3.56	79.0	237	606	31.3
Quinupramina	8	7.85 ^l (B)	0	0.7381	-	4.94	5.62	4.86 ± 0.45	5.62	94.7	254	695	37.5
Ranitidina	12	8.2 (B); 2.3 (B)	0	0.8632	0.27	0.27	0.29	$2.51 \pm 0.28^{\text{lv}}$	0.27	85.6	265	688	34.0
Resorcinol	13, 2	11.32 (A); 9.15 (A)	-0.0175	0	0.80	0.81	1.03	0.76 ± 0.20	0.80	30.0	86.2	237	11.9
Secobarbital	4	12.6 (A); 7.9 (A)	-0.2403	0	1.97	2.10	2.36	2.33 ± 0.27	1.97	62.3	221	537	24.7
Sulindac	1	4.5 (A)	-0.9987	0	3.42	2.77	4.28	3.60 ± 0.45	3.42	96.2	257	731	38.1
Teofilina	15	8.6 (A); 3.5 (B)	-5.93×10^{-2}	1.18×10^{-4}	-0.02	-0.25	-0.39	$0.06 \pm 0.37^{\text{lv}}$	-0.02	43.1	123	352	17.1
Tetracaína	10	8.39 (B)	0	0.9072	3.73	3.65	3.02	3.75 ± 0.36	3.73	79.2	253	635	31.4
Tetrazepam	6	(N)	0	0	3.20	3.90	3.67	$3.08 \pm 0.61^{\text{lv}}$	3.20	80.9	226	588	32.1
Tioridazina	14	9.5 (B)	0	0.9921	5.90	6.42	6.45	6.13 ± 0.38	5.90	113	300	829	44.7
Tolmetín	1	3.5 (A)	-0.9999	0	2.79	2.46	2.56	1.55 ± 0.41	2.79	72.7	218	560	28.8
Tolueno	2, 9	(N)	0	0	2.73	-	2.54	2.68 ± 0.17	2.73	31.1	106	245	12.3
2,4,6-Triclorofenol	2	6.23 (A)	-0.9367	0	3.69	-	3.45	3.58 ± 0.33	3.69	42.8	124	330	17.0
Trifluoperazina	14	8.1 (B)	0	0.8337	5.03	6.48	5.11	5.11 ± 0.41	5.03	108	329	829	42.9
Trimeprazina	14	9 (B)	0	0.9755	4.71	4.59	4.98	4.98 ± 0.25	4.71	92.5	268	688	36.7
Trimipramina	8	6.77 ^l (B)	0	0.1899	-	4.73	5.43	4.81 ± 0.38	5.43	93.5	286	716	37.1

Familia: (1) antiinflamatorios no esteroideos; (2) derivados del benceno mono- y di-sustituídos; (3) fenoxiácidos; (4) barbitúricos; (5) antiepilépticos; (6) benzodiazepinas; (7) β -bloqueantes; (8) antidepresivos tricíclicos; (9) hidrocarburos aromáticos; (10) anestésicos locales; (11) fenilureas; (12) antihistamínicos; (13) fenoles; (14) antipsicóticos; (15) otros compuestos orgánicos. Las estructuras moleculares de los compuestos estudiados se muestran en el Anexo II.

(A) Logaritmo de la constante de protonación correspondiente a un grupo funcional con carácter ácido y (B) con carácter básico. (N) Compuesto neutro o prácticamente no ionizado a pH 7.4.

^l Constante de protonación obtenida potenciométricamente en medio micelar de Brij35 a 25 °C.

^{ll} Valor estimado ($\alpha_A \sim 1$).

^{lll} Valor de $\log P$ medido a pH 7.4.

^{lv} Valor de $\log P$ de la forma tautomérica mayoritaria.

Como se ha comentado en el apartado I.3.1, la medida de $\log P$ presenta varios problemas, principalmente para los compuestos muy hidrófilos e hidrófobos y compuestos ionizados al pH de trabajo. Por ello, en ocasiones se utilizan los valores de $\log P$ calculados a partir de programas informáticos comerciales. En la Tabla VI.2 se muestran valores de $\log P$ experimentales disponibles en la bibliografía (*Hansch, C. 1990-b; PHYSPROP Database*) y los calculados con tres programas informáticos diferentes: CLOGP v. 3.54 (*Hansch, C. 1990-b*), KOWWIN v. 1.66 y ACD/ $\log P$ versión de demostración (apartado III.6). Con el fin de seleccionar los valores de $\log P$ más fiables de los compuestos, se realizó un análisis en componentes principales (PCA, siglas en inglés de "*principal component analysis*"). Para efectuar el PCA, se construyó la matriz $X_{151,4}$ (con algunos datos ausentes) que contenía los valores de $\log P$ de las cuatro fuentes consideradas y se utilizaron datos centrados. Las dos primeras componentes principales (PCs, siglas en inglés de "*principal components*") explicaban un 98 % de la varianza de la matriz X . En la Figura VI.1 se muestra el gráfico de cargas ("*loading plot*") para las dos primeras componentes principales. Como se puede observar, entre los programas informáticos estudiados, KOWWIN proporciona los valores de $\log P$ más correlacionados con los experimentales, mientras que el programa ACD/ $\log P$ proporciona los valores de $\log P$ más alejados de los experimentales. Por tanto, en el presente estudio, cuando no se disponía de valores experimentales de $\log P$ se utilizaron los calculados con el programa KOWWIN y en su defecto los estimados por el programa CLOGP.

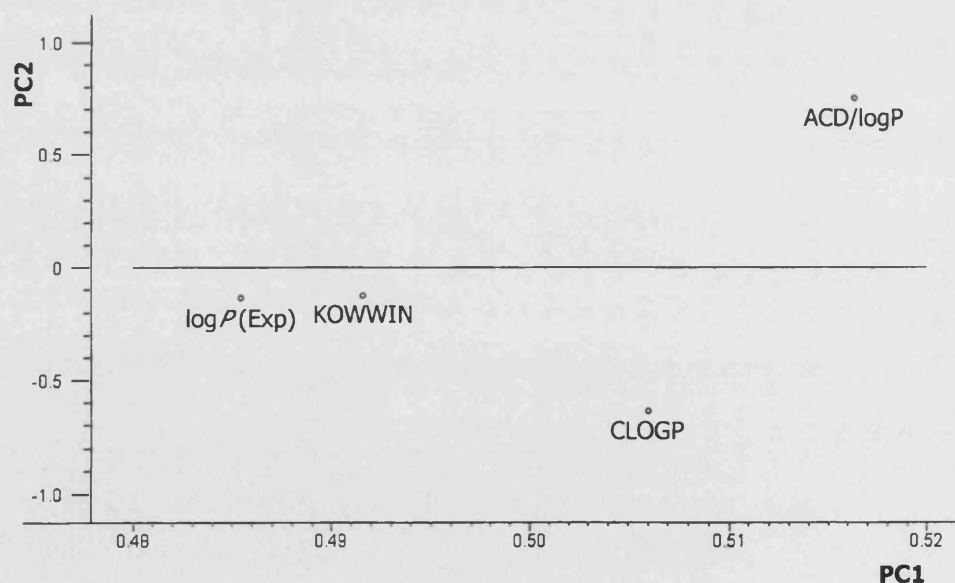


Figura VI.1.- Gráfico de cargas ("*loadings plot*") de las dos primeras componentes principales del modelo PCA (varianza explicada acumulada = 98 %) obtenido utilizando para la construcción de la matriz $X_{(151,4)}$ (con algunos datos ausentes) los datos centrados de $\log P$ de las diferentes fuentes estudiadas.

VI.3.1.- Interacciones que gobiernan la retención en CMB. Estudio univariante

Una vez establecido el conjunto de trabajo de valores de $\log P$ se examinaron las relaciones univariantes $\log k_R - \log P$. Para ello, en primer lugar se realizó un estudio preliminar en el que sólo se consideraron aquellos compuestos ($n = 113$) neutros ($\alpha_A = \alpha_B \sim 0$) o totalmente ionizados al pH de trabajo, bien catiónicos ($\alpha_A = 0, \alpha_B \sim 1$) o aniónicos ($\alpha_A \sim -1, \alpha_B = 0$). Según el gráfico de dispersión $\log k_R - \log P$ obtenido utilizando una fase móvil de Brij35 0.04 M (pH 7.4) mostrado en la Figura VI.2.A, la tendencia observada para cada serie de compuestos corrobora de nuevo la naturaleza no lineal de dicha relación. Si se tiene en cuenta que el Brij35 es un surfactante no iónico, cabe esperar que la retención de los compuestos catiónicos y aniónicos sea menor que la de los compuestos neutros con valores similares de $\log P$. Este comportamiento se observa claramente para los compuestos aniónicos pero no para los compuestos catiónicos, los cuales muestran, en algunos casos, retenciones similares a la de los compuestos neutros. Este hecho podría atribuirse a la existencia de interacciones adicionales para los compuestos iónicos con los grupos silanol libres de la fase estacionaria (Méndez A. y col., 2003; Lavine B.K. y col., 1991) o con el surfactante Brij35 presente en el sistema cromatográfico (fase estacionaria y fase móvil).

Para investigar estas hipótesis, se obtuvieron los factores de retención a una concentración micelar cero (k_m) y las constantes de asociación soluto-micela (K_{AM}) mediante las ecuaciones IV.5 y IV.6. Como se ha comentado en el Capítulo IV estas estimaciones pueden ser poco fiables para compuestos de hidrofobicidad media y alta. Por tanto, para realizar este estudio tan sólo se consideraron aquellos compuestos para los que se obtuvieron valores consistentes con ambas ecuaciones. En la Tabla VI.3 se muestran los valores de k_m y K_{AM} obtenidos.

En las Figuras VI.2.B y VI.2.C se muestran los gráficos $\log k_m$ y $\log K_{AM}$ vs. $\log P$, respectivamente para compuestos neutros, catiónicos y aniónicos. En la Tabla VI.4 se muestran los estadísticos de regresión de estas relaciones y en la Tabla VI.5 se muestran los resultados obtenidos al aplicar un ensayo de significación t (Massart D.L. y col., 1997) para la comparación de los valores de las ordenadas en el origen y las pendientes de estas relaciones. Como se puede observar, existe un comportamiento de reparto diferente para los solutos atendiendo a sus propiedades ácido-base.

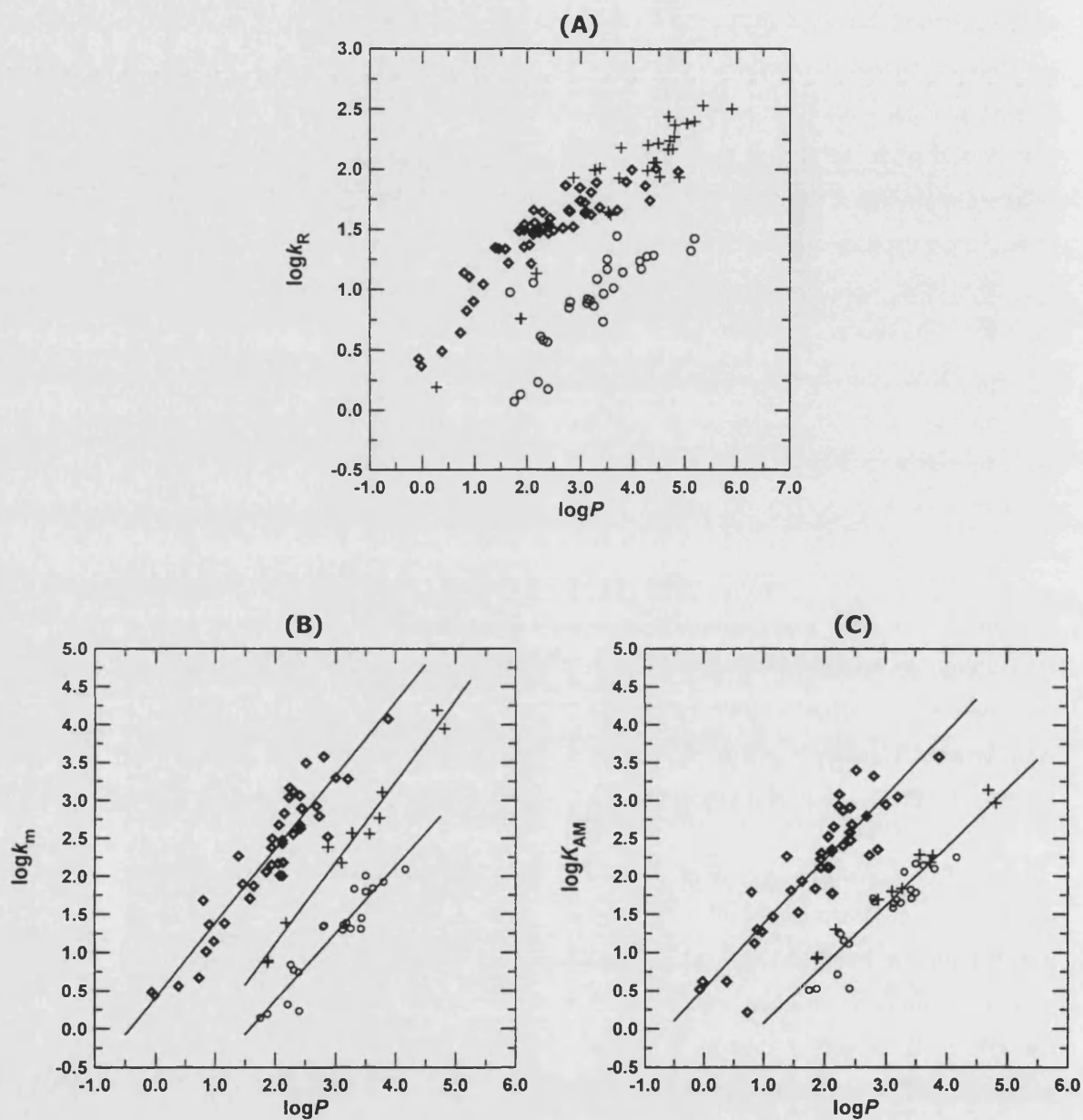


Figura VI.2.- (A) Representación de las relaciones $\log k_R - \log P$ obtenidas para una fase móvil de Brij35 0.04 M. (B) Relaciones $\log k_m - \log P$ y (C) $\log K_{AM} - \log P$. Series estudiadas: (\diamond) compuestos neutros ($\alpha_A = \alpha_B \sim 0$), ($+$) catiónicos ($\alpha_A = 0, \alpha_B \sim +1$) y (\circ) aniónicos ($\alpha_A \sim -1, \alpha_B = 0$). pH 7.4 y $T = 25^\circ\text{C}$.

Tabla VI.3.- Valores de k_m y K_{AM} junto con su desviación estándar estimados a partir de las ecuaciones IV.5 y IV.6 para compuestos neutros ($\alpha_A = \alpha_B \sim 0$), catiónicos ($\alpha_A = 0, \alpha_B \sim +1$) y aniónicos ($\alpha_A \sim -1, \alpha_B = 0$). Sólo se muestran los valores cuyas estimaciones con las dos ecuaciones fueron consistentes.

Compuesto	Ecuación IV.5		Ecuación IV.6	
	$k_m \pm S_{k_m}$	$K_{AM} \pm S_{K_{AM}}, M^{-1}$	$k_m \pm S_{k_m}$	$K_{AM} \pm S_{K_{AM}}, M^{-1}$
Acetanilida	24.2 ± 0.7	29.3 ± 1.0	24.3 ± 0.5	29.7 ± 1.3
Acetato de etilo	4.66 ± 0.09	1.6 ± 0.4	4.65 ± 0.09	1.6 ± 0.5
Acetofenona	50.9 ± 0.7	33.5 ± 0.6	51.1 ± 0.6	33.8 ± 0.7
o-Acetotoluidida	10.3 ± 0.3	13.2 ± 0.7	10.4 ± 0.3	13.4 ± 0.9
Ácido benzoico	1.56 ± 0.06	3.4 ± 0.9	1.57 ± 0.06	3.4 ± 1.0
Ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropiónico	22.86 ± 0.06	43.84 ± 0.14	22.84 ± 0.05	43.78 ± 0.16
Ácido 2-(3-clorofenoxi)propiónico	5.55 ± 0.04	12.9 ± 0.2	5.55 ± 0.04	12.8 ± 0.3
Ácido 2-(4-clorofenoxi)propiónico	5.969 ± 0.018	14.22 ± 0.08	5.972 ± 0.016	14.24 ± 0.11
Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético	20.5 ± 1.2	45 ± 3	20.9 ± 0.9	46 ± 3
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	22.6 ± 1.0	46 ± 2	22.9 ± 0.8	47 ± 3
Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)propiónico	28.2 ± 0.8	51.2 ± 1.6	28.5 ± 0.6	51.8 ± 1.8
Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico	2.08 ± 0.05	5.2 ± 0.6	2.09 ± 0.05	5.2 ± 0.7
Ácido 2-fenoxipropiónico	1.39 ± 0.12	3 ± 2	1.39 ± 0.11	3 ± 2
Ácido 2-iodobenzoico	1.71 ± 0.04	3.4 ± 0.6	1.72 ± 0.04	3.4 ± 0.7
Ácido 4-(2-metil-4-clorofenoxi)butírico	102 ± 15	150 ± 20	107 ± 12	160 ± 20
Ácido salicílico	7.0 ± 0.2	17.4 ± 0.9	7.01 ± 0.18	17.6 ± 1.1
Ácido (2,4,5-triclorofenoxi)acético	68 ± 6	114 ± 11	71 ± 5	118 ± 10
Ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propiónico	84 ± 6	125 ± 9	86 ± 4	129 ± 8
Alprazolam	300 ± 60	220 ± 40	320 ± 40	240 ± 40
Alprenolol	150 ± 30	63 ± 12	140 ± 18	57 ± 11
Anilina	23.1 ± 0.6	19.9 ± 0.8	23.2 ± 0.5	20.2 ± 1.0
Antipirina	3.64 ± 0.07	4.2 ± 0.4	3.64 ± 0.06	4.2 ± 0.5
Benceno	152 ± 5	59 ± 2	150 ± 4	58 ± 2
Bromazepam	147 ± 11	132 ± 10	152 ± 8	136 ± 9
Buturón	2000 ± 800	900 ± 400	2200 ± 700	1000 ± 300
Cafeína	3.06 ± 0.09	3.3 ± 0.7	3.06 ± 0.08	3.3 ± 0.7
Ciproheptadina	16000 ± 13000	1400 ± 1100	15000 ± 12000	1300 ± 1100
Clobazam	270 ± 20	212 ± 18	280 ± 16	220 ± 15
Clometiazol	102 ± 2	59.4 ± 1.2	100.9 ± 1.5	58.8 ± 1.3
Clonazepam	1200 ± 500	800 ± 300	1300 ± 400	900 ± 300
Clordiazepóxido	780 ± 70	480 ± 40	750 ± 40	460 ± 30
2-Clorofenol	680 ± 100	450 ± 70	630 ± 60	420 ± 40
Clortolurón	472 ± 13	378 ± 11	466 ± 9	373 ± 8
o-Cresol	312 ± 8	201 ± 5	309 ± 6	199 ± 4

(Continúa en la página siguiente)

Tabla VI.3.- Continuación.

Compuesto	Ecuación IV.5		Ecuación IV.6	
	$k_m \pm s_{k_m}$	$K_{AM} \pm s_{K_{AM}}, M^{-1}$	$k_m \pm s_{k_m}$	$K_{AM} \pm s_{K_{AM}}, M^{-1}$
<i>p</i> -Cresol	239 ± 10	169 ± 7	234 ± 7	165 ± 6
Diazepam	4000 ± 2000	2100 ± 1300	4000 ± 2000	2200 ± 1200
Difenhidramina	370 ± 20	69 ± 5	381 ± 18	71 ± 5
2,4-Dimetilfenol	1300 ± 300	730 ± 170	1180 ± 160	650 ± 90
Diurón	800 ± 300	600 ± 200	900 ± 300	700 ± 200
Fenbufeno	70 ± 30	140 ± 50	80 ± 20	150 ± 60
Fenol	78.38 ± 0.18	64.87 ± 0.16	78.44 ± 0.13	64.94 ± 0.16
Fenurón	14.01 ± 0.04	18.69 ± 0.09	14.01 ± 0.04	18.72 ± 0.12
Flunitrazepam	480 ± 60	330 ± 50	500 ± 50	350 ± 40
Fluometurón	430 ± 70	300 ± 50	450 ± 50	320 ± 40
Flurbiprofeno	120 ± 60	180 ± 90	130 ± 50	190 ± 90
Ibuprofeno	63 ± 14	60 ± 15	66 ± 12	65 ± 16
Isoproturón	331 ± 11	224 ± 7	336 ± 7	228 ± 6
Ketoprofeno	20 ± 2	38 ± 5	20.4 ± 1.7	40 ± 6
Lamotrigina	103 ± 14	131 ± 18	107 ± 10	138 ± 16
Linurón	1900 ± 1200	1100 ± 700	2000 ± 1200	1200 ± 700
Lorazepam	3000 ± 2000	2500 ± 1700	3000 ± 2000	2500 ± 1700
Lormetazepam	1100 ± 400	900 ± 300	1200 ± 300	900 ± 200
Metapirileno	240 ± 60	49 ± 13	220 ± 40	42 ± 12
Metoprolol	7.9 ± 0.3	8.7 ± 1.1	7.9 ± 0.3	8.9 ± 1.3
Metoxurón	74 ± 7	86 ± 8	77 ± 5	90 ± 8
Monolinurón	360 ± 10	253 ± 7	365 ± 7	257 ± 5
Monurón	141 ± 15	130 ± 14	146 ± 11	136 ± 13
Naproxeno	25 ± 4	49 ± 8	26 ± 3	52 ± 10
<i>p</i> -Nitroanilina	185 ± 12	184 ± 12	180 ± 8	178 ± 9
Nitrobenzeno	114 ± 4	69 ± 3	113 ± 3	68 ± 2
Orfenadrina	1290 ± 30	188 ± 4	1283 ± 19	186 ± 3
Oxazepam	1500 ± 600	1200 ± 500	1600 ± 500	1300 ± 400
Oxprenolol	24.7 ± 0.9	20.0 ± 1.1	24.9 ± 0.8	20.4 ± 1.4
Procaína	7.5 ± 0.4	8.3 ± 1.4	7.4 ± 0.4	8.0 ± 1.7
Progesterona	12000 ± 4000	3700 ± 1300	13000 ± 4000	4200 ± 1100
Prometazina	9000 ± 3000	900 ± 300	7400 ± 1500	770 ± 160
Propranolol	364 ± 10	193 ± 5	360 ± 7	190 ± 4
Resorcinol	47.9 ± 1.4	61.8 ± 1.9	48.4 ± 1.1	63 ± 2
Sulindac	20 ± 5	66 ± 17	21 ± 4	71 ± 19
Teofilina	2.77 ± 0.11	4.2 ± 1.0	2.77 ± 0.11	4.3 ± 1.1
Tetracaína	590 ± 170	150 ± 50	510 ± 100	130 ± 30
Tolmetín	22 ± 3	51 ± 6	23 ± 2	53 ± 7
Tolueno	620 ± 40	188 ± 11	610 ± 20	183 ± 8

Tabla VI.4.- Análisis estadístico de las relaciones lineales $\log k_m$ o $\log K_{AM}$ vs. $\log P$ para las series de compuestos neutros ($\alpha_A = \alpha_B \sim 0$), catiónicos ($\alpha_A = 0, \alpha_B \sim +1$) y aniónicos ($\alpha_A \sim -1, \alpha_B = 0$) mostrados en la Tabla VI.3.

Series	Relación	<i>n</i>	$b_0 \pm ts_{b_0}$ ^a (<i>p</i>)	$b_1 \pm ts_{b_1}$ ^b (<i>p</i>)	r^2 (r^2)	F (<i>p</i>)	$S_{y/x}$
Neutros	$\log k_m - \log P$	41	0.4 ± 0.3 (0.0019)	0.97 ± 0.12 (<0.0001)	0.87 (0.87)	270 (<0.0001)	0.32
Catiónicos		11	-1.0 ± 0.5 (0.0007)	1.07 ± 0.14 (<0.0001)	0.97 (0.97)	314 (<0.0001)	0.19
Aniónicos		21	-1.4 ± 0.5 (<0.0001)	0.88 ± 0.16 (<0.0001)	0.88 (0.87)	139 (<0.0001)	0.22
Neutros	$\log K_{AM} - \log P$	41	0.5 ± 0.3 (0.0006)	0.85 ± 0.14 (<0.0001)	0.80 (0.79)	155 (<0.0001)	0.36
Iónicos		32	-0.7 ± 0.3 (0.0001)	0.77 ± 0.10 (<0.0001)	0.90 (0.89)	260 (<0.0001)	0.21

^a Ordenada en el origen.

^b Pendiente.

Los detalles acerca de los parámetros estadísticos se muestran en el apartado III.5.

Tabla VI.5.- Resultados de los ensayos de significación *t* para la comparación de los valores de las ordenadas en el origen y de las pendientes de las relaciones mostradas en la Tabla VI.4.

Series comparadas (1-2)	Relación	ν ^a	$ t (b_{01} - b_{02})$ ^b	$ t (b_{11} - b_{12})$ ^c	$t_{0.025, \nu}$ ^d
Neutros-Catiónicos	$\log k_m - \log P$	48	13.220	0.874	2.011
Neutros-Aniónicos		58	16.155	0.815	2.002
Catiónicos-Aniónicos		28	3.793	1.903	2.048
Neutros-Iónicos	$\log K_{AM} - \log P$	69	13.657	0.827	1.995

^a Grados de libertad.

^b Valor absoluto del estadístico *t* calculado para la comparación de las ordenadas en el origen de las series.

^c Valor absoluto del estadístico *t* calculado para la comparación de las pendientes de las series.

^d Valor crítico del estadístico *t* tabulado para un nivel de confianza del 95%, un ensayo de dos colas y ν grados de libertad.

Hipótesis nula (H_0): $b_{i1} = b_{i2}$.

Hipótesis alternativa (H_1): $b_{i1} \neq b_{i2}$.

Criterio de rechazo de la hipótesis nula: $|t| > t_{0.025, \nu}$ (valores estadísticamente no comparables).

Para la selección del ensayo *t* apropiado, previamente se compararon las varianzas mediante un ensayo de significación con el estadístico *F*. En todos los casos, los ensayos *F* mostraron que las varianzas eran estadísticamente comparables.



Si se consideran las interacciones soluto-fase estacionaria reflejadas en el parámetro $\log k_m$ (Figura VI.2.B), se observan relaciones independientes para las tres series consideradas. Los valores de las pendientes para las tres series fueron estadísticamente comparables a un nivel de confianza del 95% (Tabla VI.5) y próximos a la unidad, lo que indica que el parámetro $\log k_m$ en CMB proporciona una escala de hidrofobicidad similar a la del sistema *n*-octanol/agua. Por otro lado, para la serie de compuestos neutros el valor de la ordenada en el origen de las relaciones $\log k_m - \log P$ fue distinto de cero, lo que refleja las diferencias entre la fase estacionaria en CMB y el *n*-octanol. La comparación de los valores de las ordenadas en el origen para compuestos neutros e iónicos proporciona información acerca de las diferencias en las interacciones soluto-fase estacionaria. Para las series de compuestos catiónicos y aniónicos los valores de las ordenadas en el origen fueron negativos y estadísticamente diferentes del obtenido para los compuestos neutros (Tabla VI.5), lo que confirma la menor afinidad de los compuestos iónicos por la fase estacionaria modificada. Además, el valor de la ordenada en el origen para la serie de los compuestos aniónicos fue estadísticamente diferente y más negativo que el obtenido para los catiónicos, lo que indica la existencia de una interacción electrónica adicional soluto-fase estacionaria.

Por otro lado, como puede observarse en la Figura VI.2.C, $\log K_{AM}$ al igual que $\log k_m$ está linealmente relacionado con $\log P$ (Tabla VI.4) pero los valores de las pendientes de las relaciones $\log K_{AM} - \log P$ fueron menores que los observados en las relaciones $\log k_m - \log P$ (Tabla VI.4 y Figura VI.2.C) lo que indica que las interacciones hidrófobas soluto-fase estacionaria son más sensibles a las variaciones de hidrofobicidad que las interacciones soluto-micela. Por otro lado, el gráfico $\log K_{AM} - \log P$ sólo discrimina entre el comportamiento de los solutos neutros e iónicos con independencia del signo de la carga. Los valores de las ordenadas en el origen para las series de compuestos neutros e iónicos fueron estadísticamente diferentes y la comparación de sus valores indica que los solutos iónicos tienen menor afinidad por las micelas de Brij35. Por tanto, las interacciones soluto-micela no dependen del signo de la carga del compuesto y consecuentemente no son las responsables del comportamiento diferencial de los solutos catiónicos y aniónicos.

A la vista de los resultados obtenidos, las diferencias observadas en el comportamiento de retención de los solutos catiónicos y aniónicos sólo puede atribuirse a interacciones electrónicas con los grupos silanol libres en la fase estacionaria. De acuerdo con ésto la retención de los compuestos catiónicos debe ser mayor de la esperada atendiendo a su hidrofobicidad y grado de ionización. Por el contrario, la retención de los compuestos aniónicos debe ser menor de la esperada debido a la presencia de repulsiones electrostáticas con los grupos silanol.

Con el fin de profundizar en el mecanismo de retención de los compuestos en CMB, resultaría de interés la evaluación de estos comportamientos de retención mediante modelos basados en LSERs. Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, los descriptores solvatocrómicos para muchas de las moléculas consideradas en este estudio no están disponibles bibliográficamente.

VI.3.2.- Variables para la descripción de la retención en CMB. Estudio multivariante

Con el fin de identificar las principales variables que determinan la retención en CMB, se llevó a cabo una regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). Puesto que las variables latentes (LVs, siglas de "latent variables") resultantes de un modelo PLS son ortogonales, esta estrategia quimiométrica evita el problema de colinealidad entre variables y permite la selección y reducción de variables para su posterior utilización en otros modelos.

Para la construcción del modelo PLS, se utilizaron los valores de retención experimentales (expresados como $\log k_R$) de los 151 compuestos ensayados en las tres fases móviles como vector $\mathbf{y}_{453 \times 1}$. Para la construcción de la matriz $\mathbf{X}_{453 \times 8}$ se utilizaron los valores de las variables: concentración de Brij35 en las fases móviles ($[Brij35]$), $\log P$, $|\alpha_A|$, $|\alpha_B|$, polarizabilidad, R_{mv} , V_m y Pr . La regresión PLS se realizó utilizando datos autoescalados tanto en la matriz \mathbf{X} como en el vector \mathbf{y} . El número de variables latentes se optimizó mediante validación cruzada ("Venetian blinds cross-validation", con bloques aleatorios).

Se seleccionaron tres variables latentes que explicaban el 83.3% y el 83.0% de la varianza de \mathbf{y} en la etapa de calibración y validación cruzada, respectivamente. La cuarta variable latente explicaba un 9.7% de la varianza de la matriz \mathbf{X} (en calibración), pero tan sólo explicaba ~ 0.16% de la varianza de \mathbf{y} . Esto sugiere que existen tres fuentes principales de variación en los datos responsables de la retención de las moléculas. Las pequeñas diferencias en los valores de los parámetros $RMSEC$ (0.245) y $RMSECV$ (0.248) para el modelo de 3 variables latentes sugiere que el modelo es robusto y presenta una buena capacidad de predicción. Los valores obtenidos para estos parámetros con el modelo de cuatro variables latentes ($RMSEC = 0.244$ y $RMSECV = 0.247$) fueron muy parecidos a los obtenidos con el modelo de tres variables latentes lo que confirma la selección adecuada del número de variables latentes en el modelo PLS.

En el modelo PLS la relación \mathbf{y} - \mathbf{X} puede expresarse en la forma general de un modelo de regresión (p. ej., $\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{b} + \mathbf{e}$ en notación matricial), donde \mathbf{b} es el vector de los coeficientes de regresión y \mathbf{e} el vector de los residuos. En la Figura VI.3 se muestran los valores de los coeficientes \mathbf{b} para el modelo PLS de 3 variables latentes con su incertidumbre. Este gráfico muestra la importancia de las variables independientes en la descripción y predicción de la retención. Como se puede observar, la contribución de los descriptores moleculares V_m , R_{mv} , Pr y polarizabilidad a la predicción de $\log k_R$ es muy baja. Además, con la excepción de Pr , no son estadísticamente significativos, es decir, estas variables pueden eliminarse del modelo sin afectarle sustancialmente. Por el contrario, $\log P$ es la variable más importante en el modelo PLS y es directamente proporcional a $\log k_R$. La variable $|\alpha_A|$ es la segunda más importante en la predicción de $\log k_R$, seguida de $[Brij35]$ y $|\alpha_B|$, todas ellas son inversamente proporcionales a $\log k_R$. La variable $|\alpha_B|$

apenas es estadísticamente significativa, sin embargo, debería mantenerse en el modelo para tener en cuenta el mecanismo de retención especial de los compuestos catiónicos.

El modelo PLS obtenido no es fortuito, si no que tiene el significado físico-químico esperado. El modelo indica que la retención en CMB (expresada como $\log k_R$) aumenta al aumentar la hidrofobicidad de los compuestos (expresada como $\log P$), disminuye al aumentar la concentración de micelas en la fase móvil, depende inversamente de los parámetros electrónicos ($|\alpha_A|$ y $|\alpha_B|$) y en una menor extensión de los estéricos (P). Adicionalmente, los compuestos ácidos tienen una retención menor que los básicos ($|b| (|\alpha_A|) > |b| (|\alpha_B|)$).

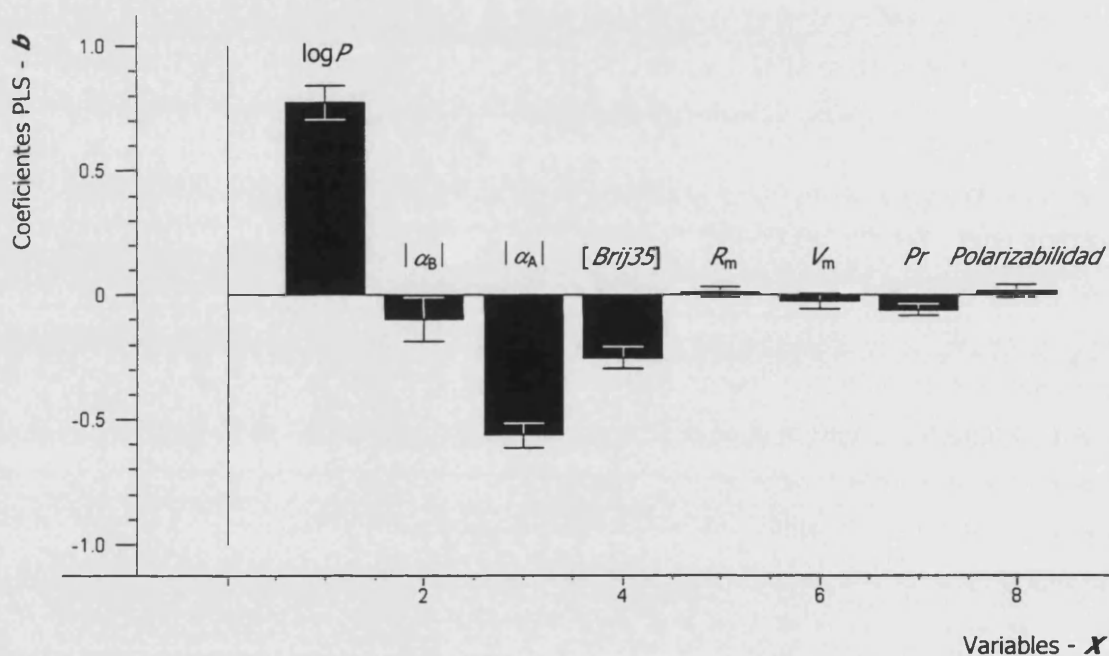


Figura VI.3.- Coeficientes de ajuste (b) con sus incertidumbres asociadas ($\pm 2s_b$) correspondientes a la tercera variable latente del modelo PLS para cada una de las variables de la matriz $X_{453,8}$. Modelo PLS obtenido utilizando datos autoescalados.

El modelo PLS obtenido tras la eliminación de las variables estadísticamente no significativas de la matriz X (V_m , R_m , P_r y polarizabilidad) no cambió respecto al obtenido utilizando todas las variables y confirmó los resultados obtenidos. Por tanto, estas variables pueden descartarse en futuros estudios.

Para confirmar las conclusiones del modelo PLS, se realizó una regresión lineal múltiple paso a paso ("*stepwise MLR*") con los métodos de selección de variables de avance ("*forward*") y de retroceso ("*backward*") (F de inclusión = 4.0, F de exclusión = 4.0) utilizando datos no escalados. La selección con el método de avance tan sólo consideró $\log P$, $|\alpha_A|$, $|\alpha_B|$ y $[Brij35]$ como variables útiles para la descripción de la retención. Por otro lado, el método de retroceso confirmó las variables anteriores y además mantuvo las variables R_m y V_m . Sin embargo, al utilizar un criterio de exclusión más estricto aumentando ligeramente el valor del estadístico F de exclusión, se descartaron las variables R_m y V_m del modelo MLR.

La selección de variables estéricas, tanto por el modelo PLS (P_r) como por el modelo MLR (R_m y V_m) sugiere que es muy pequeña la importancia relativa de las interacciones estéricas frente a las interacciones de tipo hidrófobo y electrónico. Por tanto, a fin de obtener modelos QSRR más sencillos, es posible excluir los descriptores estéricos sin que afecten al modelo sustancialmente.

Por otro lado, debido a la naturaleza no lineal de relación $\log k_R$ - $\log P$ (Figura VI.2.A), se incluyó el término cuadrático $(\log P)^2$ en el modelo. Los métodos de selección de variables de avance y retroceso confirmaron la significación estadística de esta nueva variable.

VI.3.3.- Modelos de retención

VI.3.3.1- Modelos MLR

De acuerdo con los resultados del apartado anterior, para la construcción de la matriz X se utilizaron las variables $\log P$, $(\log P)^2$, $|\alpha_A|$, $|\alpha_B|$ y $[Brij35]$. En la Tabla VI.6 se muestran los modelos MLR obtenidos utilizando los datos de retención para cada fase móvil y otro que incluye los datos de retención de las tres fases móviles estudiadas y que incorpora, por tanto, la variable $[Brij35]$.

Los resultados indican que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables y - X a un nivel de confianza del 95 % ($p < 0.05$). Los coeficientes de ajuste de las variables independientes fueron también significativos al mismo nivel de confianza. Los valores del estadístico r^2 indican que los modelos explican el 83 – 84 % de la variabilidad existente en los datos de $\log k_R$. Los valores del parámetro estadístico r^2 ajustado a los grados de libertad (r^{2*} , parámetro más adecuado para la comparación de modelos con un número diferente de variables independientes) estuvieron comprendidos entre 0.82 y 0.84. Los valores del estadístico $s_{y/x}$ fueron

menores de 0.26, este valor es similar al obtenido para otros modelos QSRR publicados en la bibliografía para "series cortas de datos" de compuestos neutros cromatografiados en RP-HPLC, donde el número de interacciones involucradas soluto-fase móvil y soluto-fase estacionara es menor que en MLC (CMB).

Por otro lado, el análisis de los residuos de los modelos no reveló ninguna tendencia en función de la familia de compuestos (variable categórica) o de alguna de las variables de la matriz X . Todos estos resultados indican que se puede considerar que los modelos QSRR obtenidos presentan una validez general para todo tipo de moléculas, al menos respecto a las variables consideradas en este estudio.

Por otra parte, del análisis de los coeficientes de ajuste se observa que al aumentar la concentración de Brij35 en la fase móvil disminuye el valor absoluto de los mismos ya que disminuye la retención. Por otro lado, los valores absolutos de los coeficientes de ajuste de la variable $|a_A| (b_3)$ fueron mayores que los de la variable $|a_B| (b_4)$, al igual que en el modelo PLS, lo que indica que para un valor dado de $\log P$ y de grado de ionización, un compuesto aniónico tendrá una retención menor que un compuesto catiónico y la forma neutra de un soluto presentará una retención mayor o al menos similar a la de la correspondiente forma ionizada.

Como puede observarse en la Tabla VI.6, los valores de $RMSEC$ y $RMSECV$ fueron similares lo que indica la robustez de los modelos. En la Figura VI.4 se muestran los gráficos de validación en los que se representan los valores de $\log k_R$ predichos en calibración y en validación cruzada frente a los valores experimentales para el modelo obtenido utilizando los datos de retención con la fase móvil de Brij35 0.04 M (Figura VI.4.A) y para el modelo el obtenido utilizando todos los datos de retención (Figura VI.4.B). Como se puede observar, los valores predichos en calibración y validación son coincidentes y se distribuyen alrededor de la línea recta teórica (pendiente y ordenada en el origen igual a 1 y 0, respectivamente). Los compuestos más hidrófilos y los más hidrófobos presentan los valores de residuos más altos. Estas desviaciones podrían atribuirse a los problemas comentados anteriormente en la determinación de $\log P$ de dichos compuestos. A pesar de la dispersión observada en los datos, la adecuación del modelo para la descripción y predicción de los mismos es satisfactoria teniendo en cuenta la complejidad de las interacciones a modelar, la diversidad de compuestos y la incertidumbre de los descriptores.

Tabla VI.6.- Análisis estadístico ^a de los modelos MLR: $\log k_R = b_0 + b_1 \log P + b_2 (\log P)^2 + b_3 |\alpha_A| + b_4 |\alpha_B| + b_5 [Brij35]$.

[Brij35] (M)	n	$b_0 \pm ts_{b_0}$ (p)	$b_1 \pm ts_{b_1}$ (p)	$b_2 \pm ts_{b_2}$ (p)	$b_3 \pm ts_{b_3}$ (p)	$b_4 \pm ts_{b_4}$ (p)	$b_5 \pm ts_{b_5}$ (p)	r ² (r ²)	F (p)	s _{y/x}	RMSEC	RMSECV
0.02	151	0.63 ± 0.18 (< 0.0001)	0.59 ± 0.13 (< 0.0001)	-0.03 ± 0.02 (-0.0014)	-0.97 ± 0.12 (< 0.0001)	-0.25 ± 0.12 (-0.0001)	-	0.84 (0.83)	187 (< 0.0001)	0.26	0.252	0.261
0.04	151	0.59 ± 0.17 (< 0.0001)	0.48 ± 0.12 (< 0.0001)	-0.024 ± 0.019 (-0.0112)	-0.88 ± 0.11 (< 0.0001)	-0.15 ± 0.11 (-0.0073)	-	0.83 (0.83)	183 (< 0.0001)	0.23	0.228	0.234
0.06	151	0.56 ± 0.16 (< 0.0001)	0.41 ± 0.11 (< 0.0001)	-0.019 ± 0.018 (-0.0359)	-0.82 ± 0.10 (< 0.0001)	-0.12 ± 0.10 (-0.0274)	-	0.83 (0.82)	177 (< 0.0001)	0.22	0.214	0.220
0.02; 0.04; 0.06	453	0.96 ± 0.11 (< 0.0001)	0.50 ± 0.07 (< 0.0001)	-0.026 ± 0.011 (< 0.0001)	-0.89 ± 0.06 (< 0.0001)	-0.17 ± 0.06 (< 0.0001)	-9.2 ± 1.4 (< 0.0001)	0.84 (0.84)	461 (< 0.0001)	0.24	0.237	0.240

^a Los detalles sobre los parámetros estadísticos se muestran en el apartado III.5.



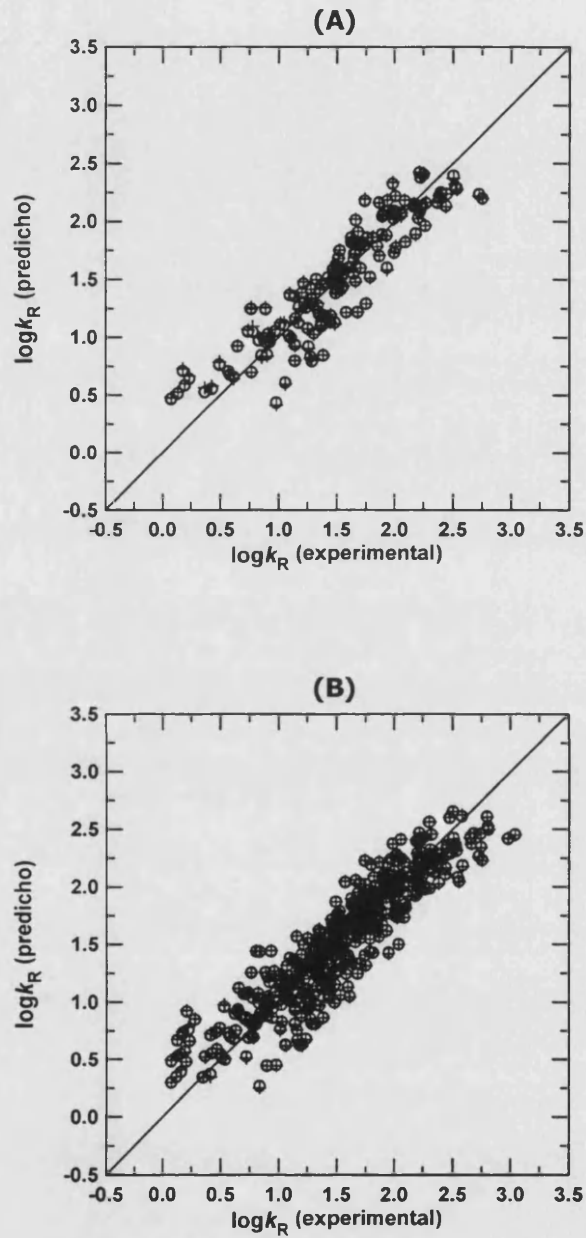


Figura VI.4.- Gráficos de validación de los modelos MLR obtenidos utilizando: **(A)** los datos de retención en una fase móvil de Brij35 0.04 M y **(B)** los datos de retención obtenidos con las fases móviles de Brij35 0.02, 0.04 y 0.06 M. La línea continua representa la recta teórica (pendiente = 1, ordenada en el origen = 0). Valores de $\log k_R$ predichos por interpolación en el modelo en la etapa de calibración (O) y en la etapa de validación cruzada (+).

VI.3.3.2- Modelos no lineales alternativos

Tal y como se ha mostrado en el apartado VI.3.1, los valores de $\log k_m$ y $\log K_{AM}$ están linealmente relacionados con $\log P$. Sin embargo, $\log k_m$ discrimina el comportamiento de retención de los compuestos neutros, catiónicos y aniónicos mientras que $\log K_{AM}$ sólo diferencia entre la retención de los compuestos neutros e iónicos. Teniendo en cuenta estas observaciones, se podrían considerar las siguientes expresiones:

$$\log k_m = a_0 + a_1 \log P + a_2 |\alpha_A| + a_3 |\alpha_B| \quad (VI.4)$$

$$\log K_{AM} = b_0 + b_1 \log P + b_2 |\alpha_B + \alpha_A| \quad (VI.5)$$

Teniendo en cuenta las ecuaciones IV.1 y IV.2 descritas en el Capítulo IV para compuestos neutros, para la descripción de la retención de compuestos neutros e iónicos en CMB se ensayó la siguiente ecuación:

$$\log k_R = a_0 + a_1 \log P + a_2 |\alpha_A| + a_3 |\alpha_B| - \log \left(1 + [M] \cdot 10^{(b_0 + b_1 \log P + b_2 |\alpha_B + \alpha_A|)} \right) \quad (VI.6)$$

Para compuestos neutros ($\alpha_A = \alpha_B = 0$), la ecuación VI.6 se convierte en la ecuación IV.2. Los datos se ajustaron a la ecuación VI.6 mediante el algoritmo iterativo de búsqueda de Marquardt. La concentración micelar, $[M]$, se calculó como la diferencia entre la concentración total de surfactante, $[Brij35]$, y la concentración micelar crítica, CMC (CMC (Brij35) = 1×10^{-4} M). En la Tabla VI.7 se muestran los coeficientes de ajuste y algunos parámetros estadísticos de los modelos obtenidos para cada una de las fases móviles ($[M] = 0.0199$; 0.0399 ó 0.0599 M) y para el modelo general obtenido utilizando conjuntamente los datos de retención de las tres fases móviles micelares, incluyendo en este caso la concentración micelar molar, $[M]$, como variable.

El estadístico r^2 indica que los modelos explican aproximadamente el 86% de la varianza en los datos de $\log k_R$. Los valores de r^2 fueron ~ 0.85 en todos los casos y los de $s_{y/x}$ inferiores a 0.24. Los gráficos de residuos de los modelos propuestos mostraron un valor medio próximo a cero, lo que sugiere la adecuación de los modelos propuestos.

Los modelos desarrollados tienen un significado físico-químico que concuerda con las observaciones realizadas en los apartados anteriores. Por un lado, los coeficientes de ajuste fueron estadísticamente similares en todos los modelos. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que estos coeficientes determinan los valores de k_m y K_{AM} y dichos parámetros son característicos de un compuesto en un sistema cromatográfico dado. Por otro lado, los coeficientes a_1 , que están relacionados con las interacciones hidrófobas soluto-fase estacionaria (k_m) fueron mayores que los coeficientes b_1 que reflejan las interacciones hidrófobas soluto-fase móvil (K_{AM}). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio univariante (apartado VI.3.1). Adicionalmente, los coeficientes de ajuste a_2 , a_3 y b_2 , que están relacionados con el grado de ionización de los



compuestos, fueron negativos lo que indica de nuevo que las formas ionizadas de los compuestos tienen una retención menor que las correspondientes formas neutras. Finalmente, los coeficientes de ajuste de la variable $|\alpha_A|$ (a_2 , en valor absoluto) fueron mayores que los correspondientes para la variable $|\alpha_B|$ (a_3) lo que indica que para un determinado valor de $\log P$ y grado de ionización, los compuestos aniónicos presentan una menor retención que los catiónicos. Estos resultados están de acuerdo con los previamente obtenidos en los modelos MLR y PLS.

La Figura VI.5 muestra los gráficos de validación $\log k_R$ predicho frente a experimental, utilizando los datos obtenidos para una concentración micelar 0.0399 M (Figura VI.5.A) y los obtenidos utilizando los datos de retención en las tres fases móviles estudiadas (Figura VI.5.B). Como puede observarse, excepto para los compuestos más hidrófilos la capacidad de los modelos para la descripción y predicción de los datos de $\log k_R$ fue adecuada y similar a la de los modelos MLR.

Las propiedades estadísticas (r^2 , r'^2 , $s_{y/x}$) de los modelos QSRR derivados de la ecuación VI.6 son similares a las obtenidas con los modelo MLR. Sin embargo, el ajuste del modelo MLR es más sencillo que el de un algoritmo iterativo de búsqueda. Por tanto, el modelo MLR es preferible para la predicción de la retención, desde un punto de vista práctico.

Tabla VI.7.- Análisis estadístico ^a de los modelos no lineales (ecuación VI.6): $\log k_R = a_0 + a_1 \log P + a_2 |\alpha_A| + a_3 |\alpha_B| - \log \left(1 + [M] \cdot 10^{(b_0 + b_1 \log P + b_2 |\alpha_B + \alpha_A|)} \right)$.

$[M]$ (M)	n	$a_0 \pm ts_{a_0}$	$a_1 \pm ts_{a_1}$	$a_2 \pm ts_{a_2}$	$a_3 \pm ts_{a_3}$	$b_0 \pm ts_{b_0}$	$b_1 \pm ts_{b_1}$	$b_2 \pm ts_{b_2}$	$r^2_{r^2}$	F	$S_{y/x}$
0.0199	151	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.3	-1.4 ± 0.5	-0.7 ± 0.4	0.8 ± 1.0^b	0.32 ± 0.10	-0.6 ± 0.3	0.86 (0.85)	1214	0.24
0.0399	151	0.9 ± 0.5	0.6 ± 0.3	-1.4 ± 0.6	-0.7 ± 0.6	0.8 ± 1.1^b	0.27 ± 0.07	-0.6 ± 0.2	0.85 (0.85)	1127	0.22
0.0599	151	1.1 ± 0.8	0.8 ± 0.6	-1.6 ± 0.9	-0.9 ± 0.8	1.1 ± 0.8	0.29 ± 0.19	-0.5 ± 0.3	0.85 (0.84)	1043	0.21
0.0199; 0.0399; 0.0599	453	0.71 ± 0.14	0.73 ± 0.10	-1.51 ± 0.17	-0.75 ± 0.16	0.9 ± 0.2	0.55 ± 0.09	-0.87 ± 0.18	0.86 (0.86)	3513	0.22

^a Los detalles sobre los parámetros estadísticos se muestran en el apartado III.5.

^b Estadísticamente no significativo.

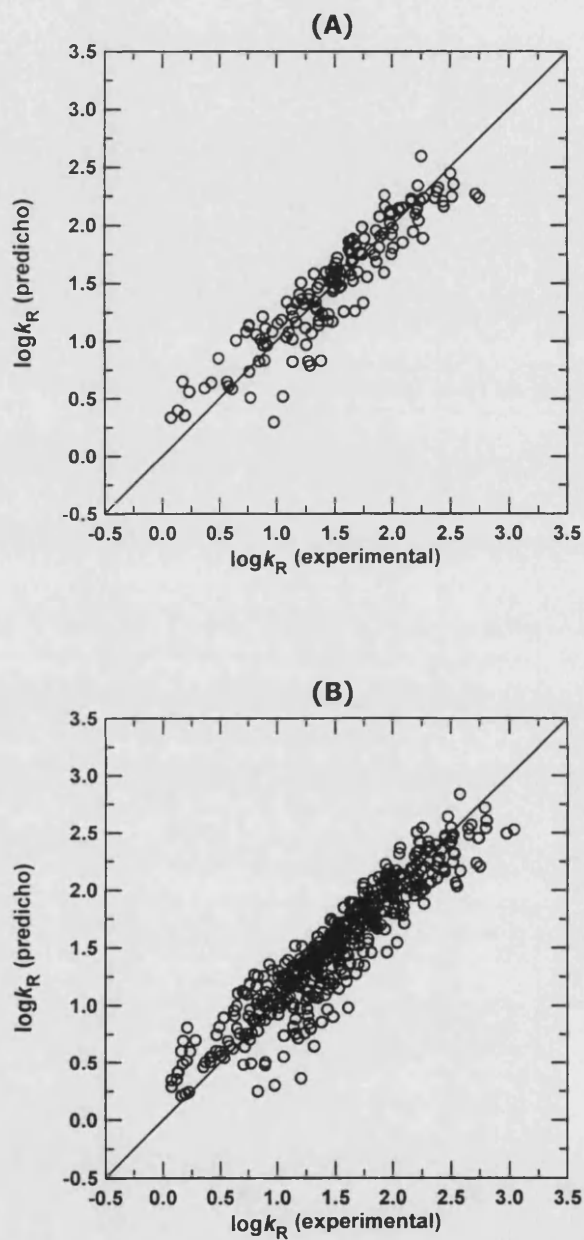


Figura VI.5.- Gráficos de validación de los modelos no lineales (ecuación VI.6) obtenidos utilizando: **(A)** los datos de retención en una fase móvil de Brij35 0.04 M y **(B)** los datos de retención obtenidos con las fases móviles de Brij35 0.02, 0.04 y 0.06 M. La línea continua representa la recta teórica (pendiente = 1, ordenada en el origen = 0).

VI.4.- Conclusiones

Dado el elevado número de compuestos estudiados en este Capítulo y a su diversidad estructural, se pueden extraer algunas conclusiones de validez general respecto a los principales aspectos determinantes de la retención de un compuesto en CMB:

- i.- La retención de cualquier molécula en CMB, expresada como $\log k_R$, puede describirse en términos de su hidrofobicidad (expresada como $\log P$) y su carga molar total negativa y positiva (expresadas como α_A y α_B , respectivamente) con independencia de la familia química a la que pertenezca. Los descriptores moleculares refracción molar, volumen molar, "parachor" y polarizabilidad tienen una influencia insignificante sobre la retención. Esto no significa que otros parámetros no incluidos en este estudio sean significativamente influyentes.
- ii.- Los diferentes modelos QSRR estudiados para la descripción y predicción de la retención de compuestos neutros e ionizables en CMB presentan un significado físico-químico coherente. Además, muestran características estadísticas satisfactorias teniendo en cuenta la variedad de interacciones a modelar, la diversidad de compuestos y la incertidumbre asociada a los descriptores moleculares.
- iii.- A la vista de la similitud de los resultados proporcionados por los modelos MLR y los derivados de la ecuación VI.6, para la descripción y predicción de la retención de un compuesto en CMB son preferibles los modelos MLR propuestos, desde un punto de vista práctico.

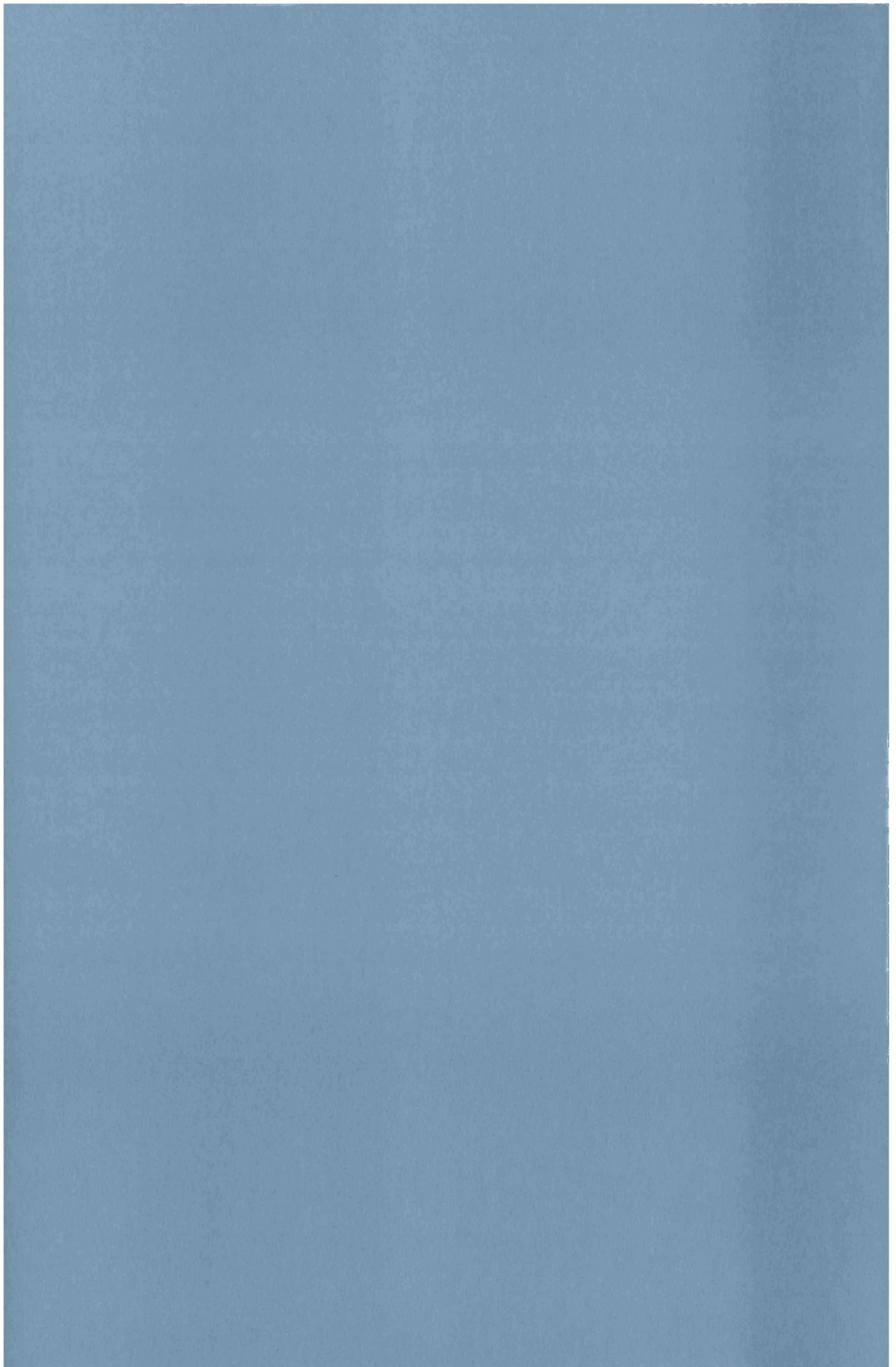


CAPÍTULO VII

Relaciones Cuantitativas Actividad-Retención en Cromatografía Micelar de Bio-reparto

I.- Farmacología: Anestésicos Locales y Antiinflamatorios no Esteroides

VII.1.- Introducción	191
VII.1.1.- Farmacología de anestésicos locales	193
VII.1.2.- Farmacología de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	196
VII.2.- Datos y metodología	199
VII.3.- Resultados y discusión	199
VII.3.1.- Comportamiento de retención de los anestésicos locales y de los AINEs en cromatografía micelar de bio-reparto	199
VII.3.2.- Relaciones actividad - retención para los anestésicos locales en CMB	201
VII.3.3.- Relaciones actividad - retención para los AINEs en CMB	207
VII.3.4.- Modelos CMB-QRAR frente a IAM-QRAR	213
VII.3.5.- Ventajas e inconvenientes de los sistemas CMB e IAM en la obtención de modelos QRAR	217
VII.4.- Conclusiones	219



VII.1.- Introducción

La farmacología es la ciencia que estudia las acciones y propiedades de los fármacos en los organismos vivos. Según la definición clásica, un fármaco es toda sustancia química extraña a un organismo vivo que es capaz de interactuar con el mismo. Recientemente, esta definición tan amplia se suele asignar al término xenobiótico mientras que el término fármaco se asigna a "toda sustancia química utilizada en el tratamiento, curación, prevención y diagnóstico de una enfermedad o para evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado" (Flórez J. y col., 1997).

La farmacología abarca todos los aspectos relacionados con el fármaco: origen, síntesis, preparación, propiedades, acciones desde un nivel molecular hasta el organismo completo, su manera de situarse y de moverse en el organismo, las formas de administración, las indicaciones terapéuticas y las acciones tóxicas. Por tanto, se trata de un campo multidisciplinar en la que intervienen desde el biólogo molecular hasta el médico terapeuta y que engloba distintas áreas entre las que cabe destacar (Flórez J. y col., 1997):

- i.- La farmacodinamia: estudia las acciones y efectos de los xenobióticos en el organismo vivo. Su objetivo es el conocimiento de las interacciones del xenobiótico a escala molecular (mecanismo de acción) y las consecuencias terapéuticas y adversas de dichas interacciones en los sistemas biológicos (efectos bioquímicos y fisiológicos). La cuantificación de dichas acciones y efectos farmacológicos se realiza a través de una serie de parámetros farmacodinámicos que se extraen de las denominadas relaciones empíricas dosis administrada o concentración plasmática – respuesta (Lüllmann H. y col., 2000).
- ii.- La farmacocinética: según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se define como el estudio de la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de los medicamentos por el organismo, es decir, la forma en que el organismo afecta al xenobiótico. Estos cuatro procesos son los que experimenta cualquier xenobiótico en un organismo desde su administración hasta su completa eliminación, por tanto, la farmacocinética estudia la evolución temporal de las concentraciones de un xenobiótico y sus metabolitos en los diferentes fluidos y tejidos, así como las relaciones entre el régimen de dosificación y las concentraciones plasmáticas resultantes (Jiménez Torres N.V. y col., 1997). El conocimiento de la farmacocinética proporciona información muy importante para valorar o predecir la acción terapéutica y tóxica de un xenobiótico.
- iii.- La farmacología terapéutica: estudia la aplicación de los fármacos en el ser humano con el fin de curar o de alterar voluntariamente una función normal. Entre otros aspectos tiene en cuenta principios de la farmacodinamia y de la farmacocinética y valora el índice beneficio/riesgo. La farmacología terapéutica puede a su vez clasificarse en:

- La farmacología clínica: disciplina que analiza las propiedades y el comportamiento de los xenobióticos cuando son administrados a un ser humano en concreto, sano o enfermo.
- La terapéutica: establece las pautas de tratamiento racional que deben seguirse en los diversos procesos patológicos.

iv.- La toxicología: estudia los efectos nocivos o tóxicos de los xenobióticos, así como los mecanismos y las circunstancias que favorecen su aparición. Se ocupa no sólo de los fármacos utilizados en la terapéutica, sino también de otras sustancias químicas que pueden causar intoxicación en el hogar, el ambiente o la industria (Flórez J. y col., 1997; Hardman J.G. y col., 1996). En la actualidad su importancia es evidente dada la gran difusión de compuestos químicos (p. ej., en productos agrícolas e industriales) lo que ha suscitado el interés en el conocimiento y evaluación de la denominada ecotoxicología, que se tratará con mayor detalle en los Capítulos VIII y IX.

Previamente a la evaluación clínica y puesta en el mercado de un nuevo fármaco, éste es sometido en los laboratorios farmacéuticos a una serie de ensayos preclínicos para su evaluación farmacológica. Dichos ensayos tradicionalmente se han realizado "in vivo" utilizando animales de experimentación, los cuales son laboriosos, costosos y están sujetos a una serie de implicaciones éticas, por tanto, el desarrollo de metodologías que puedan disminuir el coste y esfuerzo experimental requeridos para el desarrollo de nuevos fármacos es de gran importancia en investigación farmacéutica y química médica. En la actualidad, son de especial interés las metodologías denominadas de alto rendimiento ("*high-throughput*") que permiten realizar un cribado farmacológico ágil y, por tanto, permiten identificar un mayor número de moléculas candidatas a desarrollar en el menor tiempo posible. En este contexto, el uso de modelos QSAR, que relacionan las actividades biológicas de los compuestos con sus propiedades físico-químicas y/o descriptores estructurales, puede servir como una alternativa o apoyo a las metodologías "in vivo" (apartado I.2). La aplicación de parámetros cromatográficos en QSARs ha dado lugar a la aparición de un nuevo campo, relaciones cuantitativas retención-actividad (QRARs) (apartado I.5).

La capacidad interpretativa y de predicción de los modelos QRAR se fundamenta en el hecho de que, bajo condiciones experimentales adecuadas, el reparto o distribución de un soluto en un sistema cromatográfico puede emular el reparto o distribución de dicho soluto en las biomembranas. En este sentido, se han desarrollado fases estacionarias que puedan mimetizar las barreras biológicas (apartado I.5), como por ejemplo, la cromatografía con columnas de membranas artificiales inmovilizadas (IAM, apartado I.5.1) y la cromatografía con biomembranas inmovilizadas (IBC, apartado I.5.2) que utilizan fases estacionarias preparadas por inmovilización sobre soportes cromatográficos de moléculas de fosfolípidos y diversos tipos de biomembranas,

respectivamente. Tal y como se ha expuesto en el apartado I.5, ambas técnicas cromatográficas han mostrado su utilidad para la construcción de modelos QRAR. Adicionalmente, el empleo de disoluciones micelares de Brij35 preparadas en condiciones que emulan el pH y la fuerza iónica de los fluidos biológicos como fases móviles en cromatografía líquida en fase inversa (cromatografía micelar de bio-reparto, CMB), también ha demostrado su validez para la descripción y predicción de las actividades biológicas de diferentes tipos de fármacos (apartado I.5.3.1).

El objetivo del presente Capítulo es la evaluación de la potencialidad de CMB en la obtención de modelos QRAR en el campo de la farmacología. Para cubrir este objetivo se seleccionaron fármacos pertenecientes a dos grupos terapéuticos diferentes, anestésicos locales y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y se estudiaron las relaciones existentes entre diversos parámetros relacionados con sus actividades farmacológicas y su retención en CMB. Se evaluó la capacidad de descripción y predicción de los modelos QRAR obtenidos en CMB y se compararon los resultados con los obtenidos empleando los datos de retención bibliográficos en columnas IAM.

Antes de pasar a la exposición de los estudios realizados y los resultados obtenidos se exponen algunas características farmacológicas de los dos grupos terapéuticos estudiados.

VII.1.1.- Farmacología de anestésicos locales

Los anestésicos locales son agentes que bloquean reversiblemente la generación y conducción de los impulsos a lo largo de la fibra nerviosa. Se emplean para eliminar la sensación de dolor en áreas restringidas del cuerpo. Su acción resulta de su capacidad para deprimir los impulsos de los nervios aferentes de la piel, superficies de la mucosa y músculos al sistema nervioso central. Estos agentes se emplean ampliamente en cirugía, odontología y oftalmología (*Korolkovas A. y col., 1983*).

La sobredosis de anestésicos locales y la absorción sistémica rápida producen reacciones adversas que afectan al sistema nervioso central (síntomas: vómitos, náuseas, euforia, vértigo, convulsiones, coma, fallo respiratorio y cardíaco y muerte) y al sistema cardiovascular (síntomas: bradicardia, hipotensión y un estado análogo al choque). También pueden ocurrir algunas reacciones locales, principalmente de naturaleza alérgica o citotóxica, tales como dolor, edema, decoloración de la piel, neuritis y dermatitis eczematoide.

La cocaína fue el primer anestésico local y se aisló de las hojas de "*Erythrosylon coca*". En 1868 se propuso su empleo como anestésico local. En 1898, Richard Willstätter estableció su estructura molecular completa y en 1923 la sintetizó (*Esplugues J., 1981*). La cocaína es un éster de un ácido aromático (ácido benzoico) y una base nitrogenada (una amina terciaria) (Figura VII.1).



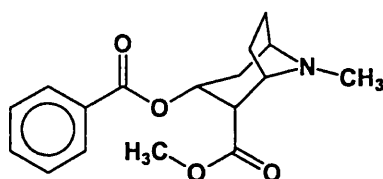


Figura. VII.1- Estructura química de la cocaína.

La cocaína es un excelente anestésico local con importantes efectos tóxicos y adictivos. Por estas razones, en 1892 se inició la búsqueda de derivados sintéticos de cocaína que fuesen más eficaces, potentes y menos tóxicos. En 1905 este esfuerzo culminó en la síntesis de la procaína, que se convirtió en el prototipo de los anestésicos locales durante medio siglo. En la actualidad, la procaína sigue siendo uno de los anestésicos locales más utilizados junto con la lidocaína, bupivacaína y tetracaína (*Hardman J.G. y col., 1996*).

Para entender el **mecanismo de acción de los anestésicos locales** hay que tener en cuenta que en las membranas celulares existe una amplia diversidad de canales o poros, con funciones y localizaciones celulares diferentes. La mayoría de estos poros permiten el paso en un sentido único de pequeños iones por lo que se les denomina poros o canales iónicos (*Cuéllar Rodríguez S., 1995*).

Existen dos mecanismos básicos que gobiernan la apertura y el cierre de los canales iónicos. Por un lado están los receptores acoplados a los canales, que regulan directa o indirectamente la apertura o el cierre del canal iónico. Por otro lado están los canales iónicos voltaje-dependientes que se abren o se cierran en función de la diferencia de potencial eléctrico entre las caras exterior e interior de la membrana citoplasmática (potencial de transmembrana).

La mayoría de los anestésicos locales se unen de forma reversible a los canales del sodio voltaje-dependientes de la membrana de los axones neuronales, impidiendo su apertura y el flujo de sodio al interior neuronal necesario para la transmisión del impulso nervioso. El bloqueo se produce por un taponamiento físico del canal iónico, al unirse el anestésico, en su forma ionizada, con la estructura proteica del canal.

El acceso del anestésico local al canal iónico del sodio implica una serie de procesos químicos bastante complejos y que básicamente puede ser resumidos en los siguientes pasos:

- ❑ Difusión tisular y a través de la membrana axónica. La forma no ionizada del anestésico es la que atraviesa predominantemente cualquier barrera biológica mediante difusión pasiva.
- ❑ Acción sobre los canales de sodio voltaje-dependientes taponándolos, que exige un estado ionizado.

Estos procesos determinan los **requerimientos estructurales de los anestésicos locales**. Para cumplir óptimamente con el objetivo, las moléculas de anestésico local deben estar ionizadas entre un 5 y un 25% al pH fisiológico (7.4). Esta condición es fácil de obtener empleando aminas secundarias o terciarias. Este grupo funcional permite conseguir múltiples derivados que al pH fisiológico presentan un grado de ionización adecuado. Además, la sustancia debe tener una parte liposoluble en la molécula, de tal manera que facilite los procesos de difusión a través de las membranas biológicas.

Todo lo anterior conduce directamente a la estructura química general de los anestésicos locales, que podría caracterizarse por las siguientes condiciones (*Cuéllar Rodríguez S., 1995*):

- ❑ Anillo aromático o similar (grupo hidrófobo).
- ❑ Amina secundaria o terciaria (grupo ionizable). En el caso de las aminas terciarias, al menos uno de los sustituyentes debe ser poco voluminoso, a fin de evitar el apantallamiento.
- ❑ Un centro electronegativo secundario, que puede ser un átomo de nitrógeno u oxígeno; también puede ser un grupo funcional, tal como carbonilo o hidroxilo; o la combinación de ambas posibilidades, como es el caso de los grupos éster y amida. Este centro debe estar unido al anillo aromático y separado por una cadena lineal de dos o tres átomos de carbono del grupo amino.

Este conjunto de condicionamientos químicos conduce a los dos grandes grupos de anestésicos locales: los ésteres (p. ej., amilocaína, butetamina, clorprocaína, cocaína, hexilcaína, oxibuprocaína, procaína, propanocaína, tetracaína) y las amidas (p. ej., bupivacaína, lidocaína, etidocaína, mepivacaína, prilocaína, ropivacaína).

Adicionalmente, existe un grupo de anestésicos locales de acción débil que carecen de grupo amino (grupo ionizable) (p. ej., benzocaína). Al carecer de un grupo ionizable no actúan directamente sobre los canales del sodio. Su mecanismo de acción parece ser de tipo inespecífico, provocando un incremento en el volumen de la membrana axónica que altera la arquitectura de los canales iónicos de la misma.

VII.1.2.- Farmacología de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) conforman un gran número de compuestos de naturaleza química muy diversa, pero que comparten algunas actividades terapéuticas y efectos adversos. Son agentes que además de poseer acción antiinflamatoria, también tienen propiedades analgésicas y antipiréticas. Sin embargo, en unos predomina el efecto antiinflamatorio sobre el analgésico (p. ej., fenilbutazona, piroxicam e indometacina), en otros sólo son útiles clínicamente sus efectos antipiréticos y analgésicos (p. ej., ácido mefenámico), y otros no presentan un efecto antipirético significativo (p. ej., diflunisal y fenbufeno). Adicionalmente, algunos AINEs presentan otras acciones terapéuticas, como por ejemplo, un efecto preventivo trombótico (*Cuéllar Rodríguez S., 1995*). Se usan principalmente en el tratamiento de condiciones artríticas crónicas y ciertos desórdenes leves en los tejidos asociados con el dolor y la inflamación (*AMA; 1994*).

Aunque la incidencia de los efectos adversos de los AINEs tampoco es uniforme, el más frecuente es la inducción de úlceras gástricas e intestinales que a veces se acompañan de anemia por la pérdida hemática resultante y pueden tener resultados mortales. Otros efectos secundarios de estos productos son alteraciones de la función plaquetaria, prolongación de la gestación o del trabajo de parto espontáneo y cambios en la función renal (*Hardman J.G. y col., 1996*). La diferencias en las propiedades físico-químicas de los AINEs es uno de los factores que más influyen sobre estas diferencias terapéuticas y toxicológicas, especialmente sobre las farmacocinéticas (*Cuéllar Rodríguez S., 1995*).

Desde hace siglos la humanidad ha intentado hallar caminos para aliviar el dolor, la fiebre, el reumatismo, la gota y otras desazones análogas. Varias culturas antiguas conocían los efectos medicinales de la corteza de sauce y otras plantas. El ingrediente activo de la corteza de sauce es la salicina, aislada en su forma pura en 1829 por Leroux, quien también demostró sus efectos antipiréticos. La hidrólisis de salicina da lugar a glucosa y alcohol salicílico, a partir de este último se puede obtener el ácido salicílico "in vivo" o sintéticamente. El salicilato sódico se utilizó originalmente como antipirético y en 1875 se identificaron sus efectos para combatir la gota.

En 1889, Hoffman, un químico al servicio de la firma Bayer, sintetizó el ácido acetilsalicílico en búsqueda de salicilatos con mejores propiedades de absorción y menos dañinos para el aparato digestivo. El éxito no fue precisamente en esa vía, sino por su eficacia antiinflamatoria, hoy igualada pero no superada. El descubrimiento del ácido acetilsalicílico se considera clave no sólo en la historia de los antiinflamatorios sino de toda la Farmacología. Es uno de los pocos fármacos que ha sido capaz de soportar sólidamente la evolución de los conocimientos farmacológicos y la aparición de nuevas alternativas terapéuticas. En 1899, Dresser comenzó a utilizar el ácido acetilsalicílico en medicina con el nombre de aspirina. A principios del siglo XX, se identificaron los principales beneficios terapéuticos de la aspirina.

Los salicilatos sintéticos pronto desplazaron a los compuestos de origen natural. En 1951, aparece la fenilbutazona, el antiinflamatorio más potente disponible hasta la fecha y en 1963 la indometacina, otra piedra angular dentro de la farmacología antiinflamatoria (*Cuéllar Rodríguez S., 1995; Hardman J.G. y col., 1996*).

El **mecanismo de acción** comúnmente aceptado de los AINEs es la inhibición de la ciclooxigenasa (COX), enzima que interviene en la biosíntesis de diversos prostanoideos a partir del ácido araquidónico (*del Río J., 2000*). Los prostanoideos son compuestos de naturaleza muy diversa que están presentes en la mayoría de células y tejidos. Éstos desempeñan multitud de funciones en el organismo, tales como elevar o disminuir la presión sanguínea, mediar una inflamación, proteger contra úlceras, provocar la agregación plaquetaria y regular la reproducción (*Korolkovas A. y col., 1983; Cuéllar Rodríguez S., 1995*). De ahí la diversidad de actividades que presentan los AINEs.

Por otro lado, la ciclooxigenasa posee dos formas isoformas (estructuras similares con actividades similares) denominadas COX-1 y COX-2 y ambas son inhibidas por los AINEs utilizados tradicionalmente. La COX-1 es la usualmente encontrada en la mayoría de células y tejidos del organismo, mientras que la COX-2 parece ser inducida en el mismo lugar de la inflamación. Se piensa que la actividad antiinflamatoria, antipirética y analgésica de los AINEs es debida a su inhibición de COX-2, mientras que la inhibición simultánea de COX-1 es responsable de los efectos adversos no deseados que culminan en la aparición de úlceras gástricas. Por estos motivos, en la actualidad se encuentran en fase de desarrollo nuevos AINEs que inhiben selectivamente a la COX-2 (*Cuéllar Rodríguez S., 1995; Hardman J.G. y col., 1996; del Río J., 2000*).

Desde el punto de vista estructural, la única característica que tienen en común la mayoría de AINEs es la presencia de un grupo carboxilo (ya que la fijación del ácido araquidónico a la ciclooxigenasa se produce a través de este grupo funcional). Por tanto, al pH plasmático (7.4) las moléculas se encuentran totalmente ionizadas, con lo que difunden con más dificultad a través de las barreras biológicas y tienden a mantenerse en el torrente sanguíneo, lo que favorece su acceso a las áreas inflamadas, ya que éstas presentan un aflujo sanguíneo. Adicionalmente, suelen tener un elevado grado de unión a la albúmina plasmática y de esta forma se evita que sean metabolizados y eliminados rápidamente, permaneciendo en la sangre en forma latente y actuando como una reserva que va liberándolos lentamente.

Algunos AINEs se administran como profármacos (p. ej., sulindac, nabumetona), es decir, no son activos hasta que son transformados en el interior del organismo a través de una serie de reacciones enzimáticas.

Desde el punto de vista estructural, los AINEs se pueden clasificar en (*Cuéllar Rodríguez S., 1995*):

i.- Ácidos arilalcanoicos

□ Ácidos arilacéticos

- Ácidos fenilacéticos (p. ej., diclofenac, fenbufeno y nabumetona)
- Ácidos azolacéticos (p. ej., fentiazac y tolmetín)
- Ácidos indolacéticos (p. ej., acemetacina e indometacina)
- Ácidos indenoacéticos (p. ej., sulindac)

□ Ácidos arilpropiónicos (p. ej., flurbiprofeno, ibuprofeno, ibuproxam, ketoprofeno, naproxeno y piketoprofeno)

□ Ácidos arilbutíricos (p. ej., butibufeno y ketorolac)

ii.- Oxicamas (p. ej., piroxicam y tenoxicam)

iii.- Ácidos benzoicos *o*-sustituídos

- Salicilatos (p. ej., ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, diflunisal y salicilamida)
- Antranilatos y análogos (p. ej., ácido flufenámico y ácido mefenámico)

iv.- Pirazoles

- Pirazolidinodionas (p. ej., fenilbutazona y mofebutazona)
- Pirazolonas (p. ej., metamizol y propifenazona)
- Benzopirazoles y análogos (p. ej., bendazac y benzidamina)

v.- Otros (p. ej., nimesulida, proquazona y oxaprozina)

VII.2.- Datos y metodología

Los valores de los factores de retención de los anestésicos locales y antiinflamatorios no esteroideos obtenidos con CMB y utilizados en este Capítulo son los mostrados en las Tablas V.4 y V.5 del Capítulo V, respectivamente. Los factores de retención se obtuvieron con fases móviles de Brij35 0.02, 0.04 M y 0.06 M preparadas en tampón fosfato salino (PBS) 0.05 M al pH plasmático 7.4. Como fases estacionarias se utilizaron columnas C_{18} y las experiencias se realizaron a temperatura ambiente.

Los datos de retención obtenidos con columnas IAM mostrados en las Tablas VII.1 y VII.3 se tomaron de la bibliografía (*Barbato F. y col., 1997-a; 1997-b*) y corresponden al logaritmo del factor de retención extrapolado a una fase móvil 100% acuosa ($\log k_{wIAM}$) a partir de los factores de retención obtenidos con columnas IAM.PC.MG comerciales y diversas fases móviles preparadas con diversas proporciones de acetonitrilo y PBS 0.10 M a pH 7.0. Los autores también realizaron las experiencias a temperatura ambiente. Los valores de los parámetros de las actividades farmacológicas estudiadas mostrados en dichas Tablas también se tomaron de la bibliografía (*Esplugues J., 1981; Schorderet M., 1988; Durrani Z. y col., 1991; Clark W.G. y col., 1992; Flórez J. y col., 1997; Barbato F. y col., 1997-a*).

En el presente Capítulo se utilizaron "series cortas de datos" por lo que la capacidad de descripción y predicción de los modelos QRAR se evaluó por comparación de los valores de los parámetros $RMSEC$ ("root-mean-square error of calibration"), $RMSECV$ ("root-mean-square error of cross-validation") y $RMSECV_i$ ("root-mean-square error of cross-validation for interpolated data"), estos dos últimos basados en la técnica de validación cruzada "leave-one-out cross-validation" (apartado III.5).

VII.3.- Resultados y discusión

VII.3.1.- Comportamiento de retención de los anestésicos locales y de los AINEs en cromatografía micelar de bio-reparto

En la Figura VII.2 se muestra el efecto de la concentración de Brij35 en la fase móvil sobre la retención de los anestésicos locales (Figura VII.2.A) y AINES (Figura VII.2.B) estudiados en este Capítulo. Como se puede observar, los compuestos más hidrófobos son los más retenidos y los menos hidrófobos los menos retenidos, para cada una de las concentraciones de Brij35 en la fase móvil ensayadas. Adicionalmente, en todos los casos al aumentar la concentración de surfactante en la fase móvil disminuyó la retención de los compuestos, siendo esta disminución más acusada para los compuestos más retenidos. Así, para los compuestos más retenidos (p. ej., bupivacaína,

tetracaína, diclofenac e indometacina) se observaron grandes cambios en su retención a medida que se modificó la concentración de Brij35 en la fase móvil, mientras que para los compuestos menos retenidos (p. ej., procaína, mepivacaína, ácido acetilsalicílico y sulindac) la retención apenas se modificó. Este comportamiento indica que la fuerza eluyente de la fase móvil aumenta al aumentar la hidrofobicidad de los compuestos y está de acuerdo con las observaciones realizadas en el Capítulo V, apartados V.3.5 y V.3.6.

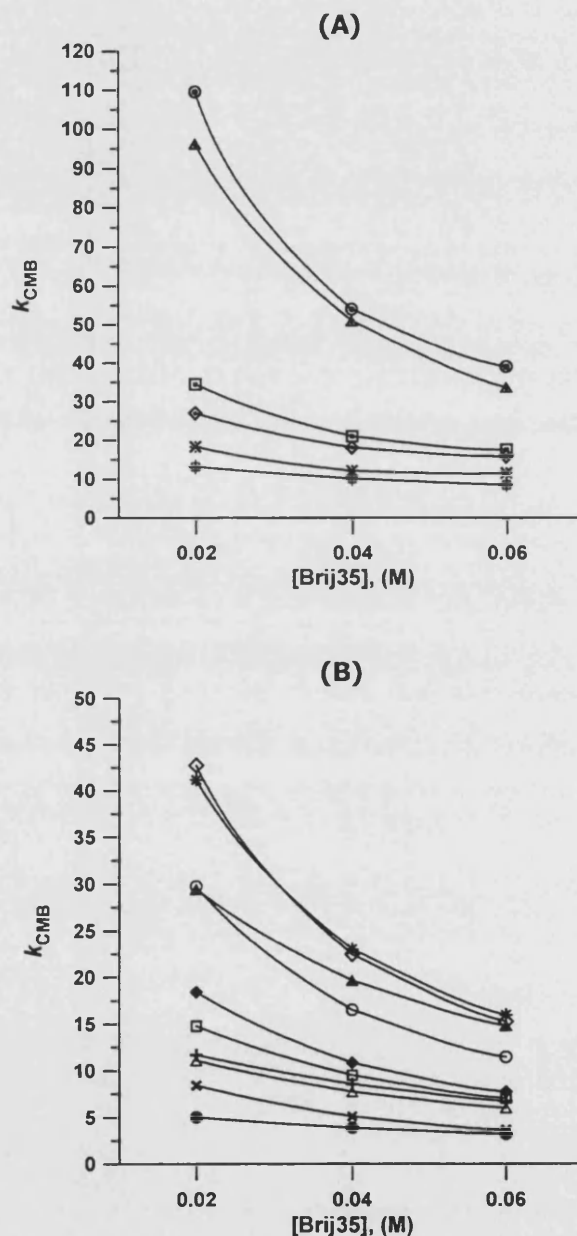


Figura VII.2.- Efecto de la concentración de Brij35 en la fase móvil sobre la retención de compuestos estudiados. **(A)** Anestésicos locales: (●) bupivacaína, (◻) lidocaína, (✱) mepivacaína, (◊) prilocaína, (⊕) procaína y (▲) tetracaína. **(B)** Antiinflamatorios no esteroideos: (●) ácido acetilsalicílico, (◊) diclofenac, (◆) fenbufeno, (○) flurbiprofeno, (▲) ibuprofeno, (✱) indometacina, (⊕) ketoprofeno, (◻) naproxeno, (✱) sulindac y (△) tolmetín.

VII.3.2.- Relaciones actividad - retención para los anestésicos locales en CMB

Tres de las propiedades más importantes de los anestésicos locales son la potencia anestésica, la toxicidad y la duración de la acción de estos fármacos. Estas propiedades vienen determinadas por las propiedades físico-químicas de los compuestos tales como carácter hidrófobo, propiedades electrónicas y propiedades estéricas. Así, la potencia anestésica que determina la eficacia del fármaco en la sangre para producir anestesia, está relacionada con la solubilidad lipídica como indicaron Meyer y Overton (*Meyer H.H., 1899; Overton E., 1901*). Al aumentar el carácter hidrófobo del anestésico local aumenta la potencia anestésica pero también la toxicidad del compuesto. Actividad y nocividad aumentan y disminuyen paralelamente (*Esplugues J., 1981*).

La evaluación de la toxicidad de los anestésicos locales no resulta sencilla ya que depende de diversos factores que modifican la disponibilidad del anestésico en forma activa como por ejemplo, el modo y lugar de administración, la capacidad de unión a las proteínas, su solubilidad lipídica, sus propiedades ácido-base y su metabolización. Por otro lado, la gran popularidad de los anestésicos locales en la disminución del dolor durante el parto hace necesario predecir el riesgo tóxico para el feto. El paso del anestésico al feto es función de la cantidad de sustancia libre en la sangre materna y de la posibilidad de atravesar la barrera placentaria. En este sentido, se considera que el paso por esta barrera es probablemente un proceso de simple difusión, apareciendo en el feto pocos minutos después de estar en la circulación materna (*Esplugues J., 1981*).

Por otro lado, el tiempo necesario para que aparezca la acción anestésica es generalmente corto para todos los compuestos, entre 3-8 min, sin embargo, la duración de los efectos depende de la velocidad de hidrólisis producida por enzimas no específicos y de la hidrofobicidad de los compuestos (*Korolkovas A. y col., 1983*).

En la Tabla VII.1 se muestran los valores de diferentes propiedades farmacológicas de algunos anestésicos locales publicados en la bibliografía (*Esplugues J., 1981; Schorderet M., 1988; Durrani Z. y col., 1991*):

- Duración de los efectos anestésicos.
- Potencia anestésica relativa (potencia): hace referencia a la cantidad de xenobiótico necesaria para producir un determinado efecto y está relacionada con la capacidad relativa de diferentes xenobióticos para producir dicho efecto. En este caso particular los valores de potencia anestésica son relativos a la potencia de la procaína.
- Dosis tóxica mínima intravenosa en humanos ($TD_{0, IV}$, mg kg⁻¹): es la dosis más baja de xenobiótico administrada a humanos por vía intravenosa que produce la aparición de algún efecto tóxico.

- Dosis tóxica en la arteria intravertebral (TD a. iv., $\mu\text{g kg}^{-1}$): es la dosis tóxica estimada en caso de administración accidental en la arteria intravertebral.
- Dosis tóxica en la arteria intracarótida (TD a. ic., mg kg^{-1}): es la dosis tóxica estimada en caso de administración accidental en la arteria intracarótida.

En la Tabla VII.1 se muestran los anestésicos locales en orden creciente de sus valores de $\log k_{\text{CMB}}$ obtenidos utilizando una fase móvil de Brij35 0.06 M al pH plasmático (7.4). Como se puede observar, es posible establecer una relación cualitativa entre la retención cromatográfica y la duración del efecto anestésico, así dicha propiedad farmacológica aumenta de acuerdo con la retención de los anestésicos locales en CMB.

Tabla VII.1.- Valores de los factores de retención en CMB e IAM y de las propiedades farmacológicas de los anestésicos locales estudiados.

Anestésico	$\log k_{\text{CMB}}^a$	$\log k_{\text{wIAM}}^b$	Duración ^c	Potencia ^d	$TD_{\text{lo IV}}$ (mg kg^{-1}) ^e	TD a. iv. ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^f	TD a. ic. (mg kg^{-1}) ^g
Procaína	0.93	0.39	Corta	1	19.2	288	2.592
Mepivacaína	1.06	0.77	Media	2	9.8	147	1.323
Prilocaína	1.20	0.62	Media	3	-	-	-
Lidocaína	1.24	0.75	Media	4	6.4	96	0.864
Bupivacaína	1.60	1.45	Larga	16	1.6	24	0.216
Tetracaína	1.53	1.75	Larga	16	2.5	37.5	0.337

^a $\log k_{\text{CMB}}$: logaritmo de los factores de retención obtenidos con una fase móvil Brij35 0.06 M / 0.05 M PBS (pH 7.4) y una columna Spherisorb ODS-2 a temperatura ambiente.

^b $\log k_{\text{wIAM}}$: logaritmo de los factores de retención extrapolados a una fase 100% acuosa obtenidos con diversas fases móviles acetonitrilo / PBS 0.1 M (pH 7.0) y una columna IAM.PC.MG. a temperatura ambiente (*Barbato F. y col., 1997-b*).

^c Duración de los efectos anestésicos (*Esplugues J., 1981*).

^d Potencia anestésica relativa (procaína = 1) (*Schorderet M., 1988*).

^e Dosis tóxica mínima intravenosa en humanos (*Durrani Z. y col., 1991*).

^f Dosis tóxica estimada en la arteria intravertebral (*Durrani Z. y col., 1991*).

^g Dosis tóxica estimada en la arteria intracarótida (*Durrani Z. y col., 1991*).

En la Figura VII.3.A se muestran las relaciones entre los valores de la potencia anestésica relativa a procaína de mepivacaína, prilocaína, lidocaína, tetracaína y bupivacaína encontrados en la bibliografía y sus datos de retención. Como se puede observar, existe una relación lineal directa entre el logaritmo de la potencia anestésica relativa y la retención en CMB, expresada como $\log k_{\text{CMB}}$, así los anestésicos más retenidos son los más potentes. En la Figuras VII.4.A-C se muestra las relaciones entre el logaritmo los diferentes parámetros toxicológicos estudiados y $\log k_{\text{CMB}}$. Como era de esperar en función de la relación observada para la potencia anestésica y las observaciones realizadas en la bibliografía, los compuestos más tóxicos son los más retenidos. En todos los casos se obtuvo una distribución aleatoria de los residuales y éstos fueron estadísticamente igual a cero, lo que sugiere el buen ajuste de los modelos a los datos.

En la Tabla VII.2 se muestra el análisis estadístico de los modelos QRAR lineales obtenidos. Como se puede observar, en todos los casos se obtuvieron muy buenas correlaciones ($r^2 \geq 0.99$; $F \geq 217$) y tanto los modelos como los coeficientes de ajuste fueron estadísticamente significativos para un nivel de confianza del 95 % ($p < 0.05$). Los valores del error estándar de la estimación ($s_{y/x}$) fueron inferiores a 0.06 lo que indica la precisión de futuras estimaciones realizadas con los modelos. Se obtuvieron modelos QRAR similares utilizando los datos de retención correspondientes a las fases móviles de Brij35 0.02 y 0.04 M.

Por otro lado, los modelos QSAR obtenidos utilizando $\log P$ como única variable independiente fueron estadísticamente significativos para un nivel de confianza del 95 % y mostraron coeficientes de determinación, r^2 , superiores a 0.83, lo que pone de manifiesto que la hidrofobicidad de los anestésicos locales juega un papel determinante de las propiedades farmacológicas estudiadas. No obstante, los mejores resultados obtenidos con CMB indican que el parámetro $\log k_{\text{CMB}}$ aúna información no sólo sobre las interacciones hidrófobas compuesto-sistema CMB sino sobre algún tipo de interacciones (p. ej., de tipo electrónico y estérico) que no están presentes o al menos en la misma extensión en el sistema *n*-octanol/agua y que son responsables, aunque en menor medida que las interacciones hidrófobas, del comportamiento farmacológico de los anestésicos locales.

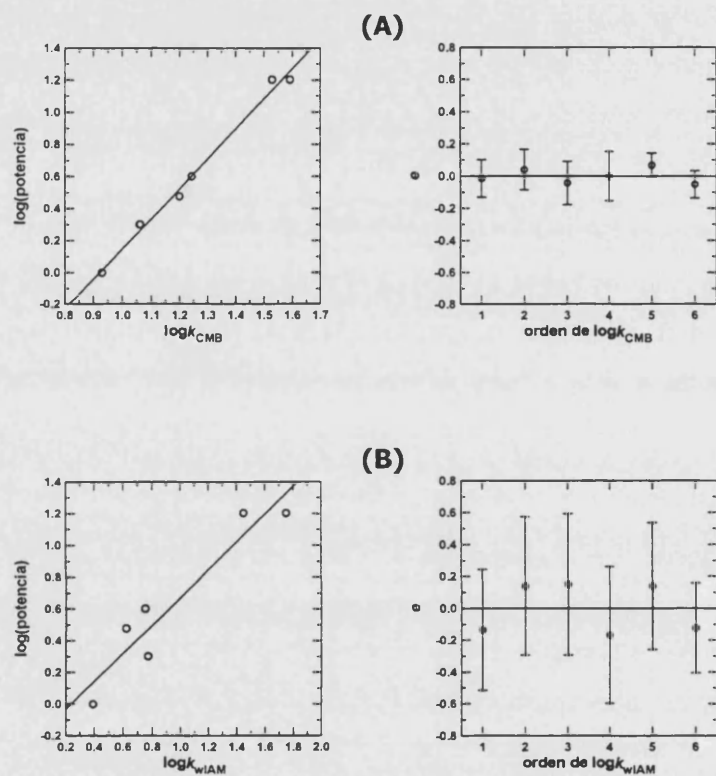


Figura VII.3.- Relaciones potencia anestésica relativa - datos de retención para los diferentes anestésicos locales (parte izquierda) y gráficos de residuos (e , parte derecha): **(A)** con una fase móvil de Brij35 0.06 M / PBS 0.05 M (pH 7.4) y una fase estacionaria Spherisorb ODS-2 y **(B)** con una columna IAM.PC.MG y fases móviles de acetonitrilo / PBS 0.10 M (pH 7.0).

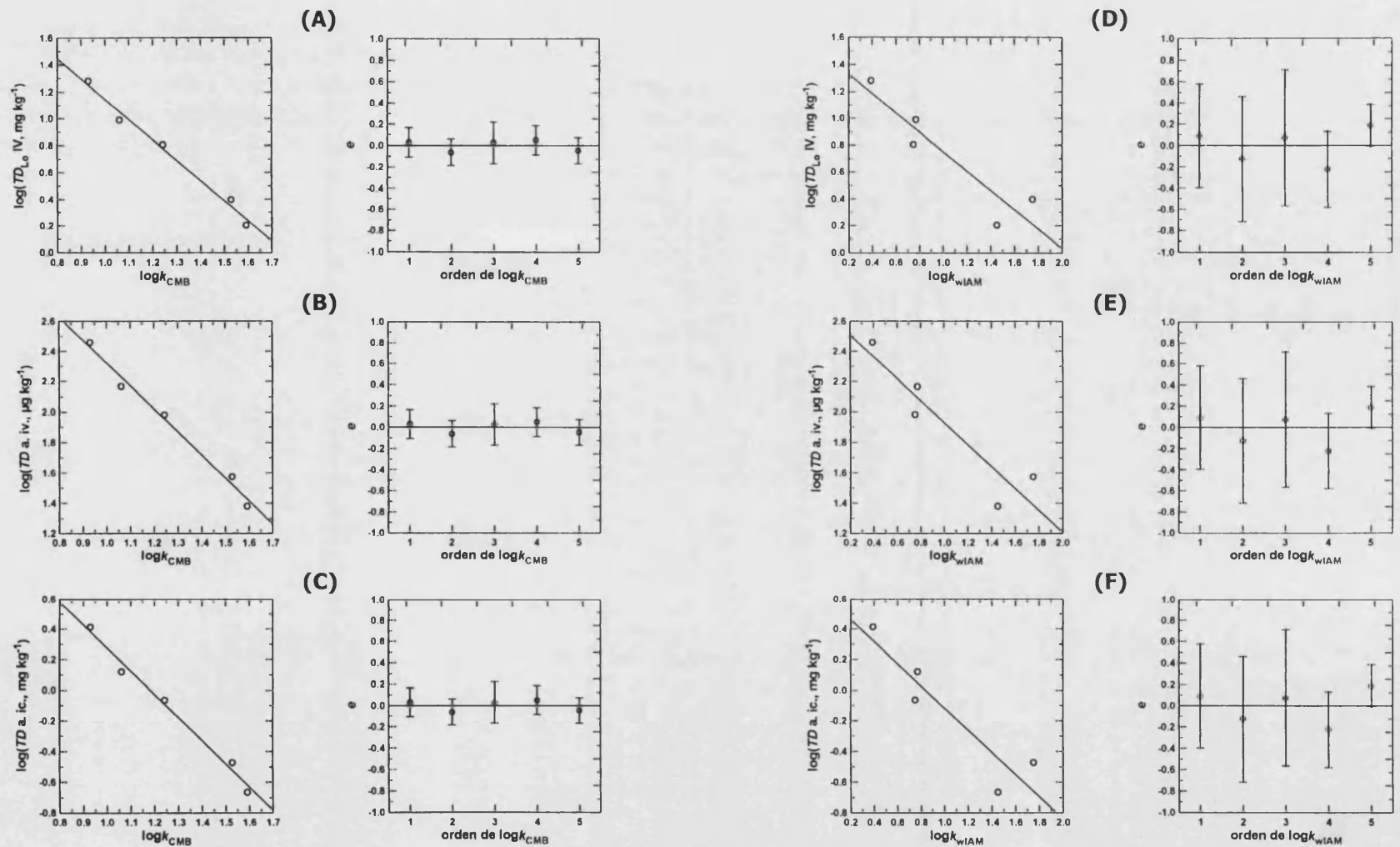


Figura VII.4.- Relaciones toxicidad - retención para los anestésicos locales estudiados con sus correspondientes gráficos de residuos. **(A, B, C)** Modelos CMB-QRAR obtenidos con una fase móvil de Brij35 0.06 M / PBS 0.05 M (pH 7.4) y una fase estacionaria Spherisorb ODS-2 y **(D, E, F)** modelos IAM-QRAR obtenidos con una columna IAM.PC.MG y fases móviles de acetonitrilo / PBS 0.10 M (pH 7.0). **(A, D)** Dosis tóxica mínima intravenosa en humanos ($mg kg^{-1}$), **(B, E)** dosis tóxica estimada en la arteria intravertebral ($\mu g kg^{-1}$) y **(E, F)** dosis tóxica estimada en la arteria intracarótida ($mg kg^{-1}$).

Tabla VII.2.- Análisis estadístico de los modelos QRAR obtenidos para los anestésicos locales: $\log(\text{parámetro farmacológico}) = b_0 + b_1 \log k^{a, b}$.

Parámetro farmacológico ^c	Técnica cromatográfica	<i>n</i>	$b_0 \pm ts_{b_0}$ (<i>p</i>)	$b_1 \pm ts_{b_1}$ (<i>p</i>)	r^2 (<i>r</i> ²)	<i>F</i> (<i>p</i>)	<i>s_{y/x}</i>	<i>RMSEC</i>	<i>RMSECV</i>	<i>RMSECV_i</i>
Potencia	CMB	6	-1.7 ± 0.3 (0.0001)	1.9 ± 0.2 (< 0.0001)	0.991 (0.990)	434 (< 0.0001)	0.05	0.043	0.070	0.067
	IAM	6	-0.2 ± 0.4 ^d (0.2663)	0.9 ± 0.4 (0.0042)	0.90 (0.87)	34 (0.0042)	0.18	0.144	0.230	0.198
<i>TD₀</i> IV, mg kg ⁻¹	CMB	5	2.7 ± 0.4 (0.0003)	-1.5 ± 0.3 (0.0007)	0.990 (0.98)	217 (0.0007)	0.06	0.046	0.079	0.076
	IAM	5	1.5 ± 0.6 (0.0051)	-0.7 ± 0.6 (0.0257)	0.85 (0.80)	17 (0.0257)	0.20	0.151	0.296	0.228
<i>TD</i> a. iv., µg kg ⁻¹	CMB	5	3.8 ± 0.4 (0.0001)	-1.5 ± 0.3 (0.0007)	0.990 (0.98)	217 (0.0007)	0.06	0.046	0.079	0.076
	IAM	5	2.7 ± 0.6 (0.0009)	-0.7 ± 0.6 (0.0257)	0.85 (0.80)	17 (0.0257)	0.20	0.151	0.296	0.228
<i>TD</i> a. ic., mg kg ⁻¹	CMB	5	1.8 ± 0.4 (0.0009)	-1.5 ± 0.3 (0.0007)	0.990 (0.98)	218 (0.0007)	0.06	0.046	0.079	0.076
	IAM	5	0.6 ± 0.6 ^d (0.0554)	-0.7 ± 0.6 (0.0256)	0.85 (0.80)	17 (0.0256)	0.20	0.151	0.296	0.227

^a En el apartado III.5 se muestra información acerca de los parámetros estadísticos.

^b Logaritmo de los factores de retención: $\log k_{\text{CMB}}$ y $\log k_{\text{wIAM}}$ obtenidos en las condiciones experimentales indicadas en la Tabla VII.1.

^c Los detalles sobre los parámetros farmacológicos se muestran en la Tabla VII.1.

^d Estadísticamente no significativo para un nivel de confianza del 95%.

VII.3.3.- Relaciones actividad - retención para los AINEs en CMB

En la Tabla VII.3 se muestran los datos de retención ($\log k_{\text{CMB}}$) obtenidos utilizando una fase móvil micelar de Brij35 0.02 M a pH plasmático y diferentes parámetros farmacodinámicos y farmacocinéticos para los AINEs estudiados publicados en la bibliografía (*Clark W.G. y col., 1992; Flórez J. y col., 1997; Barbato F. y col., 1997-a*):

- Concentración inhibitoria mediana (IC_{50} , mmol L⁻¹): se define como la concentración de xenobiótico que produce un 50% de inhibición en un sistema dado. En este caso particular los valores de IC_{50} están referidos a la inhibición de la ciclooxigenasa-2 y se han determinado en enzimas libres y células intactas. Dichos valores pueden considerarse como índices del efecto global de los AINEs incluyendo su actividad intrínseca, su afinidad y capacidad de acceso al sitio de acción (*Barbato F. y col., 1997-a*).
- Aclaramiento plasmático (Cl , mL min⁻¹ kg⁻¹): se define como el volumen de plasma, suero o sangre totalmente libre de xenobiótico por unidad de tiempo. Matemáticamente se define como el cociente entre la cantidad de xenobiótico eliminada por unidad de tiempo y la concentración plasmática del xenobiótico en ese mismo tiempo (*Jiménez Torres N.V. y col., 1997*).
- Semivida de eliminación o biológica ($t_{1/2}$, h): se define como el tiempo necesario para que la concentración plasmática de xenobiótico se reduzca a la mitad (*Jiménez Torres N.V. y col., 1997*).
- Volumen de distribución (V_d , L kg⁻¹): se define como el volumen aparente en el que se distribuye el xenobiótico en el organismo. Este parámetro farmacocinético relaciona la cantidad de fármaco presente en el organismo y su concentración plasmática (*Jiménez Torres N.V. y col., 1997*).

En general, la absorción de los AINEs tras su administración oral tiene lugar por difusión pasiva de las moléculas no ionizadas a través del tracto gastrointestinal. Los AINEs se distribuyen rápidamente por todo el fluido extracelular y en la mayoría de tejidos corporales y fluidos, alcanzando grandes concentraciones en el hígado y los riñones, su volumen de distribución es generalmente 0.1 - 0.2 L kg⁻¹ a las concentraciones terapéuticas usuales. Los AINEs y sus metabolitos se excretan rápida y casi por completo en la orina en pacientes con una función renal normal; el 80-100 % de una dosis sencilla se excreta en la orina entre 24-72 h (*Oddis J.A., 1984*).



Tabla VII.3.- Valores de los factores de retención en CMB e IAM y de las propiedades farmacológicas de los antiinflamatorios no esteroideos estudiados.

AINEs	$\log k_{\text{CMB}}^a$	$\log k_{\text{wIAM}}^b$	IC_{50} (mmol L ⁻¹) ^c	Cl (mL min ⁻¹ kg ⁻¹) ^d	$t_{1/2}$ (h) ^e	V_d (L kg ⁻¹) ^f
Ácido acetilsalicílico	0.70	-0.95	278·10 ⁻³	9.3 ^g	- ^h	0.2
Sulindac	0.92	1.80	112·10 ⁻³	-	67.5	0.15
Tolmetín	1.04	1.13	27.2·10 ⁻³	1.8	-	0.097
Ketoprofeno	1.07	1.12	-	1.15	-	0.11
Naproxeno	1.17	1.26	5.65·10 ⁻³	0.07	14	0.1
Fenbufeno	1.26	1.66	-	-	10	0.1
Ibuprofeno	1.47	1.12	72.8·10 ⁻³	0.75	2.25	0.1
Flurbiprofeno	1.47	2.02	0.102·10 ⁻³	0.3	4	0.1
Indometacina	1.61	2.39	1.68·10 ⁻³	1.5	6	0.12
Diclofenac	1.63	2.43	1.1·10 ⁻³	3.7	1.5	0.12

^a $\log k_{\text{CMB}}$: logaritmo de los factores de retención obtenidos con una fase móvil Brij35 0.02 M / 0.05 M PBS (pH 7.4) y una columna Kromasil C₁₈ a temperatura ambiente.

^b $\log k_{\text{wIAM}}$: logaritmo de los factores de retención extrapolados a una fase 100% acuosa obtenidos con diversas fases móviles acetonitrilo / PBS 0.1 M (pH 7.0) y una columna IAM.PC.MG. a temperatura ambiente (*Barbato F. y col., 1997-a*).

^c Concentración inhibitoria mediana del enzima ciclooxigenasa-2 (*Barbato F. y col., 1997-a*).

^d Aclaramiento plasmático (*Clark W.G. y col., 1992*).

^e Semivida de eliminación (*Clark W.G. y col., 1992*).

^f Volumen de distribución (*Flórez J. y col., 1997*).

^g (*Flórez J. y col., 1997*).

^h Dosis dependiente.

En las Figuras VII.5.A y VII.6.A-C se muestran las relaciones propiedad farmacológica-retención obtenidas para los AINEs con una fase móvil de Brij35 0.02 M (pH 7.4). Tal y como puede observarse, existe una relación no lineal entre los parámetros farmacológicos considerados y la retención, expresada como $\log k_{\text{CMB}}$. Adicionalmente, en todas las representaciones se observa un valor crítico en la retención ($\log k_{\text{CMB}} \sim 1.4$) en el que se produce un cambio de pendiente en las relaciones. El hecho de que para diferentes parámetros farmacológicos se observen tendencias similares con la retención en CMB refuerza la fiabilidad de las relaciones observadas.

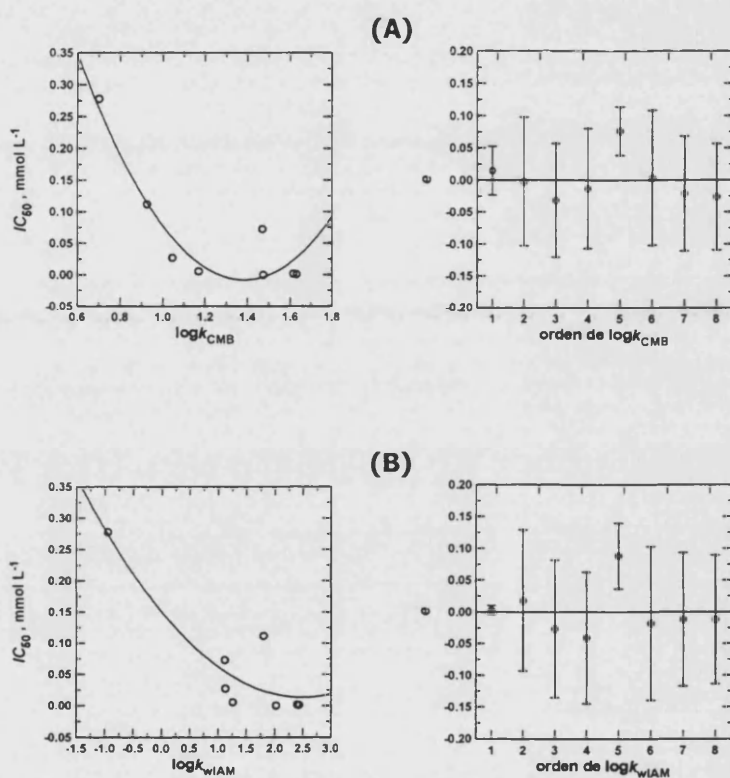


Figura VII.5.- Relaciones concentración inhibitoria mediana - datos de retención para los diferentes antiinflamatorios no esteroideos (parte izquierda) y gráficos de residuos (e , parte derecha): **(A)** con una fase móvil de Brij35 0.02 M / PBS 0.05 M (pH 7.4) y una fase estacionaria Kromasil C₁₈ y **(B)** con una columna IAM.PC.MG y fases móviles de acetonitrilo / PBS 0.10 M (pH 7.0).

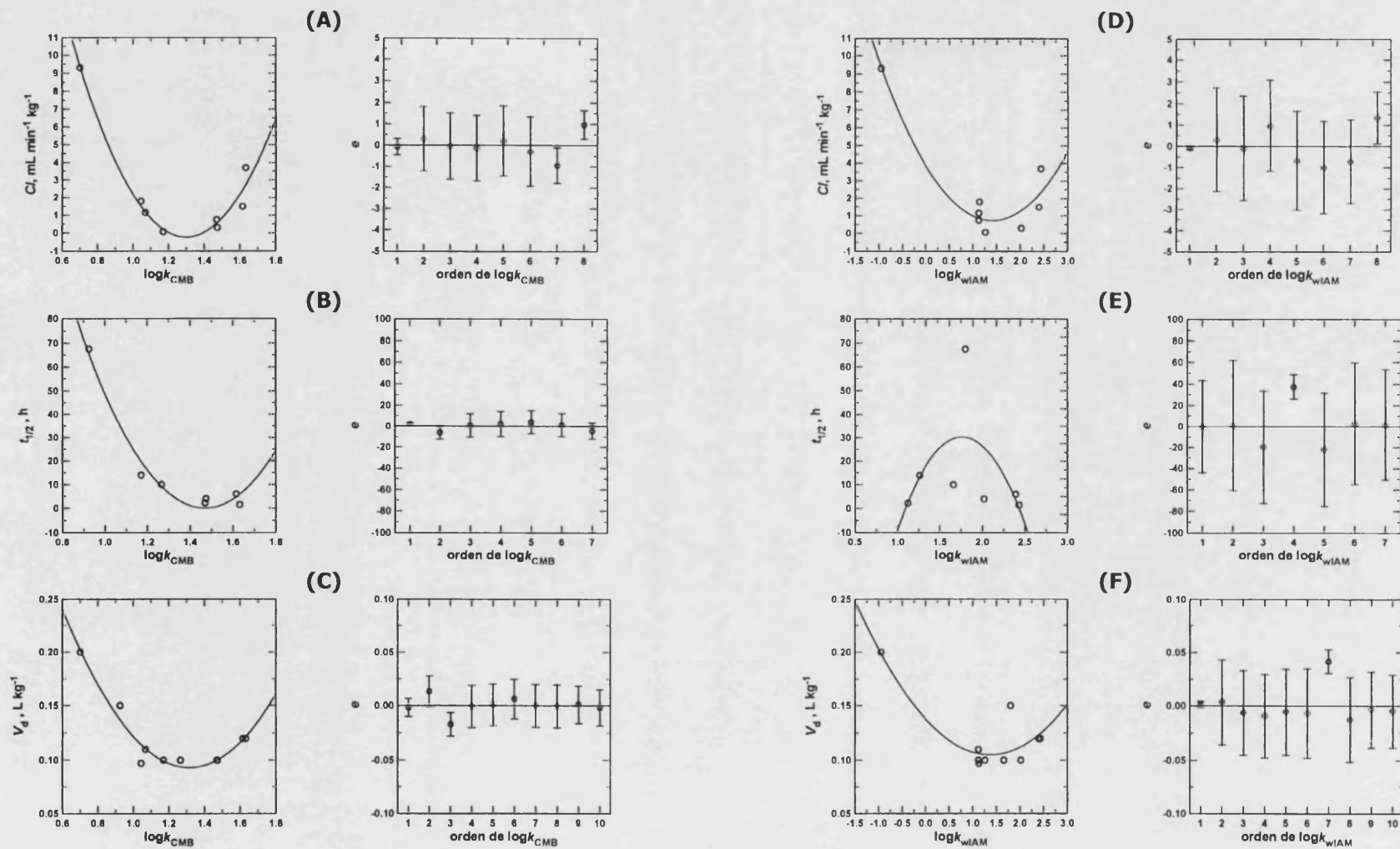


Figura VII.6.- Relaciones toxicidad - retención para los antiinflamatorios no esteroideos estudiados con sus correspondientes gráficos de residuos. **(A, B, C)** Modelos CMB-QRAR obtenidos con una fase móvil de Brij35 0.02 M / PBS 0.05 M (pH 7.4) y una fase estacionaria Kromasil C₁₈ y **(D, E, F)** modelos IAM-QRAR obtenidos con una columna IAM.PC.MG y fases móviles de acetonitrilo / PBS 0.10 M (pH 7.0). **(A, D)** Aclaramiento plasmático (mL min⁻¹ kg⁻¹), **(B, E)** semivida de eliminación (h) y **(E, F)** volumen de distribución (L kg⁻¹).

Con el fin de obtener modelos descriptivos y de predicción, los datos de retención de los AINEs ($\log k_{\text{CMB}}$) y sus correspondientes respuestas biológicas se ajustaron a un modelo polinómico de segundo orden. Como se puede observar en las Figuras VII.5.A y VII.6.A-C, existe un buen ajuste de los modelos a los datos y los gráficos de residuos mostraron una distribución aleatoria y prácticamente todos fueron estadísticamente iguales a cero. En la Tabla VII.4 se muestra el análisis estadístico y las propiedades de predicción de los modelos polinómicos CMB-QRAR obtenidos. Como se puede observar, los valores obtenidos del estadístico p fueron menores de 0.05 para todos los modelos; lo que indica que las relaciones entre los parámetros farmacológicos de los AINEs y $\log k_{\text{CMB}}$ fueron estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95%. Los coeficientes también fueron significativos ($p < 0.05$) al mismo nivel de confianza. Tal y como puede observarse en el análisis estadístico, los valores de los estadísticos r^2 , r^2 (r^2 ajustado para los grados de libertad) fueron mayores de 0.87 y 0.81, respectivamente, lo que indica que los valores de $\log k_{\text{CMB}}$ explican más del 80% de la varianza de los valores de los parámetros farmacológicos. Los valores del estadístico $s_{\text{y/x}}$ fueron en general bajos y pueden usarse para construir los límites de predicción para nuevas observaciones.

Los resultados mostrados en este apartado se obtuvieron utilizando una fase móvil de Brij35 0.02 M. Modelos CMB-QRAR similares se obtuvieron utilizando los datos de retención correspondientes a las fases móviles de Brij35 0.04 y 0.06 M. Las relaciones entre los parámetros farmacológicos de los AINEs estudiados y los valores $\log P$ y grado de ionización no fueron adecuadas o estadísticamente tan buenas como las relaciones obtenidas para los modelos QRAR mostrados.

Tabla VII.4.- Análisis estadístico de los modelos QRAR obtenidos para AINEs: Parámetro farmacológico = $b_0 + b_1 \log k + b_2 (\log k)^2$ ^{a, b}.

Parámetro farmacológico	Técnica cromatográfica	<i>n</i>	$b_0 \pm ts_{b_0}$ (<i>p</i>)	$b_1 \pm ts_{b_1}$ (<i>p</i>)	$b_2 \pm ts_{b_2}$ (<i>p</i>)	r^2 (<i>r'^2</i>)	<i>F</i> (<i>p</i>)	<i>s_{y/x}</i>	<i>RMSEC</i>	<i>RMSECV</i>	<i>RMSECV_i</i>
<i>IC</i> ₅₀ , mmol L ⁻¹	CMB	8	1.1 ± 0.6 (0.0064)	-1.6 ± 1.1 (0.0139)	0.6 ± 0.5 (0.0239)	0.87 (0.81)	16.8 (0.0061)	0.04	0.032	0.059	0.046
	IAM	8	0.15 ± 0.08 (0.0048)	-0.11 ± 0.07 (0.0103)	0.02 ± 0.04 ^d (0.1902)	0.83 (0.76)	12.0 (0.0122)	0.05	0.037	0.309	0.053
<i>Cl</i> , mL min ⁻¹ kg ⁻¹	CMB	8	45 ± 10 (0.0001)	-70 ± 17 (0.0001)	27 ± 7 (0.0002)	0.97 (0.95)	75.1 (0.0002)	0.64	0.510	0.981	0.664
	IAM	8	3.8 ± 1.6 (0.0015)	-4.4 ± 1.5 (0.0006)	1.6 ± 0.7 (0.0028)	0.92 (0.89)	30.7 (0.0016)	0.99	0.779	11.539	0.966
<i>t</i> _{1/2} , h	CMB	7	480 ± 150 (0.0010)	-700 ± 200 (0.0017)	220 ± 90 (0.0027)	0.98 (0.96)	81.7 (0.0006)	4.46	3.370	13.889	4.944
	IAM	7	-180 ± 420 ^d (0.3047)	238 ± 500 ^d (0.2542)	-70 ± 140 ^d (0.2453)	0.32 (0.00)	1.0 (0.4602)	23.76	17.962	27.538	32.556
<i>V</i> _d , L kg ⁻¹	CMB	10	0.59 ± 0.11 (< 0.0001)	-0.76 ± 0.19 (< 0.0001)	0.29 ± 0.08 (0.0001)	0.95 (0.93)	62.5 (< 0.0001)	0.008	0.007	0.010	0.010
	IAM	10	0.14 ± 0.03 (< 0.0001)	-0.05 ± 0.02 (0.0018)	0.017 ± 0.012 (0.0101)	0.78 (0.71)	12.1 (0.0053)	0.017	0.015	0.078	0.019

^a En el apartado III.5 se muestra información acerca de los parámetros estadísticos.

^b Logaritmo de los factores de retención: $\log k_{\text{CMB}}$ y $\log k_{\text{IAM}}$ obtenidos en las condiciones experimentales indicadas en la Tabla VII.3.

^c Los detalles sobre los parámetros farmacológicos se muestran en la Tabla VII.3.

^d Estadísticamente no significativo para un nivel de confianza del 95%.

VII.3.4.- Modelos CMB-QRAR frente a IAM-QRAR

Barbato y col. publicaron unos estudios sobre la influencia que tienen diferentes condiciones experimentales sobre el comportamiento cromatográfico en columnas IAM de los anestésicos locales (*Barbato F. y col., 1997-b*) y los AINEs (*Barbato F. y col., 1997-a*). Para realizar la comparación entre los modelos CMB- e IAM-QRAR, se tomaron de estos autores los factores de retención extrapolados a una fase 100% acuosa ($\log k_{wIAM}$) obtenidos utilizando diferentes fases móviles acetonitrilo / PBS 0.1 M (pH 7.0) y columnas IAM.PC.MG. Dichos valores se muestran en las Tabla VII.1 para anestésicos locales y en la Tabla VII.3 para AINEs. Los mismos compuestos utilizados en la construcción de los modelos CMB-QRAR se utilizaron para la construcción de los modelos IAM-QRAR.

En las Figuras VII.3.B y VII.4.D-F se muestran los modelos IAM-QRAR obtenidos para anestésicos locales y en las Figuras VII.5.B y VII.6.D-F se muestran los modelos IAM-QRAR obtenidos para los antiinflamatorios no esteroideos. Como se puede observar, el ajuste de los datos a los modelos no fue tan satisfactorio como el previamente observado en CMB lo que también se pone de manifiesto en los mayores valores de los residuos obtenidos, especialmente en los modelos IAM-QRAR para AINEs donde se observa que la distribución de los puntos no es adecuada para la obtención de modelos.

Como puede deducirse por comparación de los valores de los estadísticos de regresión (r^2 , r^2 , $s_{y/x}$ y F) mostrados en las Tablas VII.2 y VII.4, en todos los casos los modelos CMB-QRAR proporcionaron mejores resultados o al menos estadísticamente comparables a los modelos IAM-QRAR. El caso más llamativo se observa para el modelo IAM-QRAR de AINEs para el parámetro farmacocinético semivida de eliminación donde se observó una pobre correlación y el modelo no fue estadísticamente significativo para un nivel de confianza del 95 % ($p = 0.46$; $r^2 = 0.32$; $r^2 = 0.00$; $F = 1.0$). Por el contrario, para este parámetro cuando se utilizaron los datos de retención obtenidos con una fase móvil de Brij35 para la construcción del modelo CMB-QRAR, se obtuvo una buena correlación y un modelo CMB-QRAR significativo a dicho nivel de confianza ($p = 0.0006$; $r^2 = 0.98$; $r^2 = 0.96$; $F = 82$).

Finalmente, para el modelo IAM-QRAR para AINEs del parámetro IC_{50} , el parámetro de ajuste b_2 no fue estadísticamente significativo ($p = 0.1902$). Este hecho sugiere la posible existencia de una relación lineal IC_{50} - $\log k_{wIAM}$. Sin embargo, cuando se construyó el modelo lineal se obtuvo un coeficiente de determinación muy pobre ($r^2 = 0.75$).

En las Tablas VII.2 y VII.4 se muestran los valores de los estadísticos $RMSEC$, $RMSECV$ y $RMSECV_i$ obtenidos para cada uno de los modelos QRAR. Tal y como se puede observar, la mayoría de los modelos CMB-QRAR mostraron valores comparables de $RMSEC$, $RMSECV$ y $RMSECV_i$. Estos

resultados indican la robustez de estos modelos y sugiere que las interpolaciones y extrapolaciones de los parámetros basados en los modelos CMB-QRAR deberían ser fiables. Sólo en el caso del modelo CMB-QRAR para el parámetro $t_{1/2}$, el valor de $RMSECV$ fue mucho mayor que el valor de $RMSECV_i$, lo que indica que se deben tomar precauciones con las predicciones realizadas por extrapolación en el modelo; de todos modos, la información obtenida puede ser útil desde un punto de vista práctico para tener una estimación rápida semi-cuantitativa del valor de $t_{1/2}$ de nuevos AINEs.

Para la mayoría de los modelos IAM-QRAR, especialmente los obtenidos para los AINEs, se observaron grandes diferencias entre los valores del parámetro $RMSECV$ y los correspondientes valores de los parámetros $RMSECV_i$ y $RMSEC$, lo que indica que las predicciones obtenidas por extrapolación en los modelos IAM-QRAR podrían ser poco fiables.

Finalmente, los valores de los estadísticos $RMSEC$, $RMSECV$ y $RMSECV_i$ obtenidos para un determinado modelo IAM-QRAR fueron en todos los casos mayores que los correspondientes valores obtenidos con un modelo CMB-QRAR. Este hecho indica que los factores de retención obtenidos con CMB presentan una mejor capacidad de descripción y de predicción de los parámetros farmacológicos estudiados de anestésicos locales y antiinflamatorios no esteroideos.

En las Figuras VII.7 y VII.8 se muestran los gráficos de validación de todos los modelos QRAR obtenidos para anestésicos locales y AINEs, respectivamente. En dichos gráficos se representan los valores de los parámetros farmacológicos predichos (tras el ajuste y en validación cruzada) frente a los experimentales utilizados en la construcción de los modelos QRAR. Tal y como se puede observar, en el caso de los modelos CMB-QRAR los valores predichos tras el ajuste de los datos a los modelos y en la etapa de validación cruzada son en general coincidentes y se distribuyen alrededor de la línea de referencia (pendiente y ordenada en el origen igual a 1 y 0, respectivamente). Por el contrario, esta afirmación no es tan clara para los modelos IAM-QRAR, especialmente en el caso de los AINEs donde se observa que la existencia de un punto extremo muy influyente con un alto "leverage" (ácido acetilsalicílico, compuesto con menor valor de $\log k_{wIAM}$ y mayor valor de las propiedades farmacológicas).

Estos resultados ponen de manifiesto que para los datos disponibles, la capacidad de los valores de $\log k_{CMB}$ para la predicción de todos los parámetros farmacológicos, tanto en calibración como en términos validación cruzada, es buena y mejor que los valores de $\log k_{wIAM}$.

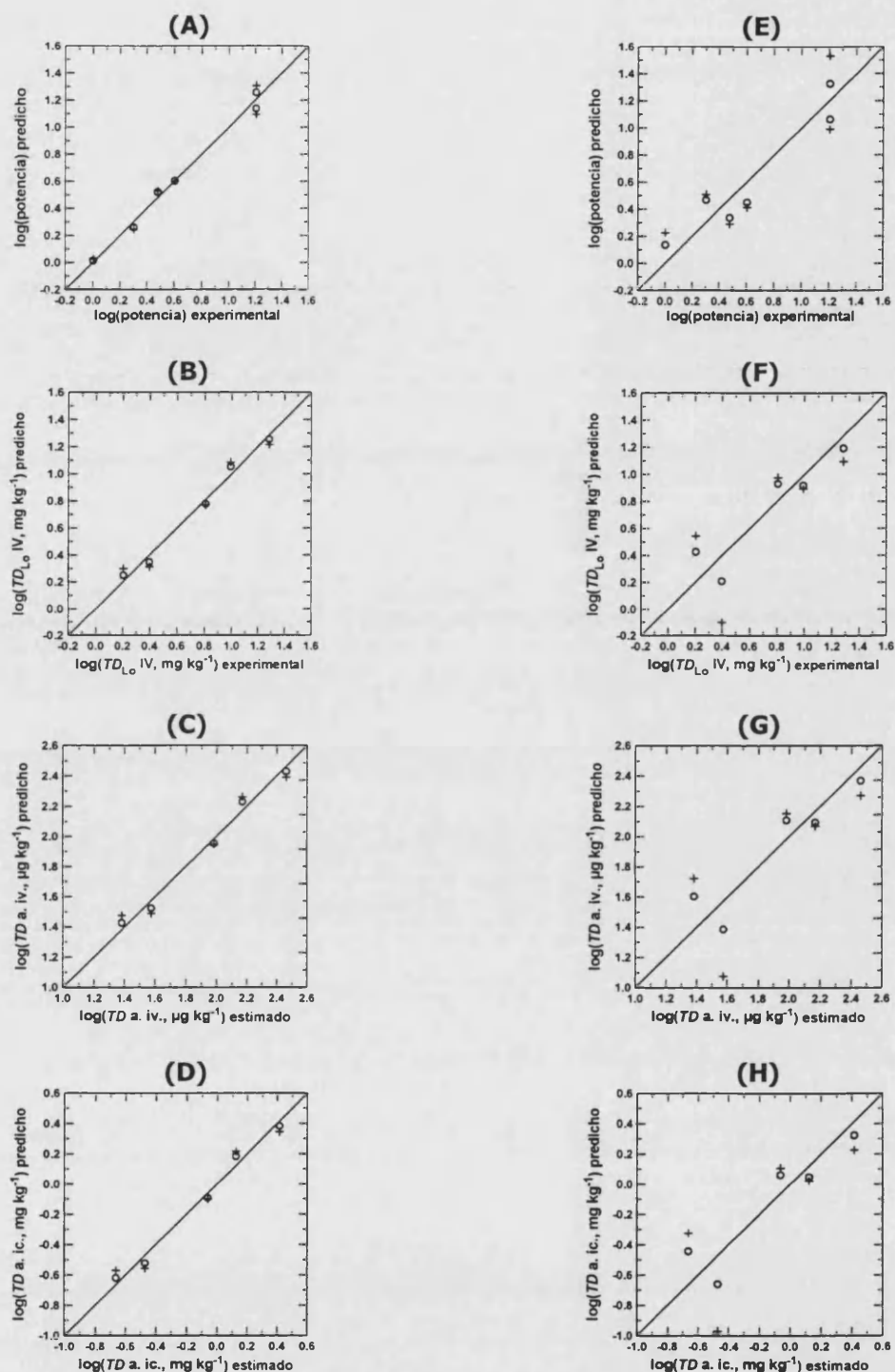


Figura VII.7.- Gráficos de validación de los modelos QRAR obtenidos para los anestésicos locales: valores del parámetro farmacológico predicho frente a los usados en la construcción de los modelos para: **(A, B, C, D)** los modelos CMB-QRAR y **(E, F, G, H)** modelos IAM-QRAR. **(A, E)** Potencia anestésica relativa, **(B, F)** dosis tóxica mínima intravenosa en humanos (mg kg^{-1}), **(C, G)** dosis tóxica estimada en la arteria intravertebral ($\mu\text{g kg}^{-1}$) y **(D, H)** dosis tóxica estimada en la arteria intracarótida (mg kg^{-1}). Se muestran los valores predichos tras el ajuste de los datos (O) y en la etapa de validación cruzada (+). Recta teórica de pendiente 1 y ordenada 0 (—).

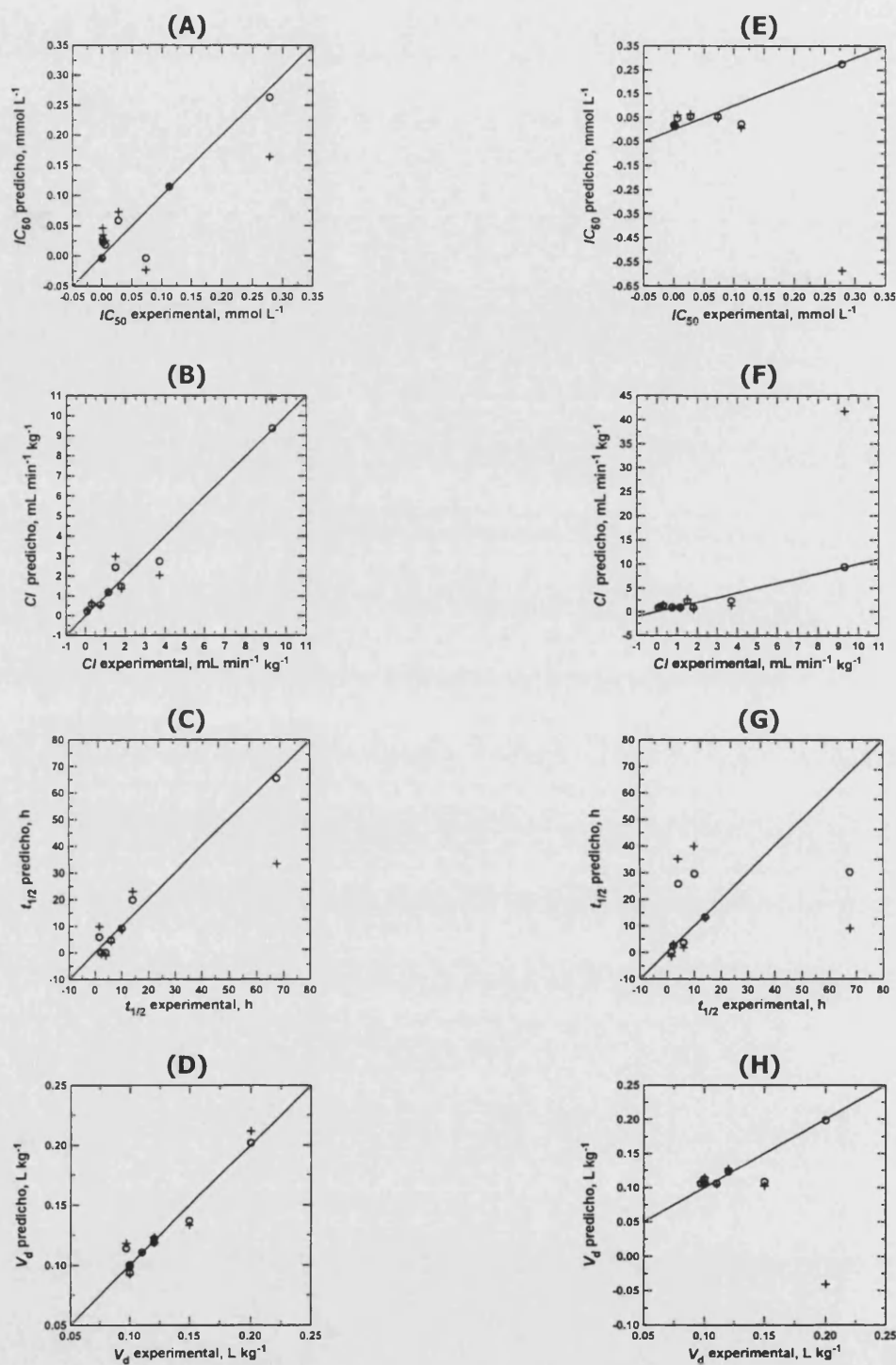


Figura VII.8.- Gráficos de validación de los modelos QRAR obtenidos para los antiinflamatorios no esteroideos: valores del parámetro farmacológico predicho frente a los usados en la construcción de los modelos para: **(A, B, C, D)** los modelos CMB-QRAR y **(E, F, G, H)** modelos IAM-QRAR. **(A, E)** concentración inhibitoria mediana (mmol L^{-1}), **(B, F)** aclaramiento plasmático ($\text{mL min}^{-1} \text{kg}^{-1}$), **(C, G)** semivida de eliminación (h) y **(D, H)** volumen de distribución (L kg^{-1}). Se muestran los valores predichos tras el ajuste de los datos (O) y en la etapa de validación cruzada (+). Recta teórica de pendiente 1 y ordenada 0 (—).

VII.3.5.- Ventajas e inconvenientes de los sistemas CMB e IAM en la obtención de modelos QRAR

Ambos sistemas cromatográficos, CMB e IAM, presentan una serie de características comunes para la evaluación del reparto de xenobióticos en las membranas celulares:

- La retención cromatográfica aúna información acerca de las propiedades hidrófobas, electrónicas y estéricas de los xenobióticos, por tanto, a diferencia de los modelos QSAR, estos sistemas requieren un menor número de descriptores para obtener modelos estadísticamente robustos.
- Las ventajas que presentan frente a otros sistemas *"in vitro"* tradicionales (p. ej. las líneas celulares) son su simplicidad experimental, su mayor reproducibilidad dado que en estos sistemas las variables experimentales pueden ser estrictamente controladas y su menor coste económico. Estos sistemas de separación también se caracterizan por su alto rendimiento en el procesado de muestras debido, por un lado, a su capacidad de automatización y por otro a los reducidos tiempos de desarrollo de estas metodologías.
- Su aplicabilidad está restringida a aquellos fenómenos de transporte controlados por difusión pasiva ya que no permiten reproducir procesos activos.
- En los sistemas cromatográficos considerados no existe la formación o ruptura de enlaces intra-moleculares por lo que no son aplicables a fenómenos en los que hay implicados procesos metabólicos. A menos que los compuestos considerados experimenten metabolismos similares que no determinen las diferencias en la respuesta biológica considerada.
- No permiten distinguir entre el comportamiento farmacológico de los enantiómeros, ya que no introducen ningún elemento quiral en el sistema.
- A diferencia de los modelos QSAR, no permiten la elucidación del mecanismo de acción de los xenobióticos y la evaluación de sus parámetros farmacológicos previamente a su síntesis.

Sin embargo entre las diferencias del empleo de IAM frente a CMB para la construcción de modelos QRAR cabe destacar los siguientes aspectos:


- En IAM y CMB la fase estacionaria está constituida por una monocapa de fosfolípidos y de monómeros de Brij35, respectivamente, por lo que no reproducen la bicapa lipídica existente en las biomembranas. No obstante, las columnas IAM permiten reproducir la composición lipídica de la membrana celular según la naturaleza de los fosfolípidos inmovilizados.
- En IAM, a diferencia de CMB, se adicionan modificadores orgánicos a las fases móviles para la elución de los analitos, lo que lleva asociado una serie de inconvenientes. En primer lugar, este hecho puede alterar las interacciones xenobiótico-membrana ya que los modificadores orgánicos pueden desnaturalizar a los fosfolípidos inmovilizados y no permite trabajar en condiciones experimentales próximas a las de los fluidos biológicos. Por otro lado, disminuye su capacidad de procesado de muestras ya que requiere la extrapolación de la retención a una fase móvil 100% acuosa a partir de los factores de retención obtenidos con diversas fases móviles con diferentes proporciones de modificador orgánico. Además, hay que tener en cuenta los problemas asociados a dichas extrapolaciones (apartado I.4.2).
- Las fases estacionarias IAM presentan un elevado coste, en contraste con las columnas C₁₈ convencionales utilizadas en CMB, presentan una estabilidad limitada y se observa una gran variabilidad en los datos de retención obtenidos con diferentes columnas (Tabla I.9). Este último hecho puede ser un gran inconveniente en estudios QRAR, en los que la precisión de los datos de retención es un requisito fundamental ya que se utilizan como variables de predicción de los parámetros farmacológicos.

VII.4.- Conclusiones

En este Capítulo se evalúa la potencialidad de CMB en la construcción de modelos QRAR que permitan la evaluación de diversas propiedades farmacológicas de anestésicos locales y antiinflamatorios no esteroideos, con objeto de realizar un estudio preliminar sobre la viabilidad de la implementación de CMB en los laboratorios farmacéuticos como una técnica de estimación farmacológica *"in vitro"* de alto rendimiento en las primeras etapas del desarrollo de nuevos xenobióticos. De los resultados mostrados en este Capítulo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La bondad de los modelos QRAR obtenidos mediante CMB para los fármacos pertenecientes a los dos grupos terapéuticos considerados pone de manifiesto que el sistema de CMB es capaz de emular la importancia relativa de las principales interacciones moleculares que experimentan los fármacos estudiados en los organismos vivos y que son responsables de las respuestas farmacológicas estudiadas.
- La evaluación estadística de la capacidad de descripción y predicción de los modelos CMB-QRAR obtenidos revela la fiabilidad de los modelos y de las estimaciones realizadas a partir de los mismos. Este hecho pone de manifiesto la viabilidad de CMB para la estimación de las propiedades farmacológicas estudiadas para nuevos anestésicos locales y antiinflamatorios no esteroideos.
- La comparación de los modelos CMB-QRAR e IAM-QRAR obtenidos revela que CMB proporciona mejores resultados, o al menos comparables, para los casos particulares estudiados. Estos resultados podrían indicar que, a pesar de que las fases estacionarias en IAM reproducen la naturaleza lipídica de las biomembranas, CMB mimetiza más fielmente que IAM las interacciones xenobiótico-biomembrana y xenobiótico-receptor, al menos en los casos estudiados. Este hecho podría deberse a los inconvenientes asociados a la adición de modificadores orgánicos a las fases móviles utilizadas en IAM. Además CMB presenta una serie de características (p. ej., mayor rapidez, menor coste, mayor precisión de los factores de retención) ventajosas frente a IAM para la realización de este tipo de estudios.

En resumen, las ventajas que presenta CMB frente a IAM, junto con los mejores resultados obtenidos en este Capítulo en la construcción de modelos QRAR y teniendo además en cuenta que los laboratorios farmacéuticos estadounidenses utilizan en la actualidad columnas IAM para la evaluación de las propiedades farmacológicas de nuevos xenobióticos en las primeras fases de su desarrollo, ponen de manifiesto que CMB presenta una gran potencialidad como técnica *"in vitro"* de alto rendimiento en dicho campo para complementar los ensayos convencionales *"in vivo"* e *"in vitro"* y reducir la experimentación con animales.



CAPÍTULO VIII

Relaciones Cuantitativas Actividad-Retención en Cromatografía Micelar de Bio-reparto

II.- Modelos Generales de Ecotoxicidad

VIII.1.- Introducción	223
VIII.2.- Experimental y metodología	226
VIII.2.1.- Experimental	226
VIII.2.2.- Programas	227
VIII.2.3.- Capacidad de descripción y predicción de los modelos QRAR y QSAR	228
VIII.3.- Resultados y discusión	228
VIII.3.1.- Análisis exploratorio de los datos	228
VIII.3.2.- Relaciones ecotoxicidad-retención	238
VIII.3.3.- Comparación con los modelos QSAR clásicos	242
VIII.4.- Conclusiones	244

...the first of these is the fact that the ...

...the second of these is the fact that the ...

...the third of these is the fact that the ...

...the fourth of these is the fact that the ...

...the fifth of these is the fact that the ...

...the sixth of these is the fact that the ...

...the seventh of these is the fact that the ...

...the eighth of these is the fact that the ...

...the ninth of these is the fact that the ...

...the tenth of these is the fact that the ...

...the eleventh of these is the fact that the ...

...the twelfth of these is the fact that the ...

...the thirteenth of these is the fact that the ...

...the fourteenth of these is the fact that the ...

...the fifteenth of these is the fact that the ...

...the sixteenth of these is the fact that the ...

...the seventeenth of these is the fact that the ...

...the eighteenth of these is the fact that the ...

...the nineteenth of these is the fact that the ...

...the twentieth of these is the fact that the ...

...the twenty-first of these is the fact that the ...

...the twenty-second of these is the fact that the ...

VIII.1.- Introducción

Diversos organismos nacionales e internacionales han introducido en sus legislaciones el concepto de impacto ambiental como una forma de valorar el efecto que sobre los ecosistemas pueden tener ciertas actividades humanas como la fabricación y el empleo en gran escala de sustancias químicas que llegan al ambiente, como por ejemplo, plaguicidas, escapes de motores, residuos domésticos e industriales (*Repetto M. y col., 1995-a*).

En el desarrollo e implantación de sistemas de decisión medioambiental es necesario establecer criterios científicos de valoración del riesgo de los productos químicos potencialmente contaminantes. La ecotoxicología es una disciplina que trata de prever, evaluar e incluso contribuir a la recuperación del trastorno producido por la llegada de un tóxico a un ecosistema. Actualmente, la Unión Europea considera que los estudios de ecotoxicidad se realicen sobre elementos relacionados con un ecosistema acuático (ej., peces, "*Daphnia*"; algas) (*Repetto M. y col., 1995-a*).

Los xenobióticos están presentes en el medio acuático en diversas formas, como por ejemplo, disueltos en el agua y adsorbidos sobre partículas de materia orgánica. La concentración de xenobiótico libre disuelto en agua se denomina concentración biodisponible, es decir, la concentración de xenobiótico disponible en el medio para ser absorbida por el organismo vivo (*Fent K., 2003*). Uno de los procesos que más afecta a la biodisponibilidad de los xenobióticos es su adsorción en la materia orgánica presente en suelos y sedimentos que se cuantifica con el coeficiente de adsorción normalizado por el contenido de carbono orgánico, K_{oc} (*Mackay D. y col., 2000*).

Por otro lado, los organismos acuáticos pueden absorber y acumular los xenobióticos presentes en el medio a través de diferentes vías dando lugar a un efecto de bioacumulación o de bioconcentración. Se denomina bioacumulación al proceso que provoca un aumento de la concentración de xenobiótico en el organismo acuático debido a la captación del mismo por todas las vías de exposición entre las que se incluyen la absorción a través de la dieta, la absorción cutánea y a través de la respiración. Sin embargo, el proceso de bioconcentración está referido a la captación del xenobiótico presente en el agua, es decir, incluye la absorción cutánea y por la respiración. Por tanto, el proceso de bioacumulación se puede considerar como una combinación de la captación de xenobióticos a través de la bioconcentración y de la alimentación. Los xenobióticos más hidrófobos se pueden almacenar y concentrar en los tejidos con alto contenido lipídico y pueden pasar de organismo en organismo de la cadena alimenticia aumentando progresivamente su concentración, resultando en concentraciones más grandes para los eslabones superiores de la cadena trófica (*Rand G.M., 1995; Mackay D. y col., 2000*).

Por último, una vez dentro del organismo el xenobiótico alcanzará el sitio de acción o receptor, al que se unirá en una determinada concentración para producir un determinado efecto tóxico (*Ren S.J. y col., 2002*). Los efectos tóxicos sobre los organismos acuáticos pueden ser de carácter agudo, subcrónico y crónico y se evalúan mediante ensayos de toxicidad acuática que se pueden clasificar atendiendo al periodo de exposición, situación del ensayo, criterios de los efectos evaluados y organismos ensayados (*Rand G.M., 1995*).

Muchas de las etapas determinantes de la ecotoxicidad de xenobióticos están basadas en procesos dinámicos gobernados por las relaciones de reparto o distribución entre algunos compartimentos del sistema ecológico (agua, suelo, organismos, etc.). Por otro lado, los procesos de absorción y distribución de la sustancia en el organismo están gobernados en gran medida por el comportamiento de reparto de la sustancia entre las fases lipídicas y acuosas, que depende de sus propiedades moleculares tales como hidrofobicidad, polaridad, grado de ionización, forma molecular y tamaño, como se ha comentado en el Capítulo I. Consecuentemente, las propiedades hidrófobas, electrónicas y estéricas de un xenobiótico pueden controlar la respuesta ecotoxicológica al mismo (*Rand G.M., 1995*).

Tal y como se ha comentado en el apartado I.1, en los últimos años por razones éticas, económicas, legales, socio-políticas y científicas se ha desarrollado un amplio espectro de métodos alternativos para la evaluación de la ecotoxicidad de xenobióticos. Entre éstos caben destacar las técnicas de diseño molecular asistido por ordenador, los modelos basados en relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) y los ensayos "in vitro" sobre cultivos celulares.

El uso de modelos QSAR en el campo de la ecotoxicología se ha desarrollado con especial interés en los últimos diez años (*Schultz T.W., y col., 2003-a; 2003-b*). Así, se han propuesto modelos QSAR para la predicción de la toxicidad aguda y crónica en diferentes organismos (*Könemann H., 1981; Veith G.D. y col., 1983; Cronin M.T.D. y col., 1995; 1996; Wong D.C.L. y col., 1999; Netzeva T.I. y col., 2003; Worgan A.D.P. y col., 2003*), para estimar el factor de bioconcentración y de bioacumulación de los compuestos en organismos acuáticos (*Axelmann J. y col., 1995; van Bavel B. y col., 1996; Wang X.L. y col., 1997; Fisk A.T. y col., 1998; Meylan W.M. y col., 1999-d*) para la predicción del coeficiente de adsorción en suelos (*Baker J.R. y col., 2000; 2001; Gramatica P. y col., 2000*) y para la evaluación del riesgo y clasificación de los compuestos en función de su peligrosidad potencial (*Nendza M. y col., 1990; Bradbury S.P., 1995; Karcher W. y col., 1996*). La variable de predicción más utilizada para la construcción de los modelos QSARs en ecotoxicología es el logaritmo de la relación de reparto *n*-octanol/agua de los solutos ($\log P$).

Los factores de retención obtenidos en cromatografía líquida en fase inversa también se han utilizado para la evaluación de diferentes parámetros de ecotoxicidad de xenobióticos mediante el empleo de relaciones cuantitativas retención-actividad (QRAR) (*Braumann T. y col., 1983; Mailhot H., 1987; Hodson J. y col., 1988; Warne M.S.J. y col., 1989; Rittich B. y col., 1990; Breyer E. y col.,*

1991; De Voogt P. y col., 1991; Hsieh M.M. y col., 1995; Chilmoczyk Z. y col., 1998; Szabó G. y col., 1999; Dai J. y col., 2001; Bermúdez-Saldaña J.M. y col., 2005-a; 2005-b; 2005-c). Cabe destacar que la Unión Europea recomienda el empleo del factor de retención (expresado como $\log k$) de los compuestos obtenido con columnas de tipo cianopropilo y fases móviles de agua o tampón citrato (pH = 6) / metanol para la estimación del coeficiente de adsorción en suelos y en lodos de aguas residuales expresado como $\log K_{oc}$ (Directiva 2001/59/CE). No obstante, el número de publicaciones en esta área es menor que en el campo de la Farmacología, probablemente debido a que el interés por el impacto medioambiental de las sustancias es más reciente. Por otro lado, los parámetros de retención o migración obtenidos con cromatografía electrocinética micelar (Rosés M. y col., 1999; Bermúdez-Saldaña J.M. y col., 2004) y cromatografía electrocinética con microemulsiones (Ishihama Y. y col., 1995) se han empleado para la construcción de modelos QRAR (o migración-actividad, QMAR) para la evaluación de la ecotoxicidad de xenobióticos, si bien existen muchas menos publicaciones acerca del empleo de la electroforesis capilar en comparación con las existentes de cromatografía líquida.

Tal y como se ha mostrado en el Capítulo anterior y en otras experiencias realizadas en nuestro grupo de investigación (apartado I.5.3.1), los factores de retención obtenidos con cromatografía micelar de bio-reparto (CMB) han demostrado su utilidad para describir y predecir diferentes actividades biológicas de diversas familias terapéuticas de fármacos. Debido a los buenos resultados obtenidos en el campo de la Farmacología, se decidió aplicar la metodología CMB-QRAR al campo medioambiental. De este modo, en el presente Capítulo se estudia la posibilidad de utilizar CMB como un sistema "in vitro" para evaluar la ecotoxicidad de contaminantes orgánicos. Con este fin se estudian las relaciones entre varios parámetros de ecotoxicidad de 66 contaminantes orgánicos en diversos organismos acuáticos y su retención en CMB y se evalúa la capacidad de descripción y predicción de los modelos QRAR obtenidos.



VIII.2.- Experimental y metodología

VIII.2.1.- Experimental

La preparación de las fases móviles y de las disoluciones de los analitos, así como la longitud de onda de detección se indican en el Capítulo III. En el presente apartado sólo se enumeran detalles concretos no especificados en dicho Capítulo:

- **Fases móviles ensayadas:** disoluciones acuosas de Brij35 0.06M ajustadas a pH 7.4.
- **Fases estacionarias:** Kromasil C₁₈ ($d_p = 5\mu\text{m}$; L = 50 y 150 mm; $d_c = 4.6\text{ mm}$) (Scharlab, S.L., La Jota, Barcelona, España).
- **Configuración de los equipos cromatográficos:**
 - Sistema de inyección: válvula de inyección manual Rheodyne (Cotati, California, EE.UU.) con un bucle de 20 μL .
 - Equipo con compartimento termostatzado para columnas HP 1100. Las experiencias se realizaron a 25 °C.
 - Flujo de la fase móvil: 1 y 1.5 mL min⁻¹ para los compuestos menos y más retenidos, respectivamente.
 - ChemStation HP (versión A0402, 1996 y A.07.01 [682], ©HP 1999).
- **Cálculo de los factores de retención:** para el cálculo de los factores de retención se utilizó la ecuación III.1. El "tiempo total básico" (t_M^0) se estimó a partir de la primera perturbación que aparece en el cromatograma.
- **Analitos:** 66 compuestos orgánicos no congéneres (derivados del benceno mono- y disustituidos, fenilureas, fenoles, fenoxiácidos, hidrocarburos aromáticos y otros plaguicidas) que se listan en la Tabla VIII.1. En el Anexo II (apartados XII.2.11, XII.2.14 - XII.2.18) se muestra la estructura y los valores bibliográficos del logaritmo de las constantes de protonación y de $\log P$ para las formas no ionizadas de los compuestos estudiados.

VIII.2.2.- Programas

Los valores de los parámetros de ecotoxicidad se estimaron con diversos programas integrados en el paquete informático EPI Suite™ ("US Environmental Protection Agency", US EPA, versión 3.05) desarrollado por "Office of Pollution Prevention and Toxics" (OPPT) de la EPA y "Syracuse Research Corporation" (SRC). Este paquete de programas fue cedido por gentileza del Profesor Bill Meylan de la SRC. En este Capítulo se usaron los siguientes programas (apartado III.6):

- El programa ECOSAR Class Program™ (versión 0.99e) es una versión computerizada del análisis ECOSAR ("ecological structure-activity relationships") utilizado por la OPPT de la EPA. Este programa predice diversos parámetros de toxicidad acuática de compuestos químicos en varios organismos acuáticos a partir de modelos QSAR del tipo $\log(\text{parámetro de toxicidad}) - \log P$ para más de 50 clases químicas.
- El programa BCFWIN™ (versión 2.14) estima los valores de los factores de bioconcentración en peces (BCF, siglas de "bioconcentration factor"). La rutina informática del programa clasifica los compuestos como iónicos o no iónicos:
 - Para los compuestos no iónicos estima los valores del factor de bioconcentración mediante modelos QSAR del tipo $\log BCF - \log P$ y una serie de factores de corrección de tipo empírico basados en la estructura molecular. Cada uno de modelos QSAR tiene su aplicabilidad restringida a un intervalo diferente de valores de $\log P$, de modo que para la predicción de los valores de $\log BCF$ de un compuesto neutro selecciona una ecuación u otra en función de su valor de $\log P$.
 - El programa clasifica los compuestos iónicos según su valor de $\log P$ en unos intervalos establecidos y asigna un valor constante de $\log BCF$ a cada uno de dichos intervalos.

Además, se utilizaron los siguientes programas integrados en el programa EPI Suite™:

- KOWWIN™ (versión 1.66) que estima los valores de $\log P$.
- MPBPWIN™ (versión 1.40) que estima el punto de fusión, punto de ebullición y la presión de vapor de los compuestos orgánicos y también proporciona valores experimentales.
- WSKOWWIN™ (versión 1.10) que estima la solubilidad en agua de los compuestos y también contiene una base de datos con valores experimentales.

Los parámetros estructurales: refracción molar, volumen molar, "parachor" y polarizabilidad se calcularon mediante el programa ACD/ChemSketch (ACD Labs™, Advanced Chemistry Development Inc., versión de demostración).

VIII.2.3.- Capacidad de descripción y predicción de los modelos QRAR y QSAR

En el presente Capítulo se utilizaron "series largas de datos" por lo que la capacidad de descripción y predicción de los modelos se evaluó por comparación de los parámetros *RMSEC* y *RMSECV* basado en la técnica de validación cruzada "*Venetian-blinds cross-validation*" utilizando bloques aleatorios de datos (apartado III.5).

VIII.3.- Resultados y discusión

VIII.3.1.- Análisis exploratorio de los datos

Los valores de parámetros de ecotoxicidad medidos "*in vivo*" a menudo no están disponibles para muchos compuestos, o si lo están, se observa una alta variabilidad en los resultados obtenidos para un compuesto dado incluso utilizando en los ensayos un mismo organismo vivo y punto final. En esta situación, el uso de métodos de estimación "*in vitro*" aceptados por organizaciones nacionales y/o internacionales y cuya capacidad de predicción haya sido demostrada puede ser una opción apropiada para la evaluación de nuevas estrategias alternativas.

En la Tabla VIII.1 se muestran los valores de toxicidad acuática obtenidos del programa EPI Suite™ para un conjunto de 66 compuestos (derivados del benceno mono- y di-sustituidos, fenilureas, fenoles, fenoxiácidos, hidrocarburos aromáticos y otros plaguicidas) ordenados alfabéticamente junto con los valores del logaritmo de los factores de retención obtenidos con una fase móvil de Brij35 0.06 M a pH 7.4. Los parámetros ecotoxicológicos utilizados en este Capítulo son los siguientes:

- Concentración letal mediana (LC_{50}): se define como la concentración de sustancia en un medio ambiente que produce la muerte a un 50% de los organismos de una determinada población expuesta a la sustancia a investigar durante un periodo definido de tiempo. En concreto se estudiaron los parámetros LC_{50} estimados para poblaciones de peces de agua dulce (LC_{50} (peces, 96 h)) y salada (LC_{50} (peces AS, 96 h)) ambos tras un periodo de exposición de 96 h y en poblaciones de "*Daphnia*" (LC_{50} ("*Daphnia*", 48 h)) tras un periodo de exposición de 48 h.
- Concentración efectiva mediana (EC_{50}): se define como la concentración de sustancia en un medio ambiente que produce un efecto tóxico dado en el 50% de los organismos de una determinada población expuesta a la sustancia a investigar durante un periodo definido de tiempo. Los organismos estudiados fueron algas verdes expuestas a los compuestos

estudiados durante 96 h (EC_{50} (algas, 96 h)) y poblaciones de "*Daphnia*" tras un periodo de exposición de 16 días (EC_{50} ("*Daphnia*", 16 días)).

- Valor crónico (ChV , siglas en inglés de "*chronic value*"): se define en términos logarítmicos (ecuación VIII.1) como la semisuma del logaritmo de la concentración máxima de sustancia que no provoca ningún efecto adverso ($NOEC$, "*no-observed-effect concentration*") y del logaritmo de la concentración mínima de sustancia que provoca algún efecto adverso ($LOEC$, "*lowest-observed-effect concentration*").

$$\ln(ChV) = \frac{\ln(NOEC) + \ln(LOEC)}{2} \quad (\text{VIII.1})$$

En este Capítulo se utilizaron los valores de ChV estimados en peces expuestos al compuesto a investigar durante 30 días (ChV (peces, 30 días)) y en algas verdes tras un periodo de exposición de 96 h (ChV (algas, 96 h)).

- Factor de bioconcentración (BCF , siglas en inglés de "*bioconcentration factor*"): se calcula como el cociente entre la concentración de compuesto en el organismo después de un largo periodo de exposición y la concentración de compuesto en el agua en la que el organismo está expuesto. Los valores de BCF utilizados en este Capítulo están estimados en peces.

Previamente a la obtención de los modelos QRAR, se realizó un análisis en componentes principales (PCA) para examinar las relaciones entre variables. Para la construcción de la matriz $X_{66 \times 19}$ (con datos vacantes) se utilizaron las siguientes variables:

- Los 8 parámetros ecotoxicológicos estudiados: LC_{50} (peces, 96 h), LC_{50} ("*Daphnia*", 48 h), LC_{50} (peces AS, 96 h), EC_{50} (algas, 96 h), EC_{50} ("*Daphnia*", 16 días), ChV (peces, 30 días), ChV (algas, 96 h) y el logaritmo del BCF en peces ($\log BCF$ (peces)).
- El logaritmo de los factores de retención obtenidos en CMB ($\log K_{CMB}$).
- 10 descriptores moleculares de los xenobióticos (Tabla VIII.2): $\log P$ y $\log D$ (relación de distribución *n*-octanol/agua a pH 7.4) como descriptores hidrófobos; peso molecular (M_r), refracción molar (R_m), volumen molar (V_m) y "*parachor*" (P) como descriptores estéricos; la polarizabilidad y la carga molar total a pH 7.4 (α) como descriptores electrónicos. Adicionalmente, se incluyeron en el PCA las variables solubilidad en agua y punto de fusión, parámetros cuyos valores se utilizan como datos de entrada en el programa ECOSAR Class Program™.

Debido a que las variables arriba indicadas están en escalas diferentes, los datos se autoescalaron antes de realizar el PCA. Las dos primeras componentes principales explicaron más del 78% de la varianza de los datos. La tercera y cuarta componente principal explicaron un 7 y 5% de la varianza total en los datos, respectivamente.

Tabla VIII.1.- Datos de retención en CMB y parámetros de ecotoxicidad para los compuestos estudiados.

Compuesto	$\log K_{CMB}^a$	LC_{50} (peces, 96 h) ^b	LC_{50} ("Daphnia", 48 h) ^c	LC_{50} (peces AS, 96 h) ^d	EC_{50} (algas, 96 h) ^e	EC_{50} ("Daphnia", 16 días) ^f	ChV (peces, 30 días) ^g	ChV (algas, 96 h) ^h	$\log BCF$ (peces) ⁱ
Ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropiónico	0.54	208	238	75.1	157	18.4	31.2	27.0	0.50
Ácido 2-(3-clorofenoxi)propiónico	0.34	639	704	177	450	42.8	87.7	56.4	0.50
Ácido 2-(4-clorofenoxi)propiónico	0.36	639	704	177	450	42.8	87.7	56.4	0.50
Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético	0.63	483	536	142	345	34.5	67.6	46.6	0.50
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	0.65	428	479	132	310	32.2	61.0	44.4	0.50
Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)propiónico	0.73	187	216	70.7	143	17.4	28.5	26.0	0.50
Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico	-0.02	1210	1310	297	825	71.4	159	89.5	0.50
Ácido 2-fenoxipropiónico	-0.27	2120	2230	430	1370	102	262	119	0.50
Ácido 4-(2-metil-4-clorofenoxi)butírico	0.92	66.0	78.4	31.2	53.4	7.75	10.8	12.7	0.50
Ácido (2,4,5-triclorofenoxi)acético	0.84	124	145	52.2	97.3	12.9	19.6	20.2	0.50
Ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propiónico	0.91	52.6	63	27.2	43.6	6.78	8.89	11.5	0.50
Anilina	0.77	134	1.13	-	-	-	-	-	0.13
Antraceno	1.55	0.817	1.03	0.583	0.737	0.148	0.154	0.286	2.64
Benceno	1.29	59.2	63.4	13.5	39.6	3.24	7.61	3.94	0.83
Benfuracarb	1.83	4.91	4.35	-	0.422	-	-	0.341	2.43
Benomilo	0.76	32.7	139	-	2.63	-	-	2.04	1.03
Bifenilo	1.58	2.53	3.07	1.36	2.12	0.340	0.433	0.59	2.20
Bromobenceno	1.59	17.3	19.7	6.08	13.0	1.49	2.57	2.16	1.52
Bromopropilato	1.89	1.82	0.781	-	0.161	-	-	0.133	3.07
Buprofezin	1.86	1.56	1.96	1.09	1.40	0.275	0.291	0.528	2.61
Buturón	1.64	42.1	47.2	13.3	30.6	3.23	6.03	4.49	1.35
Carbarilo	1.06	19.8	76.8	-	1.60	-	-	1.25	1.11
Carbendazim	0.79	102	390	-	3.95	-	-	3.03	0.49
Clorbromurón	1.51	18.1	21.0	7.21	14.0	1.78	2.80	2.72	1.73

(Continúa en la página siguiente)

Tabla VIII.1.- Continuación.

Compuesto	$\log K_{CMB}^a$	LC_{50} (peces, 96 h) ^b	LC_{50} ("Daphnia", 48 h) ^c	LC_{50} (peces AS, 96 h) ^d	EC_{50} (algas, 96 h) ^e	EC_{50} ("Daphnia", 16 días) ^f	ChV (peces, 30 días) ^g	ChV (algas, 96 h) ^h	$\log BCF$ (peces) ⁱ
4-Cloro-3-metilfenol	1.40	7.76	3.97	-	17.0	-	1.16	2.55	1.38
2-Clorofenol	1.30	15.1	5.95	-	46.1	-	2.28	5.05	0.96
Clorotolurón	1.34	44.9	50.1	13.6	32.4	3.31	6.36	4.53	1.29
Cloroxurón	1.54	2.39	2.96	1.50	2.08	0.377	0.430	0.693	2.44
Clorpirifós	1.86	1.15	-	-	-	-	-	-	2.89
Diazinón	1.73	2.60	-	-	-	-	-	-	2.27
Diclorán	1.27	17.08	0.881	-	-	-	-	1.92	1.43
2,4-Diclorofenol	1.47	7.70	4.13	-	15.9	-	1.15	2.52	1.06
Dicofol	2.02	0.158	0.000833	-	0.16	-	-	-	3.77
2,4-Dimetilfenol	1.40	7.55	3.70	-	17.5	-	1.13	2.49	1.31
Dimetoato	0.65	140	-	-	-	-	-	-	0.50
2,4-Dinitrofenol	0.83	10.3	17.8	-	-	-	-	-	0.63
4,6-Dinitro- <i>o</i> -cresol	0.89	5.53	8.82	-	-	-	-	-	1.06
Diurón	1.38	40.5	45.5	12.8	29.6	3.13	5.82	4.35	1.36
2-Fenilfenol	1.37	4.07	2.75	-	6.23	-	0.603	1.31	1.83
Fenol	1.10	27.7	8.04	-	127	-	4.26	9.56	0.46
Fentión	1.53	1.83	-	-	-	-	-	-	2.44
Fenurón	0.77	466	478	79.1	288	18.7	54.3	20.2	0.36
Fluometurón	1.40	80.7	88.6	21.9	56.5	5.30	11.0	6.92	1.11
Hexaflumurón	1.65	0.430	-	-	-	-	-	-	3.64
Hexitiazox	1.85	0.739	0.865	-	0.0710	-	-	-	3.59
Imazalil	1.55	3.71	0.359	-	1.40	-	-	1.19	2.46
Isoproturón	1.36	24.8	28.2	8.54	18.5	2.09	3.66	3.01	1.49
Lufenurón	1.80	0.087	-	-	-	-	-	-	4.39

(Continúa en la página siguiente)

Tabla VIII.1.- Continuación.

Compuesto	$\log K_{CMB}^a$	LC_{50} (peces, 96 h) ^b	LC_{50} ("Daphnia", 48 h) ^c	LC_{50} (peces AS, 96 h) ^d	EC_{50} (algas, 96 h) ^e	EC_{50} ("Daphnia", 16 días) ^f	ChV (peces, 30 días) ^g	ChV (algas, 96 h) ^h	$\log BCF$ (peces) ⁱ
Malatión	1.47	18.4	143	-	2.82	-	-	2.19	1.06
Metalaxil	1.01	61.2	416	-	4.82	-	-	3.71	0.61
Metidatión	1.35	1.81	-	-	-	-	-	-	0.52
Metilpirimifós	1.64	4.31	-	-	-	-	-	-	1.95
Metoxurón	1.07	134	144	32.3	90.8	7.76	17.5	9.67	0.93
Monolinurón	1.37	90.6	98.9	23.5	62.8	5.68	12.2	7.29	1.04
Monurón	1.21	138	148	32.1	92.8	7.70	17.9	9.44	0.86
Neburón	1.81	1.94	2.42	1.26	1.71	0.317	0.354	0.59	2.50
2-Nitrofenol	1.04	23.2	8.15	-	83.0	-	-	7.88	0.77
4-Nitrofenol	1.18	23.2	8.15	-	83.0	-	3.54	7.88	0.77
Pentaclorofenol	1.13	0.803	1.09	-	0.50	-	0.115	0.242	2.55
Pirimicarb	1.03	75.5	665	-	5.88	-	-	4.50	0.38
Procloraz	1.57	4.50	0.437	-	1.72	-	-	0.627	2.48
Propargite	2.00	0.115	0.157	0.147	0.121	0.0380	0.0260	0.0950	3.59
Tetradifón	1.75	0.271	0.361	0.288	0.271	0.0740	0.0580	0.170	3.29
Tiabendazol	0.87	55.4	4.09	-	7.72	-	-	1.73	0.84
Triclopir	0.59	604	671	179	433	43.4	84.7	58.8	0.50
2,4,6-Triclorofenol	1.21	3.71	2.71	-	5.11	-	0.547	1.18	1.56

^a Logaritmo del factor de retención obtenido en CMB con una fase móvil de Brij35 0.06 M (pH 7.4) y columnas Kromasil C₁₈ a 25 ° C.

^b LC_{50} en peces tras 96 h de exposición expresado en mg L⁻¹.

^c LC_{50} en "Daphnia" tras 48 h de exposición (mg L⁻¹).

^d LC_{50} en peces de agua salada tras 96 h de exposición (mg L⁻¹).

^e EC_{50} en algas verdes tras 96 h de exposición (mg L⁻¹).

^f EC_{50} en "Daphnia" tras 16 días de exposición (mg L⁻¹).

^g ChV en peces tras 30 días de exposición (mg L⁻¹).

^h ChV en algas verdes tras 96 h de exposición (mg L⁻¹).

ⁱ Logaritmo del factor de bioconcentración en peces.

Tabla VIII.2.- Parámetros moleculares utilizados para realizar el análisis en componentes principales.

Compuesto	$\log P^a$	$\log D^b$	α^c	Punto de fusión (°C) ^d	M_r^e	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹) ^f	R_m^g (cm ³)	V_m^h (cm ³)	Pr^i (cm ³)	Polarizabilidad ($\times 10^{24}$) (cm ³)
Ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropiónico	2.94	-1.36	-0.9999	94.5	215	620	53.4	170	436	21.2
Ácido 2-(3-clorofenoxi)propiónico	2.39	-	$\sim -1^j$	113	201	1200	44.0	137	361	17.5
Ácido 2-(4-clorofenoxi)propiónico	2.39	-	$\sim -1^j$	90.5 ^k	201	1470	44.0	137	361	17.5
Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético	2.52	-1.75	-0.9999	120	201	630	48.8	153	399	19.4
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2.62	-2.05	-1.0000	140.5	221	677	48.9	148	397	19.4
Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)propiónico	3.03	-1.27	-0.9999	122	235	350	53.5	165	434	21.2
Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico	2.14	-3.29	-1.0000	115	221	8310	49.7	150	398	19.7
Ácido 2-fenoxipropiónico	1.75	-	$\sim -1^j$	74.4 ^k	166	5139 ^l	43.7	141	363	17.3
Ácido 4-(2-metil-4-clorofenoxi)butírico	3.50	2.27	-0.9406	100	229	48.0	58.1	189	479	23.0
Ácido (2,4,5-triclorofenoxi)acético	3.26	-1.31	-1.0000	153	255	278	53.8	160	433	21.3
Ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propiónico	3.68	-0.880	-1.0000	182	270	71.0	58.4	177	470	23.2
Anilina	1.08	1.08	0.0016	-6.00	93.1	36000	30.5	91.7	233	12.1
Antraceno	4.35	4.35	0	215	178	0.0434	61.9	158	415	24.6
Benceno	1.99	1.99	0	5.50	78.1	1790	26.3	89.4	207	10.4
Benfurcarb	4.06	-	-	25.0 ^k	411	8.00	110	350	905	43.7
Benomilo	2.24	-	-	140	290	3.80	77.8	225	597	30.8
Bifenilo	3.76	3.76	0	69.0	154	6.94	50.8	155	380	20.2
Bromobenceno	2.88	2.88	0	-30.6	157	446	33.9	106	258	13.5
Bromopropilato	4.90	4.90	0	77.0	428	0.100	92.3	269	709	36.6
Buprofezin	4.30	-	-	105	305	0.900	90.5	272	683	35.8
Buturón	2.66	2.66	0	131 ^k	237	30.0	65.5	192	508	26.0
Carbarilo	2.35	2.35	0	145	201	110	59.0	170	441	23.4
Carbendazim	1.55	1.55	0.0006	300	191	29.0	52.6	135	388	20.9
Clorbromurón	3.15	3.15	0	96.0	294	35.0	63.2	181	483	25.1

(Continúa en la página siguiente)

Tabla VIII.2.- Continuación.

Compuesto	$\log P^a$	$\log D^b$	α^c	Punto de fusión (°C) ^d	M_r^e	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹) ^f	R_m^g (cm ³)	V_m^h (cm ³)	Pr^i (cm ³)	Polarizabilidad ($\times 10^{24}$) (cm ³)
4-Cloro-3-metilfenol	2.70	2.70	-0.0070	67.0	143	3834	37.9	116	296	15.0
2-Clorofenol	2.16	2.13	-0.0647	9.80	129	11300	33.0	99.8	258	13.1
Clorotolurón	2.58	2.58	0	148	213	70.0	58.6	175	450	23.2
Cloroxurón	4.08	4.08	0	151	291	3.70	84.4	243	623	33.5
Clorpirifós	4.66	-	-	42.0	351	1.12	77.2	264	638	30.6
Diazinón	3.86	3.86	0	25.0	304	40.0	79.6	260	677	31.6
Diclorán	2.76	2.76	1.12×10^{-10}	191	207	7.00	-	-	-	-
2,4-Diclorofenol	2.80	2.68	-0.2445	45.0	163	4500	37.9	112	294	15.0
Dicofol	5.81	5.81	0	77.5	370	0.80	85.6	242	649	33.9
2,4-Dimetilfenol	2.61	2.61	-0.0006	24.5	122	7870	37.8	120	298	15.0
Dimetoato	0.280	0.280	0	52.0	229	25000	54.5	176	468	21.6
2,4-Dinitrofenol	1.73	-1.58	-0.9995	116	184	2790	41.2	112	333	16.3
4,6-Dinitro- <i>o</i> -cresol	2.27	-0.820	-0.9992	86.6	198	198	46.1	128	371	18.3
Diurón	2.67	2.67	0	158	233	42.0	58.7	170	448	23.3
2-Fenilfenol	3.28	3.28	-0.0027	59.0	170	700	52.7	153	396	20.9
Fenol	1.51	1.51	-0.0026	40.9	94.1	82800	28.1	87.8	222	11.2
Fentión	4.08	4.08	0	7.50	278	7.50	72.2	222	587	28.6
Fenurón	1.38	1.38	0	134	164	4030	48.9	146	376	19.4
Fluometurón	2.35	2.35	0	164	232	110	53.9	180	434	21.4
Hexaflumurón	5.64	5.64	0	204	461	0.0270	90.8	286	733	36.0
Hexitiazox	5.57	5.57	0	108	353	0.500	94.1	268	734	37.3
Imazalil	4.10	4.05	0.1189	52.7	297	180	79.4	241	609	31.5
Isoproturón	2.84	2.84	0	158	206	65.0	63.1	196	492	25.0
Lufenurón	6.61	6.61	0	166	511	0.0600	95.7	313	787	37.9
Malatión	2.29	2.29	0	2.80	330	143	77.5	260	680	30.7

(Continúa en la página siguiente)

Tabla VIII.2.- Continuación.

Compuesto	$\log P^a$	$\log D^b$	α^c	Punto de fusión (°C) ^d	M_r^e	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹) ^f	R_m^g (cm ³)	V_m^h (cm ³)	Pr^i (cm ³)	Polarizabilidad ($\times 10^{24}$) (cm ³)
Metalaxil	1.70	1.70	0	71.0	279	8400	76.9	250	630	30.5
Metidati3n	1.58	-	-	39.0	302	187	68.9	189	526	27.3
Metilpirimif3s	3.44	3.44	0.0002	15.0	305	8.60	79.8	248	664	31.6
Metoxur3n	2.11	2.11	0	127	229	678	60.5	182	469	24.0
Monolinur3n	2.26	2.26	0	81.5	215	930	60.3	181	470	23.9
Monur3n	2.03	2.03	0	171	199	230	53.8	158	412	21.3
Nebur3n	4.15	4.15	0	102	275	4.800	72.6	220	568	28.8
2-Nitrofenol	1.91	1.52	-0.5966	44.8	139	2500	34.7	99.7	278	13.7
4-Nitrofenol	1.91	1.47	-0.6401	114	139	11600	34.7	99.7	278	13.7
Pentaclorofenol	4.74	2.04	-0.9980	174	266	14.0	52.6	148	402	20.9
Pirimicarb	1.40	1.40	0.0013	90.5	238	2700	66.1	208	540	26.2
Procloraz	4.13	4.13	0.0003	48.0	379	34.0	93.4	274	716	37.0
Propargite	5.57	5.57	0	25.0	350	0.500	96.8	299	799	38.4
Tetradif3n	5.18	5.18	0	149	356	0.078	-	-	-	-
Tiabendazol	2.00	2.00	0.0017	305	201	50.0	57.7	143	416	22.9
Triclopir	2.53	-0.90	-0.9996	149	256	440	51.9	154	427	20.6
2,4,6-Triclorofenol	3.45	2.25	-0.9367	69.0	197	800	42.8	124	330	17.0

^a Logaritmo de la relaci3n de reparto *n*-octanol/agua estimado con el programa KOWWIN TM.

^b Logaritmo de la relaci3n de distribuci3n *n*-octanol/agua a pH 7.4 calculado con la ecuaci3n V.2.

^c Carga molar total a pH 7.4 calculada con la ecuaci3n V.6.

^d Valores experimentales del punto de fusi3n.

^e Peso molecular.

^f Valores experimentales de la solubilidad en agua.

^g Refracci3n molar.

^h Volumen molar.

ⁱ "Parachor".

^j Valor estimado.

^k Valor del punto de fusi3n estimado con el programa inform3tico MPBPWIN TM.

^l Valor de la solubilidad en agua estimado con el programa inform3tico WSKOWWIN TM.

En la Figura VIII.1 muestra el gráfico de cargas ("*loadings*") correspondiente a las dos primeras componentes principales. Tal y como puede observarse, existe una correlación elevada entre todos los parámetros relacionados con la toxicidad aguda y crónica (LC_{50} , EC_{50} y ChV), pero éstos no están correlacionados con $\log BCF$. Además, éstos parámetros toxicológicos están inversamente correlacionados con $\log k_{CMB}$, α , y $\log D$, de modo que los compuestos más tóxicos (aquellos con valores más bajos en los parámetros toxicológicos) son los que presentan valores más altos en $\log k_{CMB}$ y $\log D$.

Por otro lado, no se observa correlación entre los parámetros toxicológicos (LC_{50} , EC_{50} y ChV) y $\log P$. De hecho, cuando los datos de toxicidad de los compuestos se correlacionaron con los correspondientes valores de $\log P$ para las formas no ionizadas de los compuestos se obtuvieron correlaciones muy pobres ($r^2 < 0.2$). Estos resultados no son sorprendentes, de hecho el programa ECOSAR utiliza un modelo QSAR diferente para cada familia de compuestos y de acuerdo con la bibliografía los modelos QSAR basados en $\log P$ normalmente sólo proporcionan buenos resultados para series de congéneres. Este comportamiento puede deberse al hecho de que la respuesta tóxica observada no sólo depende de las interacciones hidrófobas sino que también de las propiedades electrónicas y estéricas de los solutos.

Finalmente, el factor de bioconcentración ($\log BCF$) muestra una elevada correlación con $\log P$ y en menor extensión con $\log k_{CMB}$ y las variables M_r , V_m , P_r , R_m y polarizabilidad.

A la vista de los resultados obtenidos, es de esperar que la variable $\log k_{CMB}$ sea suficiente para la construcción de buenos modelos QRAR para todos los parámetros ecotoxicológicos estudiados. Del mismo modo, cabe suponer que los modelos QSAR obtenidos utilizando $\log D$ como variable descriptora proporcionen buenos resultados, excepto para la variable $\log BCF$ donde la variable $\log P$ parece ser la más adecuada. A continuación se estudiarán las relaciones ecotoxicidad-retención y se compararán con los modelos QSAR clásicos obtenidos a partir de $\log P$ y $\log D$.

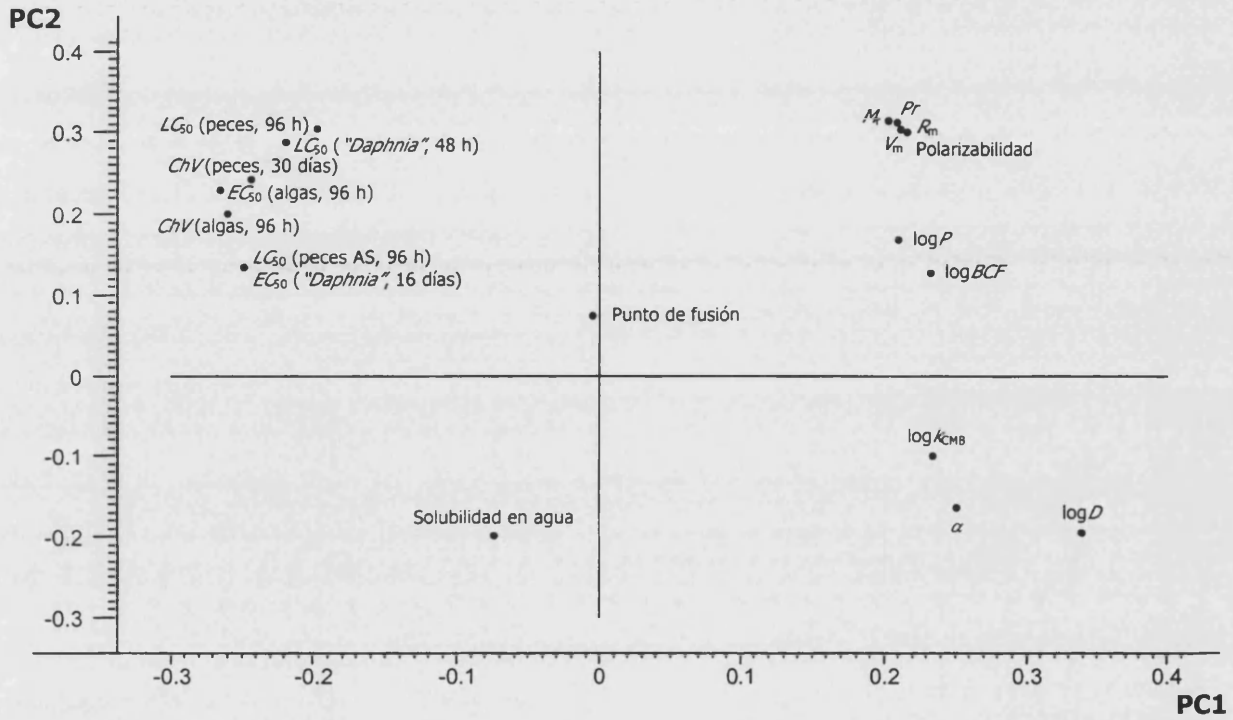


Figura VIII.1.- Gráfico de cargas ("loadings plot") de las dos primeras componentes principales (PCs) del PCA (varianza acumulada explicada ~ 78%). Se utilizaron datos autoescalados en la matriz $X_{66 \times 19}$ (con datos vacantes).



VIII.3.2.- Relaciones ecotoxicidad-retención

En la Figura VIII.2 se muestran las relaciones entre los diferentes parámetros de ecotoxicidad y los datos de retención en CMB. Tal y como se puede observar, los valores de los parámetros LC_{50} , EC_{50} y ChV para todos los organismos y ensayos estudiados disminuyen al aumentar la retención en CMB, en cambio los valores de $\log BCF$ aumentan al aumentar $\log k_{CMB}$. Estas observaciones están de acuerdo con los resultados obtenidos en el PCA. Adicionalmente, en todas las representaciones, se observa un valor crítico en la retención ($\log k_{CMB} \sim 1$) en el que se produce un cambio de pendiente en las relaciones parámetro ecotoxicológico - $\log k_{CMB}$.

Para describir matemáticamente de forma sencilla este comportamiento, los datos de retención de los contaminantes orgánicos ($\log k_{CMB}$) y sus correspondientes parámetros de ecotoxicidad se ajustaron a modelos polinómicos de orden 2. En la Tabla VIII.3 se muestra el análisis estadístico y las propiedades de predicción correspondientes a los modelos QRAR obtenidos. Tal y como se puede observar, en todos los casos la adecuación de los modelos polinómicos a los datos fue satisfactoria ($0.90 < r^2 < 0.96$, excepto para el modelo de $\log BCF$, $r^2 = 0.78$). Para todos los modelos los valores del estadístico ρ fueron menores de 0.05, lo que indica que las relaciones entre los parámetros de ecotoxicidad y la retención con fases móviles micelares de Brij35 son estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95%. Los coeficientes de ajuste de todos los modelos fueron también estadísticamente significativos a este nivel de confianza. Por tanto, los modelos se pueden utilizar para la predicción de los valores de LC_{50} , EC_{50} , ChV y $\log BCF$ para nuevos compuestos en los organismos estudiados.

Se estudió la posibilidad de incluir otras variables tales como M_r , V_m , P_r , R_m o polarizabilidad para mejorar el modelo QRAR de $\log BCF$, tal y como sugiere el PCA. Para este propósito se realizaron diferentes regresiones lineales múltiples. Los mejores resultados se obtuvieron al incluir M_r , pero su inclusión no mejoró significativamente el modelo ($r^2 = 0.82$).

Con el fin de evaluar la capacidad de predicción de los modelos en términos de validación cruzada, se obtuvieron los valores de $RMSEC$ y $RMSECV$ para cada uno de los modelos QRAR (Tabla VIII.3). Tal y como se puede observar, los valores de $RMSEC$ y $RMSECV$ fueron similares lo que pone de manifiesto la robustez de los modelos propuestos y la fiabilidad de las predicciones de los parámetros de ecotoxicidad para nuevas moléculas a partir de sus factores de retención en las condiciones cromatográficas estudiadas. En la Figura VIII.3 se muestran los gráficos de validación en los que se representan los valores de los parámetros de ecotoxicidad predichos (tras el ajuste y en validación cruzada) frente a los utilizados para la construcción de los modelos. Tal y como se puede observar, los valores predichos en calibración y validación son coincidentes y se distribuyen alrededor de la línea recta teórica (pendiente y ordenada en el origen igual a 1 y 0, respectivamente).

Tabla VIII.3.- Análisis estadístico de los modelos ecotoxicidad-retención: parámetro ecotoxicológico = $b_0 + b_1 (\log k_{CMB}) + b_2 (\log k_{CMB})^2$ ^a.

Parámetro ecotoxicológico ^b	<i>n</i>	$b_0 \pm ts_{b_0}$ (<i>p</i>)	$b_1 \pm ts_{b_1}$ (<i>p</i>)	$b_2 \pm ts_{b_2}$ (<i>p</i>)	r^2 (r'^2)	<i>F</i> (<i>p</i>)	<i>s_{y/x}</i>	<i>RMSEC</i>	<i>RMSECV</i>
<i>LC</i> ₅₀ (peces, 96 h), mg L ⁻¹	66	1270 ± 100 (< 0.0001)	-1800 ± 200 (< 0.0001)	629 ± 80 (< 0.0001)	0.90 (0.90)	282 (< 0.0001)	104	101	126
<i>LC</i> ₅₀ ("Daphnia", 48 h), mg L ⁻¹	59	1370 ± 140 (< 0.0001)	-1900 ± 300 (< 0.0001)	625 ± 120 (< 0.0001)	0.85 (0.85)	159 (< 0.0001)	146	142	165
<i>LC</i> ₅₀ (peces AS, 96 h), mg L ⁻¹	31	300 ± 20 (< 0.0001)	-370 ± 40 (< 0.0001)	120 ± 20 (< 0.0001)	0.96 (0.96)	320 (< 0.0001)	21.0	19.9	22.7
<i>EC</i> ₅₀ (algas, 96 h), mg L ⁻¹	54	860 ± 70 (< 0.0001)	-1180 ± 130 (< 0.0001)	400 ± 60 (< 0.0001)	0.90 (0.90)	242 (< 0.0001)	74.1	72.0	86.2
<i>EC</i> ₅₀ ("Daphnia", 16 días), mg L ⁻¹	31	72 ± 5 (< 0.0001)	-90 ± 10 (< 0.0001)	28 ± 5 (< 0.0001)	0.96 (0.96)	322 (< 0.0001)	5.01	4.76	5.36
<i>ChV</i> (peces, 30 días), mg L ⁻¹	40	169 ± 12 (< 0.0001)	-230 ± 20 (< 0.0001)	77 ± 12 (< 0.0001)	0.95 (0.94)	331 (< 0.0001)	12.1	11.7	14.9
<i>ChV</i> (algas, 96 h), mg L ⁻¹	53	88 ± 7 (< 0.0001)	-112 ± 13 (< 0.0001)	36 ± 6 (< 0.0001)	0.91 (0.90)	247 (< 0.0001)	7.39	7.17	7.53
log <i>BCF</i> (peces)	66	0.5 ± 0.5 (0.0324)	-1.1 ± 0.9 (0.0173)	1.3 ± 0.4 (< 0.0001)	0.78 (0.77)	112 (< 0.0001)	0.499	0.488	0.512

^a Los detalles acerca de los parámetros estadísticos se muestran en el apartado III.5.

^b El significado de las abreviaturas utilizadas se muestra en Tabla VIII.1.

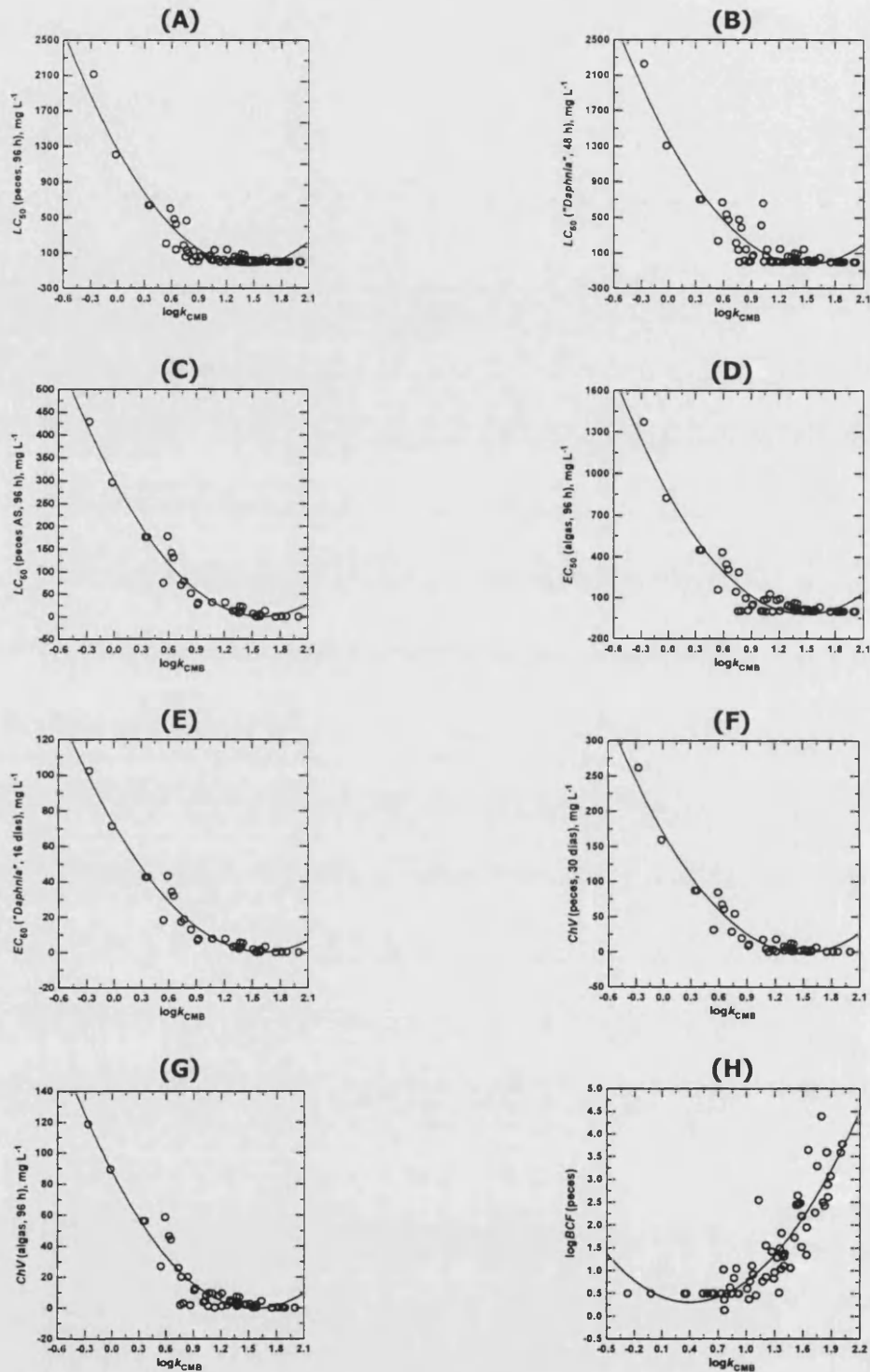


Figura VIII.2.- Relaciones parámetros de ecotoxicidad-datos de retención en una fase móvil de Brij35 0.06 M para los contaminantes orgánicos: **(A)** LC_{50} in en peces tras 96 h, **(B)** LC_{50} en "Daphnia" tras 48 h, **(C)** LC_{50} en peces de agua salada tras 96 h, **(D)** EC_{50} en algas verdes tras 96 h, **(E)** EC_{50} en "Daphnia" tras 16 días, **(F)** ChV en peces tras 30 días, **(G)** ChV en algas verdes tras 96 h, **(H)** logaritmo del factor de bioconcentración en peces.

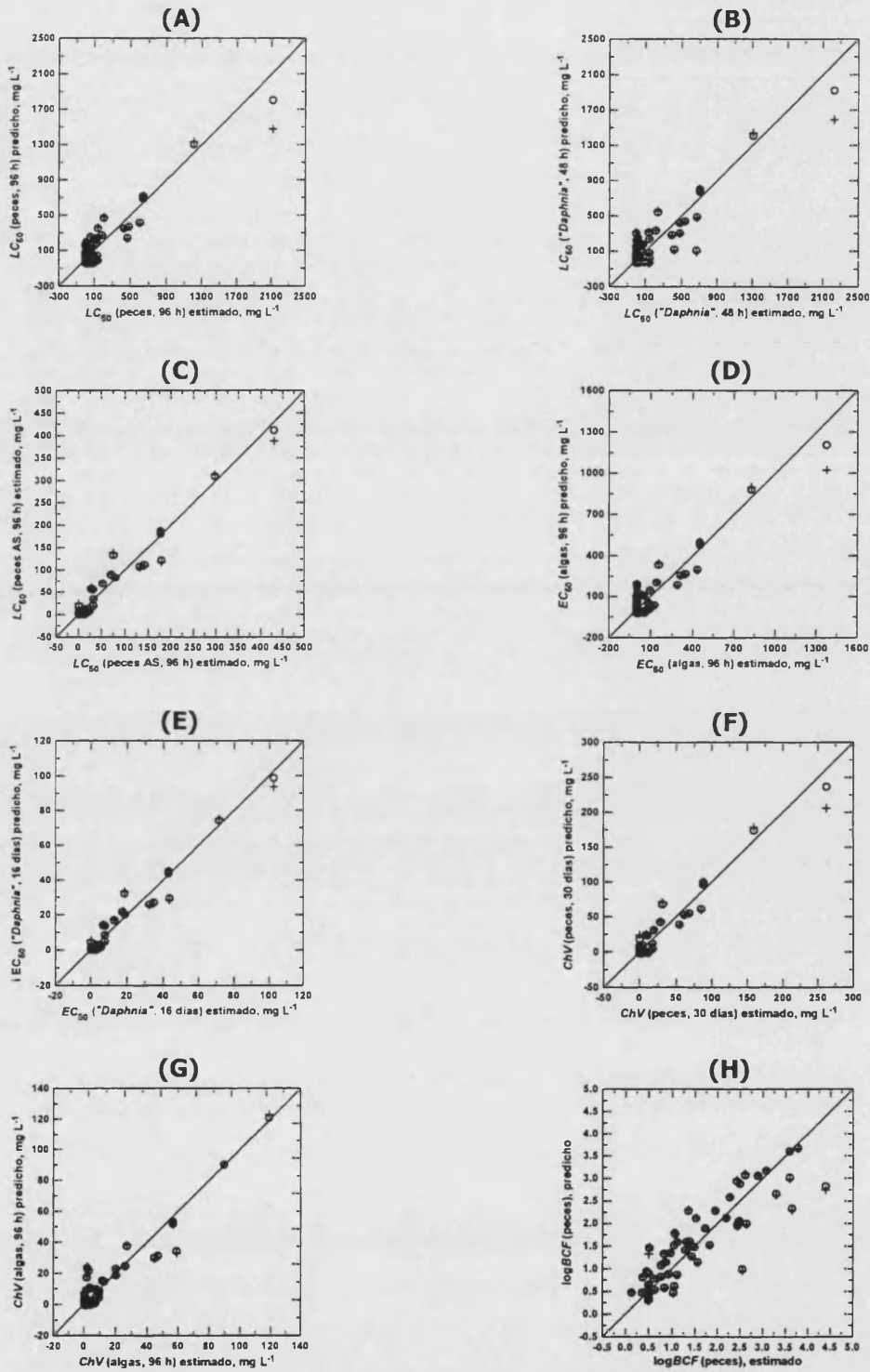


Figura VIII.3.- Gráficos de validación de los modelos QRAR: valores de los parámetros predichos con los modelos QRAR frente a los estimados con el programa ECOSAR Class Program. Se muestran los resultados predichos con el modelo (O) y en validación cruzada (+). La línea continua representa la recta teórica (pendiente = 1, ordenada en el origen = 0). Los detalles se muestran en la Figura VIII.2.

No obstante, se debe considerar que se han seleccionado modelos parabólicos por simplicidad y comodidad matemática y, como se observa en la Figura VIII.2, el ajuste de dichos modelos a los datos extremos (valores de $\log k_{\text{CMB}}$ elevados en el caso de los modelos QRAR para LC_{50} , EC_{50} y ChV y valores de $\log k_{\text{CMB}}$ bajos en el caso del modelo QRAR para $\log BCF$) parece un tanto artificiosa. Por tanto, la aplicabilidad de los modelos está limitada al intervalo de valores de $\log k_{\text{CMB}}$ estudiado y se debería tener precaución con las predicciones realizadas por extrapolación y en las regiones extremas de los modelos.

Además de la validez estadística de los modelos, el uso cualitativo de tales relaciones puede ser útil con propósitos prácticos para clasificar los compuestos en función de su ecotoxicidad. Tal y como se puede observar en la Figura VIII.2 los compuestos con valores de $\log k_{\text{CMB}}$ superiores a 1 en una fase móvil de Brij35 0.06 M a pH 7.4 son los más tóxicos y persistentes, por tanto, los que pueden presentar a corto y a largo plazo mayores problemas en el ecosistema acuático y previsiblemente para la salud humana.

VIII.3.3.- Comparación con los modelos QSAR clásicos

Con el fin de comparar las estrategias QRAR y QSAR, de acuerdo con los resultados del PCA, se construyeron los modelos QSAR para los parámetros ecotoxicológicos utilizando $\log D$ como variable independiente. Puesto que los valores de $\log D$ no se pudieron calcular para todos los compuestos ya que no se encontró en la bibliografía los valores del logaritmo de las constantes de protonación de todos los compuestos, se rehicieron los modelos QRAR utilizando los mismos compuestos que en los modelos QSAR. Para el modelo del parámetro $\log BCF$ los modelos QSAR se construyeron utilizando $\log P$ como variable independiente.

En la Tabla VIII.4 se resume el análisis estadístico de los modelos obtenidos con ambas estrategias. Como se puede observar, los modelos QRAR nuevos fueron estadísticamente similares a los obtenidos previamente con todos los datos (Tabla VIII.3), lo que indica la robustez de los mismos. Por otro lado, los parámetros estadísticos obtenidos para los modelos QRAR, a excepción del correspondiente al factor de bioconcentración, fueron mejores que los correspondientes a los modelos QSAR. Adicionalmente, cuando se realizaron las representaciones parámetro ecotoxicológico – $\log D$ se observaron diferentes grupos de compuestos que seguían tendencias diferentes lo que podría indicar que al igual que la variable $\log P$, se obtienen diferentes modelos QSAR- $\log D$ para cada familia de compuestos o clase de compuestos como se denomina en el paquete informático EPI Suite™.

Tabla VIII.4.- Análisis estadístico de los modelos QRAR y QSAR: parámetro ecotoxicológico = $b_0 + b_1 x + b_2 x^2$ ^a.

Parámetro ecotoxicológico ^b	<i>n</i>	Variable independiente (<i>x</i>)	$b_0 \pm ts_{b_0}$ (<i>p</i>)	$b_1 \pm ts_{b_1}$ (<i>p</i>)	$b_2 \pm ts_{b_2}$ (<i>p</i>)	r^2 (<i>r</i> ²)	<i>F</i> (<i>p</i>)	<i>s_{y/x}</i>	<i>RMSEC</i>	<i>RMSECV</i>
<i>LC</i> ₅₀ (peces, 96 h), mg L ⁻¹	58	log <i>k</i> _{CMB}	1050 ± 140 (<i>< 0.0001</i>)	-1400 ± 200 (<i>< 0.0001</i>)	480 ± 100 (<i>< 0.0001</i>)	0.80 (0.79)	109 (<i>< 0.0001</i>)	90.0	87.6	103
		log <i>D</i>	190 ± 50 (<i>< 0.0001</i>)	-100 ± 30 (<i>< 0.0001</i>)	13 ± 6 (<i>< 0.0001</i>)	0.56 (0.54)	34.7 (<i>< 0.0001</i>)	133	130	157
<i>LC</i> ₅₀ ("Daphnia", 48 h), mg L ⁻¹	52	log <i>k</i> _{CMB}	1200 ± 200 (<i>< 0.0001</i>)	-1500 ± 400 (<i>< 0.0001</i>)	470 ± 160 (<i>< 0.0001</i>)	0.69 (0.67)	53.7 (<i>< 0.0001</i>)	139	135	149
		log <i>D</i>	240 ± 80 (<i>< 0.0001</i>)	-110 ± 40 (<i>< 0.0001</i>)	13 ± 9 (0.0082)	0.45 (0.43)	20.3 (<i>< 0.0001</i>)	184	179	209
<i>LC</i> ₅₀ (peces AS, 96 h), mg L ⁻¹	27	log <i>k</i> _{CMB}	290 ± 40 (<i>< 0.0001</i>)	-350 ± 70 (<i>< 0.0001</i>)	110 ± 30 (<i>< 0.0001</i>)	0.91 (0.90)	116 (<i>< 0.0001</i>)	74.0	20.7	23.0
		log <i>D</i>	70 ± 20 (<i>< 0.0001</i>)	-33 ± 8 (<i>< 0.0001</i>)	4 ± 3 (0.0025)	0.76 (0.74)	37.9 (<i>< 0.0001</i>)	89.8	33.1	42.1
<i>EC</i> ₅₀ (algas, 96 h), mg L ⁻¹	48	log <i>k</i> _{CMB}	740 ± 100 (<i>< 0.0001</i>)	-970 ± 180 (<i>< 0.0001</i>)	310 ± 80 (<i>< 0.0001</i>)	0.82 (0.81)	99.4 (<i>< 0.0001</i>)	64.6	62.5	71.3
		log <i>D</i>	160 ± 40 (<i>< 0.0001</i>)	-84 ± 18 (<i>< 0.0001</i>)	11 ± 4 (<i>< 0.0001</i>)	0.69 (0.68)	51.0 (<i>< 0.0001</i>)	83.1	80.5	99.1
<i>EC</i> ₅₀ ("Daphnia", 16 días), mg L ⁻¹	27	log <i>k</i> _{CMB}	69 ± 9 (<i>< 0.0001</i>)	-84 ± 17 (<i>< 0.0001</i>)	25 ± 8 (<i>< 0.0001</i>)	0.91 (0.90)	117 (<i>< 0.0001</i>)	5.27	4.97	5.52
		log <i>D</i>	16 ± 5 (<i>< 0.0001</i>)	-8 ± 2 (<i>< 0.0001</i>)	1.02 ± 0.6 (0.0023)	0.76 (0.75)	39.0 (<i>< 0.0001</i>)	8.38	7.90	10.0
<i>ChV</i> (peces, 30 días), mg L ⁻¹	36	log <i>k</i> _{CMB}	151 ± 18 (<i>< 0.0001</i>)	-190 ± 30 (<i>< 0.0001</i>)	63 ± 15 (<i>< 0.0001</i>)	0.89 (0.88)	132 (<i>< 0.0001</i>)	11.0	10.5	11.9
		log <i>D</i>	30 ± 9 (<i>< 0.0001</i>)	-17 ± 4 (<i>< 0.0001</i>)	2.4 ± 1.2 (0.0003)	0.70 (0.68)	38.9 (<i>< 0.0001</i>)	18.1	17.3	21.9
<i>ChV</i> (algas, 96 h), mg L ⁻¹	47	log <i>k</i> _{CMB}	89 ± 12 (<i>< 0.0001</i>)	-110 ± 20 (<i>< 0.0001</i>)	36 ± 9 (<i>< 0.0001</i>)	0.84 (0.83)	116 (<i>< 0.0001</i>)	7.11	6.88	7.42
		log <i>D</i>	21 ± 3 (<i>< 0.0001</i>)	-10.8 ± 1.6 (<i>< 0.0001</i>)	1.4 ± 0.4 (<i>< 0.0001</i>)	0.82 (0.82)	103 (<i>< 0.0001</i>)	7.46	7.22	8.50
log <i>BCF</i> (peces)	66	log <i>P</i>	0.8 ± 0.3 (<i>< 0.0001</i>)	0.74 ± 0.08 (<i>< 0.0001</i>)	-	0.84 (0.84)	338 (<i>< 0.0001</i>)	0.422	0.415	0.427

^a Los detalles acerca de los parámetros estadísticos se muestran en el apartado III.5.

^b El significado de las abreviaturas utilizadas se muestra en Tabla VIII.1.

El modelo QSAR basado en $\log P$ para el factor de bioconcentración, $\log BCF$, fue ligeramente mejor que el correspondiente modelo QRAR. Además, la relación $\log BCF - \log P$ fue lineal en contraste con la relación parabólica $\log BCF - \log k_{CMB}$. La existencia de relaciones lineales $\log BCF - \log P$ se ha descrito previamente en la bibliografía para diferentes grupos de compuestos (*Rand G.M., 1995*); sin embargo, se ha observado que estas relaciones tienden a convertirse en no lineales para compuestos con $\log P < 2$ y $\log P > 6$, porque se acumulan más y menos, respectivamente, de lo esperado. Por tanto una relación no lineal como en el modelo QRAR podría ser más realista que la obtenida con $\log P$.

VIII.4.- Conclusiones

El conocimiento de la ecotoxicidad de xenobióticos es necesario para la evaluación de su impacto ambiental y su clasificación en función de su riesgo potencial tanto para el medio ambiente como para la salud humana. En este Capítulo se estudian las relaciones entre la retención de 66 contaminantes orgánicos en cromatografía micelar de bio-reparto y varios parámetros de ecotoxicidad estimados con el paquete informático EPI Suite™ desarrollado y utilizado por la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (EPA). Las buenas correlaciones obtenidas ponen de manifiesto que los modelos QRAR desarrollados con CMB son una herramienta "*in vitro*" al menos tan útil como el programa EPI Suite™ para la evaluación de la ecotoxicidad de los contaminantes orgánicos estudiados.

Una ventaja del uso de los modelos QRAR-CMB frente a los modelos QSAR- $\log P$ utilizados por el programa EPI Suite™ y QSAR- $\log D$ es que una única variable, el logaritmo del factor de retención en CMB, es capaz de describir y predecir diferentes parámetros ecotoxicológicos para compuestos pertenecientes a diferentes familias mientras que se requieren modelos QSAR basados en $\log P$ o en $\log D$ diferentes en función de la familia o clase química considerada.

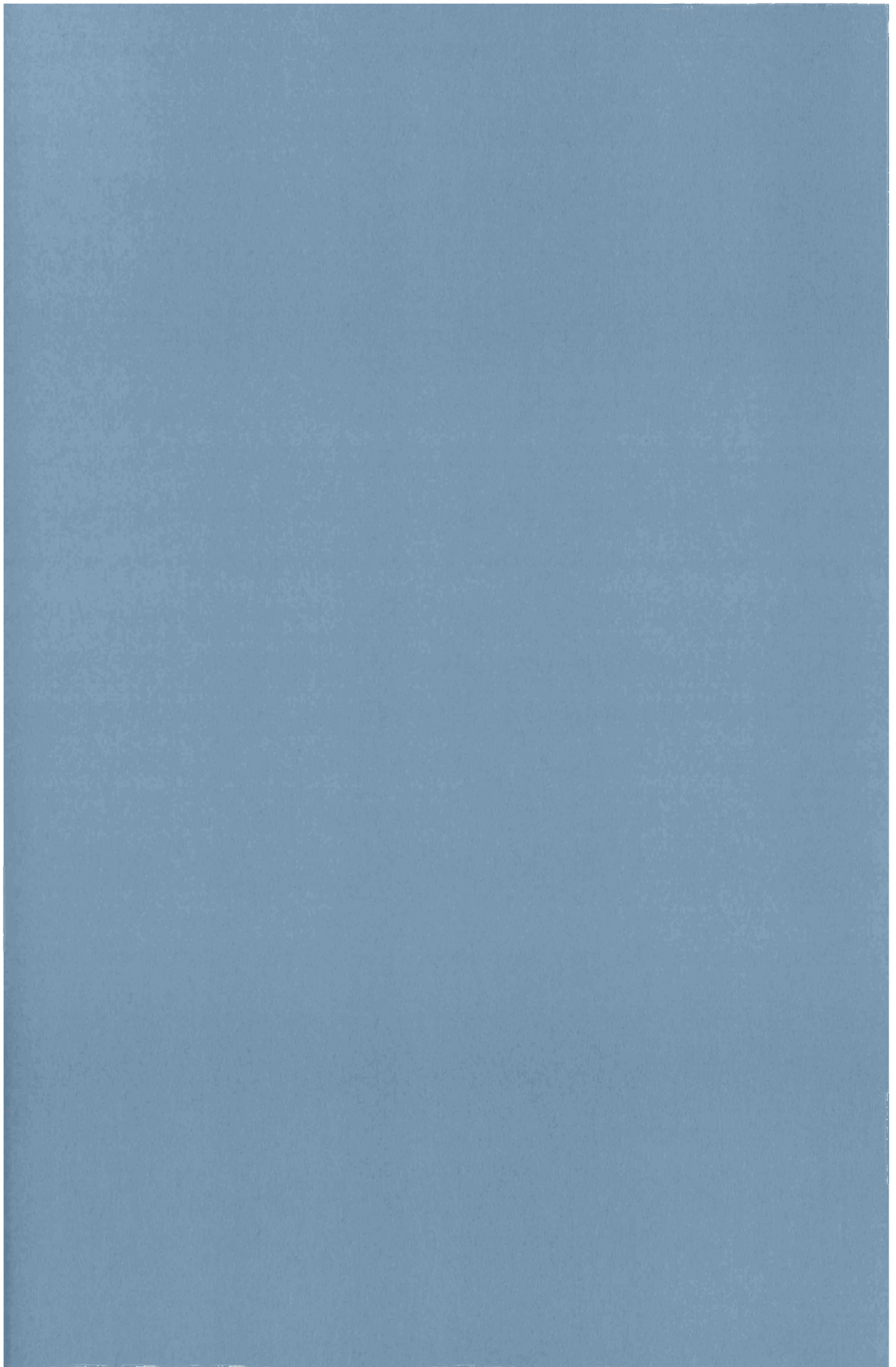
La estrategia propuesta en este Capítulo, referente al uso de la retención en CMB como variable de predicción en modelos QRARs, puede ser una metodología rápida, sencilla y económica para su utilización como alternativa o apoyo al uso de animales de experimentación para la predicción de la ecotoxicidad de nuevos compuestos orgánicos o al menos una herramienta cualitativa para la evaluación de su ecotoxicidad potencial.

CAPÍTULO IX

Relaciones Cuantitativas Actividad-Retención en Cromatografía Micelar de Bio-reparto

III.- Ecotoxicidad de Fenoxiácidos. Comparación con Cromatografía Electrocinética Micelar

IX.1.- Introducción	247
IX.2.- Experimental y datos	248
IX.2.1.- Experimental	248
IX.2.2.- Datos	249
IX.2.3.- Capacidad de descripción y predicción de los modelos	249
IX.3.- Resultados y discusión	250
IX.3.1.- Comportamiento de retención de fenoxiácidos en MEKC y CMB.....	250
IX.3.2.- Relaciones ecotoxicidad-retención	253
IX.3.3.- Modelos MEKC-QRAR <i>versus</i> CMB-QRAR de ecotoxicidad de fenoxiácidos	263
IX.4.-Conclusiones	265



IX.1.- Introducción

En el Capítulo anterior se evaluó la potencialidad de la cromatografía micelar de bio-reparto (CMB) en el desarrollo de modelos retención-actividad (QRAR) para la descripción y la predicción de la ecotoxicidad de una serie muy amplia y variada de xenobióticos. En este Capítulo se pretende estudiar las posibilidades, ventajas e inconvenientes de la cromatografía electrocinética micelar (MEKC) para llevar a cabo este tipo de estudios.

La cromatografía electrocinética micelar es una modalidad de cromatografía electrocinética en la que se utilizan disoluciones micelares como tampón electroforético. Las micelas actúan como pseudo-fases estacionarias, de modo que la migración de un analito en MEKC viene determinada por su movilidad electroforética al aplicar un campo eléctrico y por su distribución o reparto entre la fase acuosa y la micela. Este último hecho permite la separación no sólo de solutos iónicos sino también de solutos neutros cuando se utilizan disoluciones micelares de surfactantes iónicos (apartados I.4.4 y I.4.4.1).

Entre las ventajas del uso de la cromatografía electrocinética frente a la cromatografía líquida cabe destacar el menor tiempo de análisis, las mayores eficacias de los picos electroforéticos y el menor consumo de muestra y de reactivos. Además, la ausencia de una fase estacionaria sólida suprime los problemas asociados a la misma y le confiere una mayor versatilidad. Sin embargo, como principal inconveniente cabe destacar el limitado intervalo de pH de trabajo con capilares de sílice fundida convencionales y la menor sensibilidad con detectores UV-visible convencionales.

Los parámetros electroforéticos obtenidos en distintas modalidades de cromatografía electrocinética se han utilizado para la construcción de modelos retención-actividad (QRAR), también denominados en este caso relaciones cuantitativas migración-actividad (QMAR). Sin embargo, el número de publicaciones existentes es muy reducido (apartado I.5.5).

En este Capítulo se estudia la posibilidad de utilizar los parámetros de migración obtenidos en MEKC con el surfactante Brij35 como sistema "*in vitro*" para la evaluación de la ecotoxicidad de herbicidas fenoxiácidos. Los modelos QMAR obtenidos se comparan con los correspondientes modelos QRAR obtenidos con CMB en términos de capacidad de descripción y de predicción.

IX.2.- Experimental y datos

IX.2.1.- Experimental

Las experiencias realizadas utilizando cromatografía electrocinética micelar se realizaron gracias a una colaboración de la Profesora Yolanda Martín Biosca con el grupo de investigación dirigido por la Profesora María Luisa Marina Alegre del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Alcalá.

La preparación de las fases móviles, disoluciones de tampón electroforético y de las disoluciones de los analitos, así como la longitud de onda de detección se indican en el Capítulo III. En el presente apartado sólo se enumeran detalles concretos no especificados en dicho Capítulo:

- **Fases móviles ensayadas:** disoluciones de Brij35 0.02, 0.04 y 0.06M ajustadas a pH 7.0 con tampón fosfato 0.05 M.
- **Fase estacionaria:** Kromasil C₁₈ ($\alpha_p = 5\mu\text{m}$; $L = 150\text{ mm}$; $\alpha_c = 4.6\text{ mm}$) (Scharlab, S.L., La Jota, Barcelona, España).
- **Tampones electroforéticos:** disoluciones de Brij35 0.005, 0.01 y 0.02 M ajustadas a pH 7.0 con tampón fosfato 0.05 M para las experiencias en cromatografía electrocinética micelar y tampón fosfato 0.05 M (pH = 7.0) para las experiencias en electroforesis capilar zonal.
- **Capilar:** sílice fundida (diámetro interno = 50 μm ; diámetro externo = 375 μm , longitud efectiva = 50 cm; longitud total = 58.5 cm) (Polymicro Technologies, Fénix, Arizona, EE.UU.).
- **Configuración del cromatógrafo y condiciones de trabajo:**
 - Sistema de inyección: válvula de inyección manual Rheodyne (Cotati, California, EE.UU.) con un bucle de 20 μL .
 - Equipo sin compartimento termostatzado para columnas. Las experiencias se realizaron a temperatura ambiente.
 - Flujo de la fase móvil: 1 mL min⁻¹.
 - ChemStation HP (versión A0402, 1996).

□ **Configuración del sistema electroforético y condiciones de trabajo:**

- Sistema de inyección: inyector automático. La inyección se realizó hidrodinámicamente aplicando una presión de 30 mbar durante 2 s.
- Temperatura de separación: 25 °C.
- Voltaje aplicado: 20 kV.
- HP 3D-CE ChemStation (Revisión A. 0903 [1417], ©Agilent Technologies, 1990-2002).

□ **Cálculo de los factores de retención en CMB (k_{CMB}):** para el cálculo de los factores de retención se utilizó la ecuación III.1. El "tiempo total básico" (t_M^0) se estimó a partir de la primera perturbación que aparece en el cromatograma. Los valores de k_{CMB} utilizados en este estudio son los valores medios de inyecciones triplicadas.

□ **Cálculo de los factores de afinidad en MEKC (k_{MEKC}^*):** para el cálculo de los factores de afinidad se utilizó la ecuación III.2. Como marcador del flujo electroosmótico se utilizó metanol. Los valores de las movilidades electroforéticas utilizadas en este Capítulo son los valores medios de inyecciones triplicadas.

□ **Analitos:** 11 fenoxiácidos que se listan en la Tabla IX.1. En el Anexo II (apartado XII.2.16) se muestra la estructura, los valores bibliográficos del logaritmo de la relación de *n*-octanol/agua ($\log P$) para las formas no ionizadas de los compuestos estudiados y el logaritmo de las constantes de protonación en medio acuoso a 25 °C.

IX.2.2.- Datos

Los valores de los parámetros de ecotoxicidad se estimaron con el programa ECOSAR Class Program (versión 0.99e) desarrollado por la Agencia de Protección Medioambiental de EE.UU. ECOSAR Class Program predice la toxicidad acuática de nuevos compuestos mediante el uso de modelos QSAR (apartados III.6 y VIII.2.2). Para la obtención de los valores de los diversos parámetros de ecotoxicidad se utilizaron los valores experimentales de $\log P$.

IX.2.3.- Capacidad de descripción y predicción de los modelos

En el presente Capítulo se utilizaron "series cortas de datos" por lo que la capacidad de descripción y predicción de los modelos se evaluó por comparación de los parámetros $RMSEC$, $RMSECV$ y $RMSECV_i$ basados en la técnica de validación cruzada "leave-one-out cross-validation" (apartado III.5).



IX.3.- Resultados y discusión

IX.3.1.- Comportamiento de retención de fenoxiácidos en MEKC y CMB

Los herbicidas fenoxiácidos estudiados son compuestos ácidos con un grupo carboxilo cuyos valores del logaritmo de la constante de protonación están comprendidos entre 1.97 para DC y 6.2 para MCPB. Estos compuestos poseen una hidrofobicidad moderada con valores de $\log P$ para las formas no ionizadas comprendidos entre 1.75 para 2-PPA y 3.80 para 2,4,5-TCPPA. Al pH de trabajo, 7.0, los fenoxiácidos presentan carga negativa con un grado de ionización la mayoría de ellos superior al 99.9 %, por tanto, es posible su separación en MEKC con disoluciones micelares del surfactante no iónico Brij35.

En la Tabla IX.1 se muestran los valores de factores de afinidad obtenidos en MEKC con tampones electroforéticos de Brij35 0.005, 0.01 y 0.02 M y los factores de retención de los fenoxiácidos obtenidos en CMB con fases móviles micelares de Brij35 0.02, 0.04, 0.06 M. En todos los casos las disoluciones micelares de Brij35 se prepararon a pH 7.0. La Figura IX.1 muestra el efecto de la concentración de Brij35 sobre la retención en MEKC y CMB. Como cabía esperar, el orden de elución de los compuestos en MEKC fue inverso al obtenido en CMB. Los compuestos más hidrófobos (2,4,5-TCPPA, MCPB y 2,4,5-T) presentaron los mayores tiempos de retención en CMB, mientras que en MEKC estos compuestos exhibieron los menores tiempos de migración. Los resultados obtenidos en MEKC pueden explicarse teniendo en cuenta que los compuestos más hidrófobos son los que presentan interacciones más intensas con las micelas de Brij35 migrando cerca de ellas y éstas migran junto al flujo electroosmótico ya que el Brij35 es un surfactante no iónico. Este comportamiento de retención en MEKC y CMB, observado para todas las concentraciones de Brij35 ensayadas, indica que la hidrofobicidad juega un papel importante tanto en las interacciones soluto-fase estacionaria como en las interacciones soluto-micela.

Al aumentar la concentración de Brij35 (Figura IX.1) se observó una disminución del tiempo de retención en CMB y del tiempo de migración en MEKC, lo que implica en el último caso un aumento del factor de afinidad. Para los compuestos más hidrófobos (p. ej., MCPB y 2,4,5-TCPPA) se obtuvieron grandes cambios en los factores de retención y afinidad a medida que aumentó la concentración de Brij35. Para los compuestos con menor hidrofobicidad (p. ej., 2-PPA y DC) los factores de retención y afinidad apenas se modificaron. Para explicar este comportamiento hay que tener en cuenta que la retención de un compuesto en CMB depende del balance de las interacciones soluto-fase estacionaria y soluto-micela; mientras que el factor de afinidad en MEKC mide exclusivamente la interacción soluto-micela. Así, al aumentar la concentración de micelas aumenta la interacción soluto-micela lo que provoca siempre una disminución de la retención en CMB y un aumento de la movilidad en MEKC. Este efecto es más acusado para los compuestos más hidrófobos.

Tabla IX.1.- Media y desviación estándar de los valores de los parámetros electroforéticos y cromatográficos de fenoxiácidos obtenidos en medios micelares de Brij35.

Técnica de separación [Brij35], M	CZE ^a		MEKC				CMB			
	0	0.005	0.01	0.02	0.02	0.04	0.06	0.02	0.04	0.06
Nombre sistemático del compuesto (Nombre común)	$\mu_{ep}^z \pm s^b$	$\mu_{ep}^m \pm s^c$	\tilde{K}_{MEKC}^d	$\mu_{ep}^m \pm s^c$	\tilde{K}_{MEKC}^d	$\mu_{ep}^m \pm s^c$	\tilde{K}_{MEKC}^d	$k_{CMB} \pm s^e$	$k_{CMB} \pm s^e$	$k_{CMB} \pm s^e$
Ácido (2,4,5-triclorofenoxi)acético (2,4,5-T)	-14.33 ± 0.10	-7.78 ± 0.05	0.842	-5.53 ± 0.04	1.59	-3.263 ± 0.014	3.39	15.61 ± 0.10	9.59 ± 0.03	6.93 ± 0.04
Ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propiónico (2,4,5-TCPPA)	-13.48 ± 0.15	-7.04 ± 0.07	0.914	-4.96 ± 0.05	1.72	-2.87 ± 0.07	3.70	18.26 ± 0.09	11.25 ± 0.07	8.149 ± 0.017
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	-15.07 ± 0.09	-11.39 ± 0.05	0.323	-9.56 ± 0.06	0.577	-6.88 ± 0.05	1.19	8.12 ± 0.03	5.83 ± 0.04	4.473 ± 0.014
Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)propiónico (2,4-DCPPA)	-14.09 ± 0.08	-10.28 ± 0.05	0.370	-8.48 ± 0.06	0.662	-5.98 ± 0.02	1.35	10.01 ± 0.03	7.09 ± 0.02	5.42 ± 0.03
Ácido 2-fenoxipropiónico (2-PPA)	-15.46 ± 0.07	-14.39 ± 0.03	0.074	-14.108 ± 0.007	0.096	-13.17 ± 0.04	0.174	0.582 ± 0.008	0.579 ± 0.009	0.536 ± 0.009
Ácido 2-(3-clorofenoxi)propiónico (3-CPPA)	-14.65 ± 0.04	-12.93 ± 0.02	0.133	-12.11 ± 0.04	0.210	-10.39 ± 0.04	0.410	2.912 ± 0.014	2.5769 ± 0.0006	2.208 ± 0.008
Ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropiónico (MCP)	-13.89 ± 0.08	-11.951 ± 0.018	0.162	-10.97 ± 0.03	0.266	-9.04 ± 0.10	0.537	4.81 ± 0.03	4.09 ± 0.02	3.468 ± 0.013
Ácido 2-(4-clorofenoxi)propiónico (4-CPPA)	-14.67 ± 0.06	-12.848 ± 0.018	0.142	-11.97 ± 0.02	0.225	-10.16 ± 0.04	0.444	3.098 ± 0.018	2.678 ± 0.012	2.3083 ± 0.0011
Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (DC)	-15.04 ± 0.09	-13.877 ± 0.014	0.084	-13.47 ± 0.02	0.116	-12.373 ± 0.008	0.215	1.077 ± 0.012	1.037 ± 0.013	0.9529 ± 0.0016
Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético (MCPA)	-15.08 ± 0.06	-11.39 ± 0.05	0.324	-9.56 ± 0.06	0.578	-6.88 ± 0.05	1.19	7.68 ± 0.05	5.532 ± 0.016	4.28 ± 0.02
Ácido 4-(2-metil-4-clorofenoxi)butírico (MCPB)	-13.30 ± 0.18	-6.21 ± 0.07	1.14	-4.16 ± 0.05	2.19	-2.30 ± 0.03	4.79	18.68 ± 0.05	11.758 ± 0.018	8.34 ± 0.03

^a Electroforesis capilar zonal

^b Movilidad electroforética (efectiva) obtenida con CZE utilizando tampón fosfato 0.05 M a pH 7.0. Valores expresados en $\text{cm}^2 \text{ kV}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

^c Movilidad electroforética (efectiva) obtenida con MEKC utilizando tampón fosfato 0.05 M a pH 7.0 + Brij35. Valores expresados en $\text{cm}^2 \text{ kV}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

^d Factor de afinidad en MEKC obtenido con la ecuación III.2.

^e Factor de retención en CMB obtenido con la ecuación III.1.

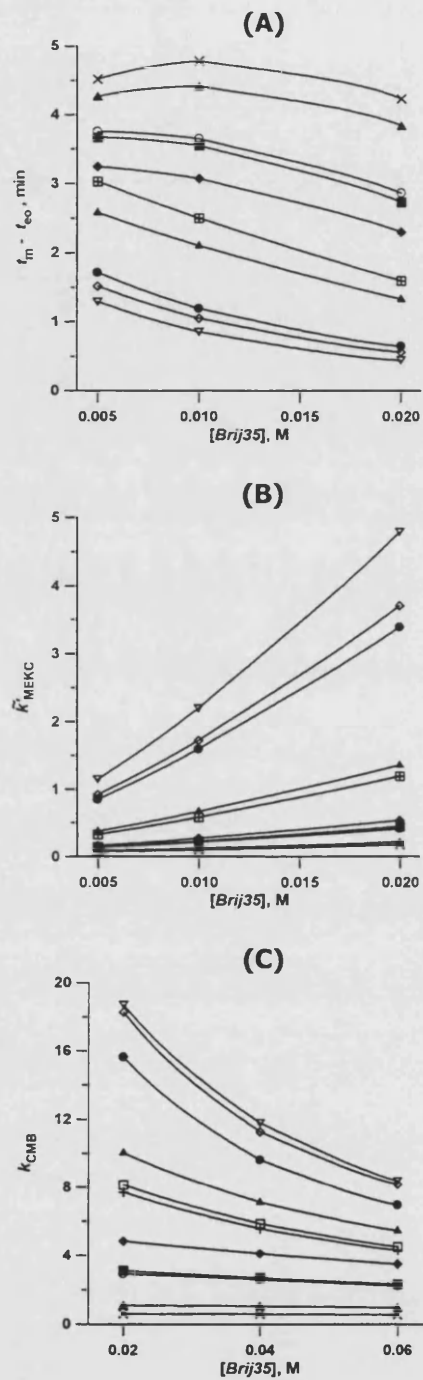


Figura IX.1.- Efecto de la concentración de Brij35 en el sistema de separación sobre **(A)** la diferencia entre el tiempo de migración del analito (t_m) y el "tiempo básico electroosmótico" (t_{e0}), **(B)** el factor de afinidad en MEKC y **(C)** el factor de retención en CMB de fenoxiácidos: (●) 2,4,5-T; (◊) 2,4,5-TCPPA; (◻) 2,4-D; (Δ) 2,4-DCPPA; (x) 2-PPA; (○) 3-CPPA; (◆) MCPP; (■) 4-CPPA; (▲) DC; (+) MCPA y (▼) MCPB.

IX.3.2.- Relaciones ecotoxicidad-retención

El interés en la evaluación de la ecotoxicidad de los fenoxiácidos radica en que son herbicidas ampliamente usados a escala mundial. Desde un punto de vista histórico, su importancia estriba en que 2,4-D y MCPA, destacados componentes de este grupo, fueron los primeros herbicidas orgánicos desarrollados (*Puricelli E.C.M. y Leguizamón E.S., 2002*). Los fenoxiácidos reciben también el nombre de herbicidas hormonales por su similitud con las hormonas de crecimiento vegetal auxinas (cuyo ejemplo más común es el ácido indolacético), de modo que a dosis pequeñas estimulan el crecimiento vegetal, pero a dosis superiores actúan como antihormonas y manifiestan fitotoxicidad (*Pramauro E., 1990; Repetto M. y col., 1995-b*).

Como se ha comentado en el Capítulo VIII, para evaluar los efectos toxicológicos de los xenobióticos, usualmente se determina la toxicidad aguda, subcrónica y crónica mediante una serie de ensayos en diferentes organismos. Puesto que las propiedades moleculares de los compuestos determinan su comportamiento biológico y consecuentemente su toxicidad, y también la retención en CMB y MEKC, es de esperar que existan relaciones toxicidad-retención.

En la Tabla IX.2 se muestran los valores de algunos parámetros de toxicidad acuática obtenidos con el programa informático ECOSAR Class Program para fenoxiácidos:

- Concentración letal mediana, LC_{50} : concentración de fenoxiácido en el medio acuático que produce la muerte al 50% de una población de peces de agua dulce tras un periodo de exposición de 96 h (LC_{50} (peces, 96 h)) y de 14 días (LC_{50} (peces, 14 días)), una población de peces de agua salada tras un periodo de exposición de 96 h (LC_{50} (peces AS, 96 h)), de "*Daphnia*" tras un periodo de exposición de 48 h (LC_{50} ("*Daphnia*", 48 h)) y de gambas de la especie "*Mysid*" tras un periodo de exposición de 96 h (LC_{50} (gambas, 96 h)).
- Concentración mediana efectiva, EC_{50} : concentración de fenoxiácido en el medio acuático que produce un efecto tóxico dado al 50% de una población de algas verdes tras un periodo de exposición de 96 h (EC_{50} (algas, 96 h)) y de "*Daphnia*" tras un periodo de exposición de 16 días (EC_{50} ("*Daphnia*", 16 días)).
- Los valores de toxicidad crónica (ChV) en peces tras un periodo de exposición de 30 días (ChV (peces, 30 días)) y en algas verdes tras un periodo de exposición de 96 h (ChV (algas, 96 h)).

Tabla IX.2.- Valores de los parámetros de ecotoxicidad ($\times 10^{-3}$ g L⁻¹) para los fenoxiácidos estudiados.

Compuesto	LC ₅₀ (peces, 96 h) ^a	LC ₅₀ (peces, 14 días) ^b	LC ₅₀ (peces AS, 96 h) ^c	LC ₅₀ (<i>"Daphnia"</i> , 48 h) ^d	LC ₅₀ (gambas, 96 h) ^e	EC ₅₀ (algas, 96 h) ^f	EC ₅₀ (<i>"Daphnia"</i> , 16 días) ^g	ChV (peces, 30 días) ^h	ChV (algas, 96 h) ⁱ
2,4,5-T	111	248	48	130	13	88	12	18	19
2,4,5-TCPPA	41	98	22	49	3	34	6	7	10
2,4-D	284	585	96	322	46	211	24	42	34
2,4-DCPPA	79	179	36	93	8	63	9	13	14
2-PPA	2116	3684	430	2229	730	1373	102	262	119
3-CPPA	639	1232	177	704	140	450	43	88	56
MCP	138	299	55	160	18	107	13	21	20
4-CPPA	760	1447	202	832	176	530	49	103	63
DC	1040	1948	264	1131	258	716	64	139	81
MCPA	99	220	42	116	12	78	10	16	16
MCPB	307	630	103	347	50	227	25	45	36

^a LC₅₀ en peces tras un periodo de exposición de 96 h.

^b LC₅₀ en peces tras 14 días de exposición.

^c LC₅₀ en peces de agua salada tras un periodo de exposición de 96 h.

^d LC₅₀ en *"Daphnia"* tras un periodo de exposición de 48 h.

^e LC₅₀ en gambas de la especie *"Mysid"* tras un periodo de exposición de 96 h.

^f EC₅₀ en algas verdes tras un periodo de exposición 96 h.

^g EC₅₀ en *"Daphnia"* tras un periodo de exposición de 16 días.

^h ChV en peces tras un periodo de exposición 30 días.

ⁱ ChV en algas verdes tras un periodo de exposición 96 h.

En las Figuras IX.2 y IX.3 se muestran las relaciones obtenidas entre los diferentes parámetros de toxicidad y los factores de afinidad en MEKC y los factores de retención en CMB, respectivamente, obtenidos con disoluciones micelares de Brij35 0.02 M que contienen tampón fosfato 0.05 M a pH 7.0. Con el fin de obtener modelos descriptivos de dichas relaciones los datos se ajustaron a los modelos polinómicos del tipo:

$$\text{Parámetro de ecotoxicidad} = b_0 + b_1 \log \tilde{\kappa}'_{\text{MEKC}} + b_2 (\log \tilde{\kappa}'_{\text{MEKC}})^2 \quad (\text{IX.1})$$

$$\text{Parámetro de ecotoxicidad} = b_0 + b_1 \log k_{\text{CMB}} + b_2 (\log k_{\text{CMB}})^2 \quad (\text{IX.2})$$

Como se puede observar, en todos los casos la adecuación de los modelos polinómicos a los datos fue buena y los residuos (figuras no mostradas) de los modelos presentaron una distribución aleatoria y fueron estadísticamente igual a cero.

En las Tablas IX.3 y IX.4 se muestra el análisis estadístico y las propiedades de predicción correspondientes a los modelos QRAR obtenidos. Para todos los modelos, los valores del estadístico p fueron menores de 0.05, lo que indica que las relaciones entre los parámetros ecotoxicológicos y los logaritmos de los factores de afinidad y de retención en medio micelar de Brij35 fueron estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95%. Los coeficientes de determinación, r^2 , de los modelos estuvieron comprendidos entre 0.81 y 0.89 en el caso de MEKC y entre 0.90 y 0.94 en el caso de CMB. Los coeficientes de ajuste para los modelos CMB-QRAR fueron estadísticamente significativos a este nivel de confianza en todos los casos. En los modelos MEKC-QRAR el coeficiente de ajuste b_0 fue significativo para un nivel de confianza del 95% sólo para las regresiones con los parámetros LC_{50} (peces AS, 96 h), EC_{50} ("*Daphnia*", 16 días) y ChV (algas, 96 h). Por tanto, los modelos QRAR obtenidos en todos los casos describen adecuadamente los parámetros toxicológicos de los fenoxiácidos. Si bien, para el uso con fines cuantitativos de los modelos QRAR obtenidos con MEKC se deberían construir de nuevo eliminando el coeficiente de ajuste no significativo. Tras eliminar el coeficiente de ajuste b_0 , los valores de los parámetros estadísticos de los modelos MEKC-QRAR fueron similares a los obtenidos con la ecuación IX.1. Sin embargo, dichos modelos no presentaron un significado físico-químico o biológico adecuado ya que en el vértice de la parábola se predecían valores negativos de los parámetros de ecotoxicidad. Por tanto, puesto que el coeficiente b_0 es el término independiente se mantuvieron los modelos correspondientes a la ecuación IX.1.

Los valores de los parámetros estadísticos de los modelos QRAR obtenidos al utilizar como variables independientes los factores de afinidad en MEKC obtenidos con tampones electroforéticos de Brij35 0.005 y 0.01 M y los factores de retención en CMB obtenidos con fases móviles de Brij35 0.04 y 0.06 M fueron similares a los obtenidos con disoluciones micelares de Brij35 0.02 M arriba mostrados. Las únicas diferencias se observaron, como era de esperar, en los valores de los coeficientes de ajuste.

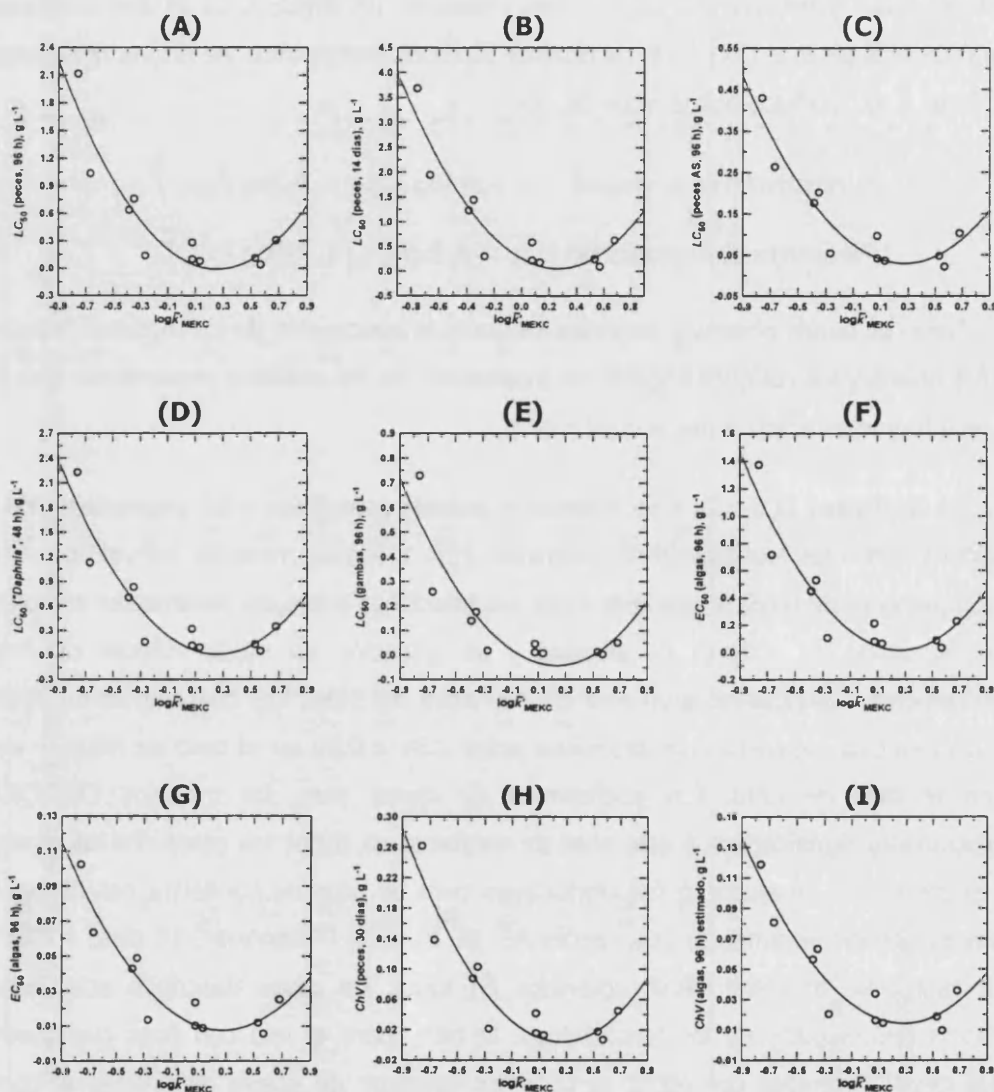


Figura IX.2.- Relaciones entre los parámetros ecotoxicológicos y los factores de afinidad obtenidos en MEKC con un tampón electroforético de Brij35 0.02 M (pH 7.0) para los fenoxiácidos. **(A)** LC_{50} en peces tras un periodo de exposición de 96 h, **(B)** LC_{50} en peces tras un periodo de exposición de 14 días, **(C)** LC_{50} en peces de agua salada tras un periodo de exposición de 96 h, **(D)** LC_{50} en "Daphnia" tras un periodo de exposición de 48 h, **(E)** LC_{50} en gambas de la especie "Mysid" tras un periodo de exposición de 96 h, **(F)** EC_{50} en algas verdes tras un periodo de exposición de 96 h, **(G)** EC_{50} en "Daphnia" tras un periodo de exposición de 16 días, **(H)** ChV en peces tras un periodo de exposición de 30 días, **(I)** ChV en algas verdes tras un periodo de exposición de 96 h. Los valores de los parámetros ecotoxicológicos están expresados en $g L^{-1}$.

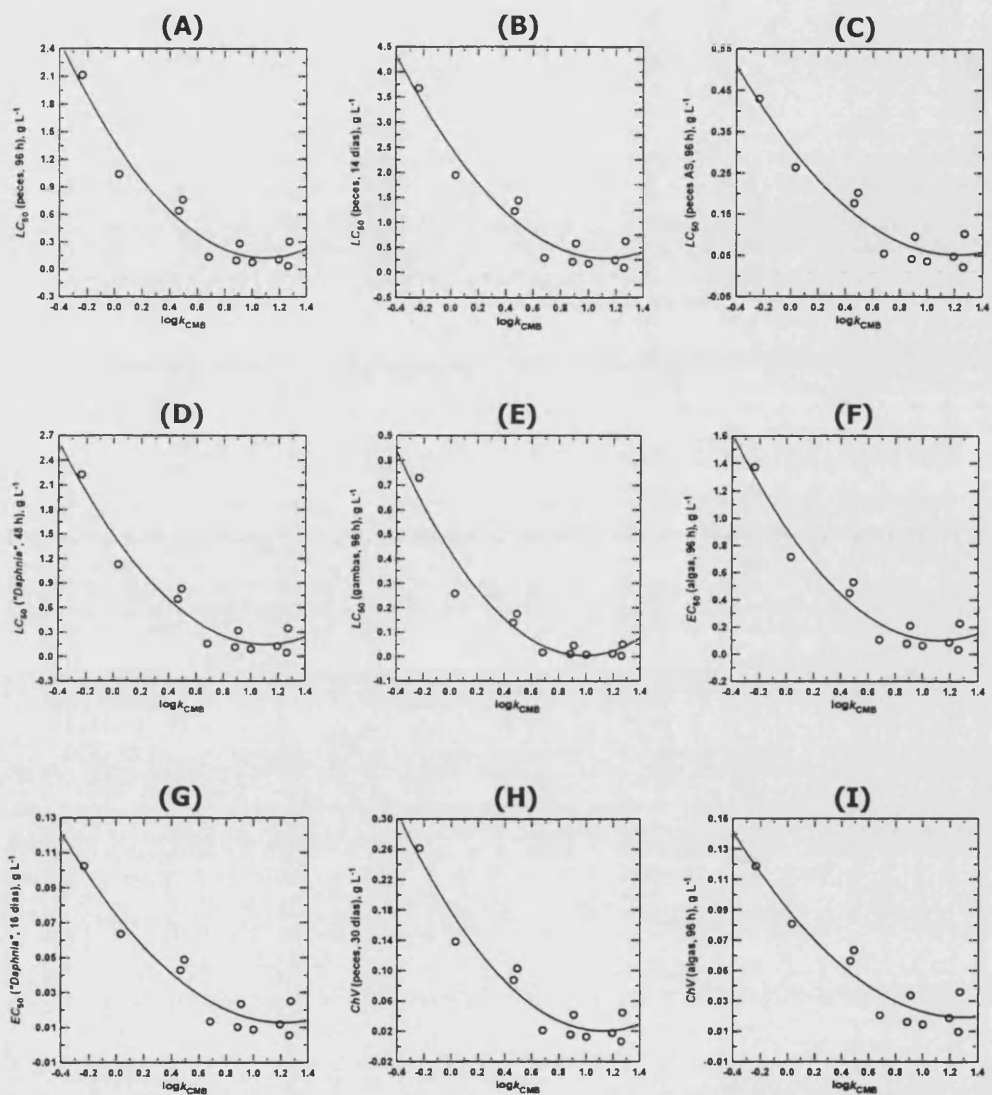


Figura IX.3.- Relaciones entre los parámetros ecotoxicológicos y los factores de retención en CMB obtenidos con una fase móvil de Brij35 0.02 M (pH 7.0) para los fenoxiácidos. Los detalles se muestran en la Figura IX.2.

Tabla IX.3.- Análisis estadístico y propiedades de predicción de los modelos QRAR obtenidos en MEKC para fenoxiácidos: parámetro de ecotoxicidad = $b_0 + b_1 (\log \tilde{K}'_{MEKC}) + b_2 (\log \tilde{K}'_{MEKC})^2$ ^a.

Parámetro de ecotoxicidad ^b , (g L ⁻¹)	$b_0 \pm ts_{b_0}$ (<i>p</i>)	$b_1 \pm ts_{b_1}$ (<i>p</i>)	$b_2 \pm ts_{b_2}$ (<i>p</i>)	r^2 (<i>r</i> ²)	<i>F</i> (<i>p</i>)	<i>s_{y/x}</i>	<i>RMSEC</i>	<i>RMSECV</i>	<i>RMSECVi</i>
<i>LC</i> ₅₀ (peces, 96 h)	0.1 ± 0.3 (0.4015) ^c	-0.9 ± 0.4 (0.0007)	1.7 ± 0.9 (0.0024)	0.87 (0.84)	27.2 (0.0003)	0.25	0.213	0.353	0.272
<i>LC</i> ₅₀ (peces, 14 días)	0.3 ± 0.4 (0.2215) ^c	-1.5 ± 0.6 (0.0005)	2.9 ± 1.5 (0.0021)	0.88 (0.85)	29.6 (0.0002)	0.42	0.357	0.573	0.463
<i>LC</i> ₅₀ (peces AS, 96 h)	0.05 ± 0.05 (0.0351)	-0.18 ± 0.07 (0.0003)	0.3 ± 0.2 (0.0019)	0.89 (0.86)	32.4 (0.0001)	0.05	0.040	0.059	0.053
<i>LC</i> ₅₀ ("Daphnia", 48 h)	0.1 ± 0.3 (0.3176) ^c	-0.9 ± 0.4 (0.0006)	1.8 ± 0.9 (0.0023)	0.88 (0.85)	28.3 (0.0003)	0.26	0.221	0.361	0.283
<i>LC</i> ₅₀ (gambas, 96 h)	-0.01 ± 0.11 (0.8360) ^c	-0.3 ± 0.2 (0.0034)	0.6 ± 0.4 (0.0006)	0.81 (0.76)	17.1 (0.0013)	0.11	0.089	0.159	0.108
<i>EC</i> ₅₀ (algas, 96 h)	0.01 ± 0.02 (0.2539) ^c	-0.6 ± 0.2 (0.0005)	1.1 ± 0.6 (0.0021)	0.88 (0.85)	29.2 (0.0002)	0.16	0.134	0.217	0.173
<i>EC</i> ₅₀ ("Daphnia", 16 días)	0.013 ± 0.012 (0.0299)	-0.04 ± 0.02 (0.0003)	0.08 ± 0.04 (0.0019)	0.89 (0.89)	32.4 (0.0001)	0.011	0.009	0.014	0.013
<i>ChV</i> (peces, 30 días)	0.02 ± 0.03 (0.2192) ^c	-0.11 ± 0.04 (0.0005)	0.21 ± 0.11 (0.0021)	0.88 (0.85)	29.6 (0.0002)	0.03	0.025	0.041	0.033
<i>ChV</i> (algas, 96 h)	0.021 ± 0.014 (0.0069)	-0.05 ± 0.02 (0.0003)	0.09 ± 0.05 (0.0023)	0.89 (0.86)	31.5 (0.0002)	0.013	0.011	0.015	0.015

^a Los detalles sobre los parámetros estadísticos se muestran en el apartado III.5.

^b Las abreviaturas se muestran en la Tabla IX.2.

^c Coeficiente de ajuste estadísticamente no significativo para un nivel de confianza del 95 %.

Tabla IX.4.- Análisis estadístico y propiedades de predicción de los modelos QRAR obtenidos en CMB para fenoxiácidos: parámetro de ecotoxicidad = b_0 + $b_1 (\log k_{CMB}) + b_2 (\log k_{CMB})^2$ ^a.

Parámetro de ecotoxicidad ^b , (g L ⁻¹)	$b_0 \pm ts_{b_0}$ (<i>p</i>)	$b_1 \pm ts_{b_1}$ (<i>p</i>)	$b_2 \pm ts_{b_2}$ (<i>p</i>)	r^2 (<i>r</i> ²)	<i>F</i> (<i>p</i>)	<i>s_{y/x}</i>	<i>RMSEC</i>	<i>RMSECV</i>	<i>RMSECVI</i>
<i>LC</i> ₅₀ (peces, 96 h)	1.4 ± 0.2 (< 0.0001)	-2.3 ± 0.7 (0.0001)	1.1 ± 0.6 (0.0028)	0.94 (0.92)	58.3 (< 0.0001)	0.18	0.151	0.251	0.205
<i>LC</i> ₅₀ (peces, 14 días)	2.5 ± 0.4 (< 0.0001)	-3.9 ± 1.2 (0.0001)	1.7 ± 1.0 (0.0045)	0.93 (0.92)	55.1 (< 0.0001)	0.32	0.270	0.414	0.360
<i>LC</i> ₅₀ (peces AS, 96 h)	0.31 ± 0.05 (< 0.0001)	-0.4 ± 0.2 (0.0003)	0.18 ± 0.13 (0.0153)	0.92 (0.90)	43.7 (< 0.0001)	0.04	0.035	0.047	0.044
<i>LC</i> ₅₀ ("Daphnia", 48 h)	1.5 ± 0.2 (< 0.0001)	-2.4 ± 0.7 (0.0001)	1.1 ± 0.6 (0.0034)	0.93 (0.92)	57.2 (< 0.0001)	0.19	0.160	0.258	0.216
<i>LC</i> ₅₀ (gambas, 96 h)	0.43 ± 0.08 (< 0.0001)	-0.8 ± 0.3 (0.0001)	0.4 ± 0.2 (0.0015)	0.93 (0.91)	50.2 (< 0.0001)	0.07	0.056	0.120	0.077
<i>EC</i> ₅₀ (algas, 96 h)	0.93 ± 0.15 (< 0.0001)	-1.5 ± 0.5 (0.0001)	0.7 ± 0.4 (0.0040)	0.93 (0.92)	55.9 (< 0.0001)	0.12	0.010	0.156	0.134
<i>EC</i> ₅₀ ("Daphnia", 16 días)	0.075 ± 0.013 (< 0.0001)	-0.10 ± 0.04 (0.0003)	0.04 ± 0.03 (0.0169)	0.91 (0.89)	42.7 (0.0001)	0.010	0.008	0.011	0.011
<i>ChV</i> (peces, 30 días)	0.18 ± 0.03 (< 0.0001)	-0.28 ± 0.09 (0.0001)	0.12 ± 0.07 (0.0045)	0.93 (0.92)	58.9 (< 0.0001)	0.02	0.019	0.029	0.026
<i>ChV</i> (algas, 96 h)	0.09 ± 0.02 (< 0.0001)	-0.11 ± 0.05 (0.0008)	0.04 ± 0.04 (0.0384)	0.90 (0.87)	34.7 (0.0001)	0.012	0.011	0.014	0.013

^a Los detalles sobre los parámetros estadísticos se muestran en el apartado III.5.

^b Las abreviaturas se muestran en la Tabla IX.2.



Tal y como se puede observar en las Tablas IX.3 y IX.4, para la mayoría de los modelos QRAR obtenidos tanto con MEKC como en CMB, los valores de los parámetros $RMSECV$ y $RMSECV_i$ fueron similares. Esto sugiere que las predicciones de los parámetros de toxicidad realizadas tanto por interpolación como por extrapolación en los modelos QRAR desarrollados deberían ser razonablemente fiables. En algunos casos los valores de $RMSECV$ fueron ligeramente mayores que los de $RMSECV_i$, especialmente en los modelos obtenidos para el parámetro LG_{50} (gambas, 96 h), lo que indica que se deben tomar precauciones con los datos de los parámetros extrapolados en estos modelos. No obstante, en tales casos la información cualitativa obtenida puede ser útil desde un punto de vista práctico. Por otro lado, en términos generales, los valores de $RMSECV$ y $RMSECV_i$ fueron similares a los correspondientes valores de $RMSEC$ lo que es una indicación cualitativa de la robustez de los modelos y de la fiabilidad de las predicciones realizadas con los mismos. Cabe señalar que los valores de los estadísticos $RMSEC$, $RMSECV$ y $RMSECV_i$ obtenidos para un determinado modelo MEKC-QRAR fueron en todos los casos mayores que los correspondientes valores obtenidos con un modelo CMB-QRAR. Este hecho indica que los factores de retención obtenidos con CMB presentan una mejor capacidad de descripción y de predicción de los parámetros de ecotoxicidad estudiados para los compuestos estudiados.

En las Figuras IX.4 y IX.5 se representan los valores de parámetros de ecotoxicidad predichos (tras el ajuste y en validación cruzada) frente a los utilizados en la construcción de los modelos QRAR en MEKC y CMB, respectivamente. Tal y como se puede observar, en general, los valores predichos tras el ajuste de los datos al modelo y en la etapa de validación cruzada son coincidentes y se distribuyen alrededor de la línea de referencia (pendiente y ordenada en el origen igual a 1 y 0, respectivamente) lo que pone de manifiesto que la capacidad de los factores de afinidad y de retención para describir y predecir la ecotoxicidad de los fenoxiácidos es satisfactoria. No obstante, en algunos modelos, especialmente en la mayoría de los modelos MEKC-QRAR y en el modelo CMB-QRAR obtenido para el parámetro LG_{50} (gambas, 96 h), se observa que las predicciones realizadas en la zona de valores altos de los parámetros de toxicidad y por extrapolación pueden ser poco fiables. Por tanto, la aplicabilidad cuantitativa de los modelos está limitada a los intervalos de valores de $\log \tilde{k}_{MEKC}$ y $\log k_{CMB}$ estudiados y se debería tener precaución con las predicciones realizadas por extrapolación y en las regiones extremas de los modelos. De todos modos, los modelos obtenidos permiten una discriminación entre los compuestos de mayor y menor toxicidad y dicha información cualitativa puede ser útil desde un punto de vista práctico para realizar un barrido rápido de la ecotoxicidad de nuevos fenoxiácidos.

Al utilizar los factores de afinidad obtenidos con los tampones electroforéticos de Brij35 0.005 y 0.01 M en MEKC y los factores de retención correspondientes a las fases móviles de Brij35 0.04 y 0.06 M en CMB se obtuvieron modelos QRAR similares en términos error de ajuste y de predicción.

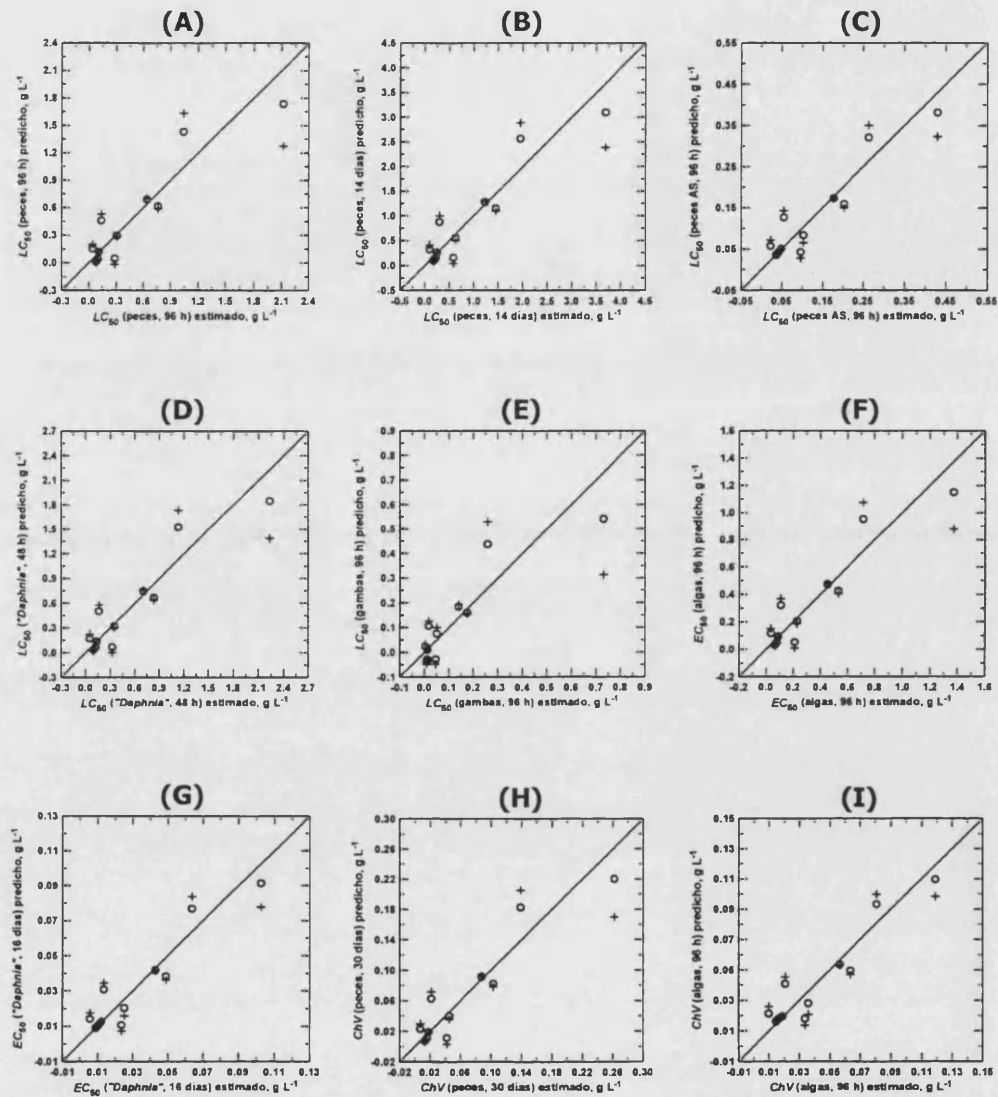


Figura IX.4.- Gráficos de validación para los modelos QRAR obtenidos con MEKC: valores de los parámetros de ecotoxicidad predichos frente a los estimados con el programa ECOSAR Class Program. Se muestran los resultados predichos tras el ajuste en los modelos (○) y los obtenidos mediante validación cruzada (+). La línea continua representa la recta teórica (pendiente = 1, ordenada en el origen = 0). Los detalles se muestran en la Figura IX.2.

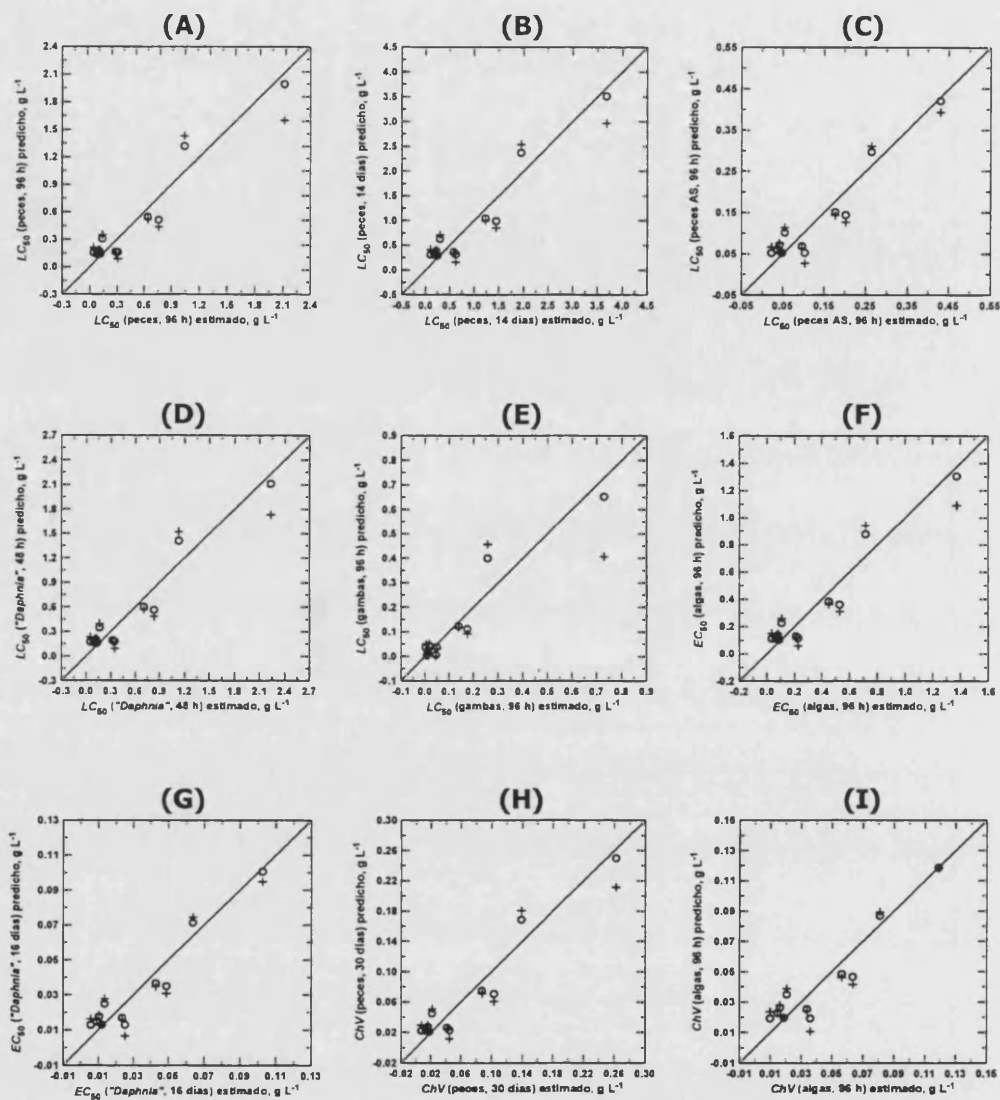


Figura IX.5.- Gráficos de validación para los modelos QRAR en CMB: valores de los parámetros de ecotoxicidad predichos a los estimados con el programa ECOSAR Class Program. Se muestran los resultados predichos tras el ajuste en los modelos (○) y los obtenidos mediante validación cruzada (+). La línea continua representa la recta teórica (pendiente = 1, ordenada en el origen = 0). Los detalles se muestran en la Figura IX.2.

IX.3.3.- Modelos MEKC-QRAR *versus* CMB-QRAR de ecotoxicidad de fenoxiácidos

Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto la capacidad de ambas técnicas para la descripción y predicción de los parámetros ecotoxicológicos de los fenoxiácidos, si bien, ambas metodologías presentan una serie de ventajas e inconvenientes:

- La aplicabilidad de MEKC a la obtención de modelos QRAR utilizando disoluciones micelares de Brij35 está limitada a compuestos iónicos. Este inconveniente podría subsanarse mediante la adición de un surfactante iónico a la disolución de Brij35 para formar micelas mixtas que permitiría estudiar la movilidad de compuestos de toda naturaleza. Si bien este hecho requiere mayor atención ya que bajo tales condiciones para compuestos iónicos el factor de afinidad / retención depende además de las interacciones hidrófobas de las interacciones electrostáticas soluto-micela.
- Una ventaja a priori de las técnicas electroforéticas frente a las cromatográficas convencionales son los menores tiempos de desarrollo. Sin embargo, en este caso en el que se estudian compuestos iónicos y poco hidrófobos, por tanto, poco retenidos en CMB, esta ventaja desaparece ya que se requiere la obtención de las movilidades electroforéticas en presencia y en ausencia de Brij35 lo que conlleva a tiempos totales de análisis superiores. Por el contrario, para compuestos ionizados fuertemente hidrófobos, los tiempos obtenidos con MEKC serán menores que los obtenidos con CMB.
- Otra ventaja adicional de las técnicas electroforéticas es el menor consumo de reactivos. En este caso el empleo de MEKC supone una reducción notable frente a CMB.
- Ambas técnicas proporcionan parámetros de retención y migración precisos, lo cual es un requisito fundamental en el desarrollo de modelos QRAR en los que estos parámetros se utilizan como variables de predicción.

En la Tabla IX.5 se muestra un esquema comparativo de algunas características de MEKC y CMB utilizando disoluciones micelares de Brij35 al desarrollo de modelos QRAR.

Tabla IX.5.- Comparación de algunas características analíticas de MEKC y CMB utilizando Brij35 como sistema micelar para la obtención de modelos QRAR.

Técnica	Consumo de reactivos	Rapidez	Intervalo de aplicación	Precisión de las variables de predicción	Fiabilidad de los modelos
MEKC	O	OOO	O	OO	OO
CMB	OO	OO	OOO	OOO	OOO

O: bajo.
 OO: moderado.
 OOO: elevado.

IX.4.- Conclusiones

En el presente Capítulo se investigan las relaciones entre una serie de parámetros ecotoxicidad de fenoxiácidos y sus parámetros de migración y de retención obtenidos mediante cromatografía electrocinética micelar y cromatografía micelar de bio-reparto con medios micelares de Brij35, con objeto de evaluar la potencialidad de ambas técnicas como metodologías "*in vitro*" alternativas para la evaluación de la ecotoxicidad de herbicidas fenoxiácidos. De los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

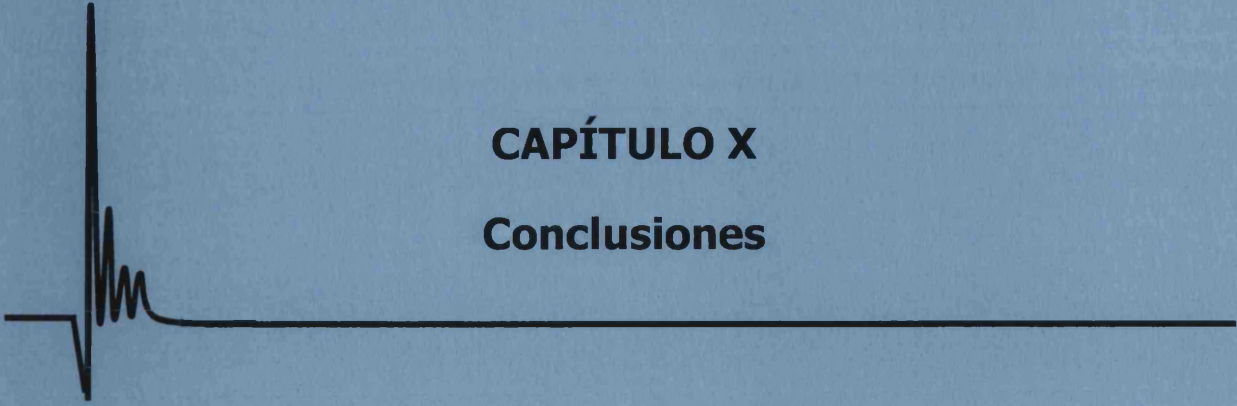
En primer lugar, se ha demostrado los factores de afinidad y de retención en MEKC y CMB, respectivamente, obtenidos con disoluciones micelares de Brij35 son capaces de describir y predecir, al menos de forma semi-cuantitativa, la ecotoxicidad de los fenoxiácidos estudiados.

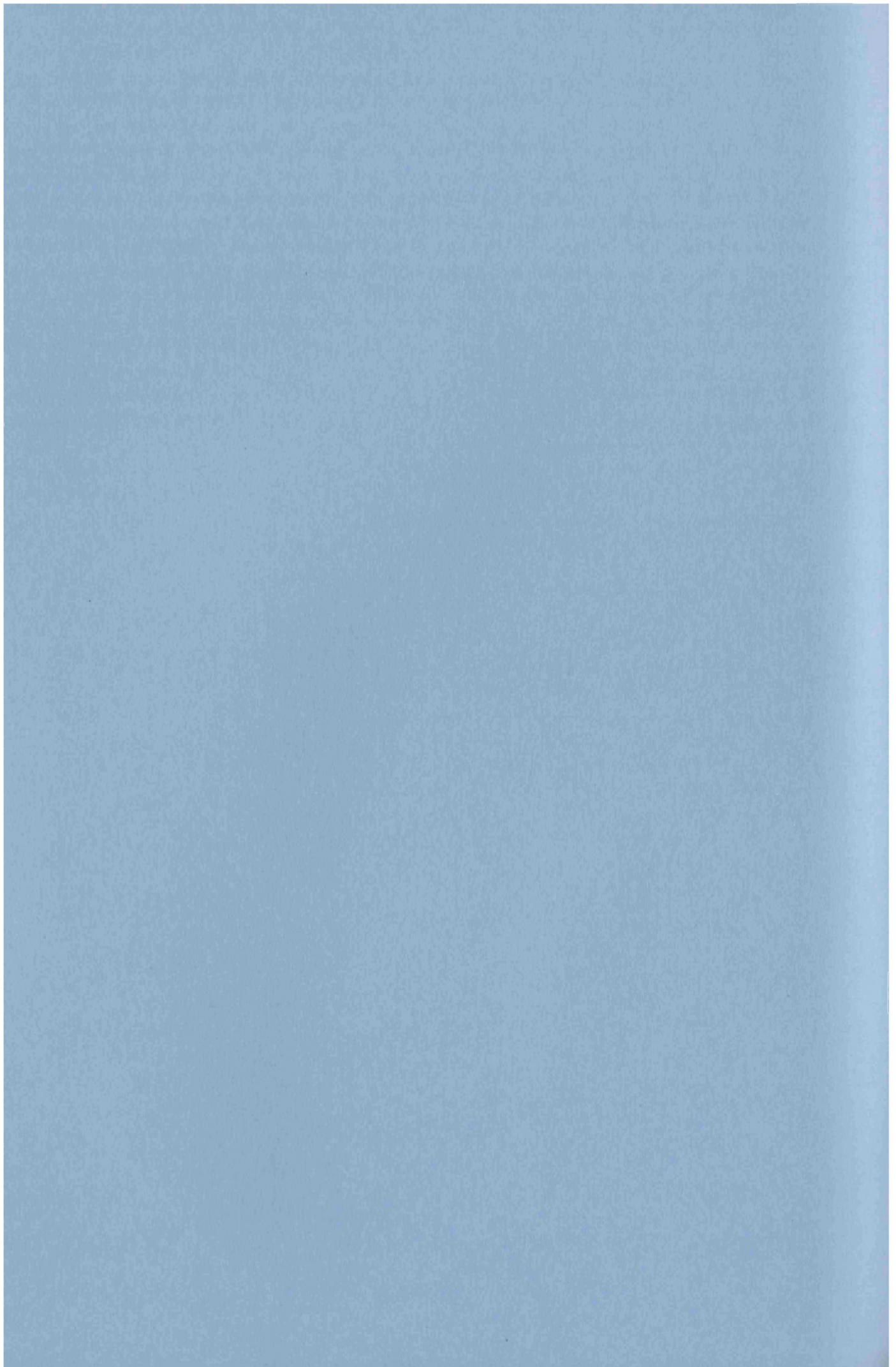
Por otro lado, la evaluación estadística de los modelos obtenidos pone de manifiesto que la capacidad de descripción y de predicción de los modelos CMB-QRAR de ecotoxicidad de fenoxiácidos es ligeramente superior a la de los modelos MEKC-QRAR desarrollados. No obstante, esta conclusión no puede extrapolarse a casos más generales debido al número reducido de compuestos estudiados y al caso particular estudiado.

Finalmente, hay que tener en cuenta que los valores de los parámetros de ecotoxicidad estudiados se han extraído del programa informático ECOSAR Class Program, el cual ha sido desarrollado y utilizado por la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (EPA) para evaluar la ecotoxicidad de nuevos compuestos y ha probado su capacidad de predicción. Por tanto, la bondad de los modelos obtenidos indica que MEKC y CMB son herramientas "*in vitro*" al menos tan útiles como el programa ECOSAR Class Program para la evaluación de la ecotoxicidad de los compuestos estudiados y de nuevos herbicidas fenoxiácidos de una forma sencilla, rápida y económica.

CAPÍTULO X

Conclusiones





De los resultados mostrados en esta Tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

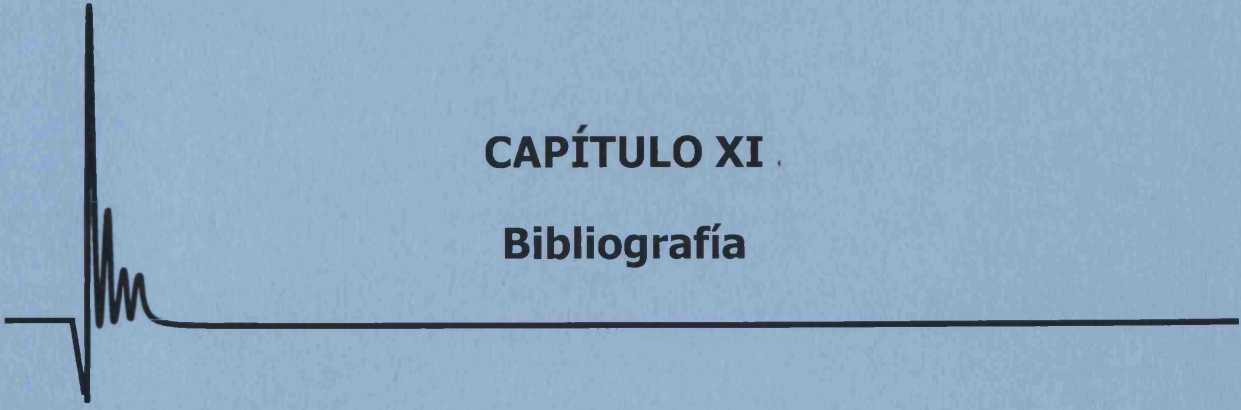
- La hidrofobicidad de los compuestos neutros es un factor determinante de su retención en cromatografía líquida micelar (MLC). El programa *s-logP* desarrollado, basado en el empleo de un algoritmo simplex, es capaz de modelar la relación no lineal $\log k - \log P$ para compuestos neutros en MLC de forma más eficaz que los modelos de regresión polinómicos. La calibración del modelo empleando 7 compuestos neutros cromatografiados con fases móviles micelares del surfactante no iónico Brij35 permite la estimación de valores de $\log P$ de nuevos compuestos neutros, consistentes con los obtenidos experimentalmente y mejores que los estimados mediante programas de cálculo comerciales (Capítulo IV).
- Para compuestos ionizables relacionados estructuralmente, $\log k$ puede describirse en función de $\log P$ y un nuevo descriptor al que hemos denominado carga molar total (α) de forma más robusta que el empleando el parámetro clásico $\log D$ (Capítulo V).
- Para describir la retención en MLC utilizando fases móviles micelares de Brij35 de compuestos no relacionados estructuralmente, ya sean neutros o ionizados, es necesario tener en cuenta, además de $\log P$, la carga molar negativa y positiva, expresadas como α_A y α_B , respectivamente (Capítulo VI).
- La retención de un compuesto utilizando columnas C_{18} y fases móviles micelares de Brij35 preparadas en condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica emula las interacciones intermoleculares responsables del reparto de los xenobióticos en las biomembranas (Capítulos VII - IX). A esta modalidad de MLC la hemos denominado cromatografía micelar de bio-reparto (CMB).
- El factor de retención obtenido en CMB, expresado como $\log k_{CMB}$, constituye un nuevo descriptor alternativo al clásico $\log P$ y/o $\log D$ para estimar parámetros farmacológicos (Capítulo VII) y ecotoxicológicos (Capítulos VIII - IX) de xenobióticos. Además, CMB presenta una serie de ventajas, tales como precisión, automatización, versatilidad, rapidez y bajo coste, que la hacen una herramienta "*in vitro*" de alto rendimiento, atractiva y útil para su implementación en los laboratorios de I + D de las industrias. Además, la CMB satisface los requerimientos de las directrices europeas que indican la necesidad de la reducción del número de animales utilizados con fines experimentales y el reemplazo de la experimentación con animales siempre que exista otro método científico satisfactorio y factible para obtener el resultado perseguido.
- El factor de afinidad obtenido en cromatografía electrocinética micelar (MEKC) con disoluciones micelares de Brij35 también es un descriptor prometedor para la estimación de

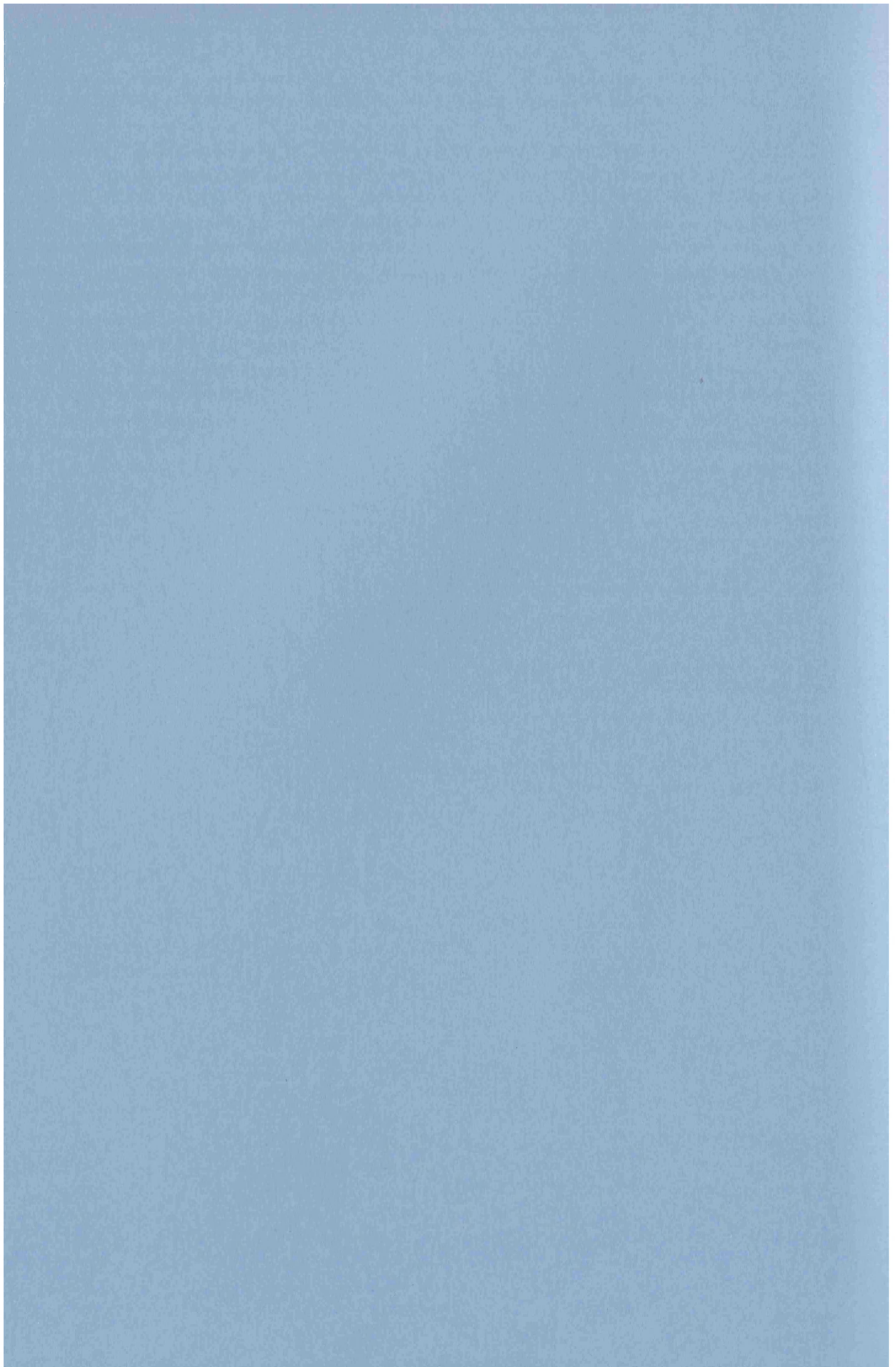


las respuestas biológicas de xenobióticos ionizados (Capítulo IX). Adicionalmente, la electroforesis capilar también reúne una serie de requisitos (alto rendimiento en el procesamiento de muestras, bajo consumo de reactivos y de muestras, versatilidad y automatización) solicitados en la actualidad por los laboratorios de I + D de las industrias en el marco del desarrollo de metodologías "*in vitro*" alternativas a las tradicionales.

CAPÍTULO XI .

Bibliografía





- Abraham M.H. (1993). "Scales of solute hydrogen-bonding: their construction and application to physicochemical and biochemical processes". *Chemical Society Reviews*, 22, 73-83.
- Abraham M.H., Chadha H.S., Leo A.J. (1994). "Hydrogen bonding XXXV. Relationship between high-performance liquid chromatography capacity factors and water-octanol partition coefficients". *Journal of Chromatography A*, 685, 203-221.
- Abraham M.H., McGowan J.C. (1987). "The use of characteristic volumes to measure cavity terms in reversed phase liquid-chromatography". *Chromatographia*, 23/4, 243-246.
- Abraham M.H., Ràfols C. (1995). "Factors that influence tadpole narcosis-an LFER analysis". *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, 10, 1843-1851.
- Abraham M.H., Treiner C., Rosés M, Ràfols C., Ishihama Y. (1996-a). "Linear free energy relationship analysis of microemulsion electrokinetic chromatographic determination of lipophilicity". *Journal of Chromatography A*, 752/1-2, 243-249.
- Abraham M.H., Poole C.F., Poole S.K. (1996-b). "Solute effects on reversed-phase thin-layer chromatography a linear free energy relationship analysis". *Journal of Chromatography A*, 749/(1-2), 201-209.
- Abraham M.H., Chadha H.S., Leitao R.A.E., Mitchell R.C., Lambert W.J., Kaliszan R., Nasal A., Haber P. (1997). "Determination of solute lipophilicity, as $\log P(\text{octanol})$ and $\log P(\text{alkane})$ using poly(styrene-divinilbenzene) and immobilised artificial membrane stationary phases in reversed-phase high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 766, 35-47.
- Abraham M.H., Ibrahim A., Zissimos A.M., Zhao Y.H., Comer J., Reynolds D.P. (2002). "Application of hydrogen bonding calculations in property based drug design". *Drug Discovery Today*, 7/20, 1056-1063.
- Adlard M., Okafo G., Meenan E., Camilleri P. (1995). "Rapid estimation of octanol-water partition coefficients using deoxycholate micelles in capillary electrophoresis". *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 21, 2241-2243.
- Agbodjan A.A., Bui H., Khaledi M.G. (2001). "Study of solute partitioning in biomembrane-mimetic pseudophases by electrokinetic chromatography: Dihexadecyl phosphate small unilamellar vesicles". *Langmuir*, 17/10, 2893-2899.
- Albert A., Rubbo S.D., Goldacre R.J., Davey M.E., Stone J.D. (1945). "The influence of chemical constitution on antibacterial activity 2. A general survey of the acridine series". *British Journal of Experimental Pathology*, 26/3, 160-192.

- Al-Haj M.A., Haber P., Kaliszan R., Buszewski B., Jezierska M., Chilmonzyk Z. (1998). "Mechanism of separation on cholesterol-silica stationary phase for high-performance liquid chromatography as revealed by analysis of quantitative structure-retention relationships". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18(4-5), 721-728.
- Al-Haj M.A., Kaliszan R., Nasal A. (1999). "Test analytes for studies of the molecular mechanism of chromatographic separations by quantitative structure-retention relationships". *Analytical Chemistry*, 71/15, 2976-2985.
- AMA (1994). "AMA Drug Evaluations Annual". American Medical Association, Council on Drugs, Chicago (EE.UU.) págs. 1814-1815.
- Argilés F., Sagrado S., Medina-Hernández M.J. (1997). "Reliability of the capacity factor at zero micellar concentration and the solute-micelle association constant estimates by micellar liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 778(1-2), 67-75.
- Armstrong D.W., Henry S.J. (1980). "Use of an aqueous micellar mobile phase for separation of phenols and polynuclear aromatic-hydrocarbons via HPLC". *Journal of Liquid Chromatography*, 3/5, 657-662.
- Armstrong D.W., Nome F. (1981). "Partitioning behavior of solutes eluted with micellar mobile phases in liquid-chromatography". *Analytical Chemistry*, 53/11, 1662-1666.
- Armstrong D.W., Stine G.Y. (1983-a). "Selectivity in pseudophase liquid-chromatography". *Analytical Chemistry*, 55/14, 2317-2320.
- Armstrong D.W., Stine G.Y. (1983-b). "Evaluation and perturbation of micelle-solute interactions". *Journal of the American Chemical Society*, 105/20, 6220-6223.
- Arunyanart M., Cline-Love L.J. (1984). "Model for micellar effects on liquid-chromatography capacity factors and for determination of micelle solute equilibrium-constants". *Analytical Chemistry*, 56/9, 1557-1561.
- Arunyanart M., Cline-Love L.J. (1985). "Influence of micelles on partitioning equilibria of ionizable species in liquid-chromatography - pH and ionic-strength effects". *Analytical Chemistry*, 57/14, 2837-2843.
- Axelman J., Broman D., Naf C., Pettersen H. (1995). "Compound dependence of the relationship $\log K_{ow}$ and $\log BCFL$ - A comparison between chlorobenzenes (CBs) for rainbow trout and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for *Daphnia*". *Environmental Science and Pollution Research*, 2/1, 33-36.

- Baczek T., Markuszewski M., Kaliszan R., van Straten M.A., Claessens H.A. (2000). "Linear and quadratic relationships between retention and organic modifier content in eluent in reversed phase high-performance liquid chromatography: A systematic comparative statistical study". HRC-Journal of High Resolution Chromatography, 23/12, 667-676.
- Baker J.R., Mihelcic J.R., Shea E. (2000). "Estimating K_{oc} for persistent organic pollutants: limitations of correlations with K_{ow} ". Chemosphere, 41/6, 813-817.
- Baker J.R., Mihelcic J.R., Sabljic A. (2001). "Reliable QSAR for estimating K_{oc} for persistent organic pollutants: correlation with molecular connectivity indices". Chemosphere, 45/2, 213-221.
- Balls M. (1998). "Why is it proving to be so difficult to replace animal tests?". Laboratory animal, 27, 44-47.
- Barbato F., La Rotonda M.I., Quaglia F. (1997-a). "Interactions of nonsteroidal antiinflammatory drugs with phospholipids: comparison between octanol/buffer partition coefficients and chromatographic indexes on immobilized artificial membranes". Journal of Pharmaceutical Sciences, 86/2, 225-229.
- Barbato F., La Rotonda M.I., Quaglia F. (1997-b). "Chromatographic indexes on immobilized artificial membranes for local anesthetics: relationships with activity data on closed sodium channels". Pharmaceutical Research, 14/12, 1699-1705.
- Barbato F., Cappello B., Miro A., La Rotonda M.I., Quaglia F. (1998). "Chromatographic indexes on immobilized artificial membranes for the prediction of transdermal transport of drugs". Il Farmaco, 53/(10-11), 655-661.
- Beaudry F., Coutu M., Brown N.K. (1999). "Determination of drug-plasma protein binding using human serum albumin chromatographic column and multiple linear regression model". Biomedical Chromatography, 13/6, 401-406.
- Bechalany A., Tsantili-Kakoulidou A., El Tayar N., Testa B. (1991). "Measurement of lipophilicity indices by reversed-phase high-performance liquid chromatography: comparison of two stationary phases and various eluents". Journal of Chromatography, 541, 221-229.
- Beigi F., Yang Q., Lundahl P. (1995). "Immobilized-liposome chromatographic analysis of drug partitioning into lipid bilayers". Journal of Chromatography A, 704/2, 315-321.
- Beigi F., Gottschalk I., Hagglund C.L., Haneskog L., Brekkan E., Zhang Y.X., Osterberg T., Lundahl P. (1998). "Immobilized liposome and biomembrane partitioning chromatography of drugs for prediction of drug transport". International Journal of Pharmaceutics, 164/(1-2), 129-137.

- Beleña-Pozo I., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S., Medina-Hernández M.J. **(1999)**. *"Development and validation of a procedure for estimating the hydrophobicity of structurally unrelated compounds by micellar liquid chromatography"*. Journal of Chromatographic Science, 37/10, 375-382.
- Belsner K., Pfeifer M., Wilffert B. **(1993)**. *"Reversed-phase high-performance liquid-chromatography for evaluating the lipophilicity of pharmaceutical substances with ionization up to $\log P_{app} = 8$ "*. Journal of Chromatography, 629/2, 123-134.
- Benito I., Garcia M.A., Diez Masa J.C., Marina M.L. **(1997)**. *"Separation, determination of solute-micelle association constants, and hydrophobicity quantitation for a group of dihydropyridines by micellar electrokinetic chromatography"*. Journal of Microcolumn Separations, 9/2, 87-95.
- Benito I., Saz J.M., Marina M.L. **(1998)**. *"Determination of 1-octanol-water partition coefficients for a group of 1,4-dihydropyridines by reversed-phase high performance liquid chromatography: study of micellar liquid chromatography for hydrophobicity estimation"*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 21/3, 331-347.
- Bermúdez-Saldaña J.M., Quiñones-Torrelo C., Sagrado S., Medina-Hernández M.J., Villanueva-Camañas R.M. **(2002)**. *"A micellar liquid chromatographic method for quality control of pharmaceutical preparations containing tricyclic antidepressants"*. Chromatographia, 56/(5-6), 299-306.
- Bermúdez-Saldaña J.M., García M.A., Medina-Hernández M.J., Marina M.L. **(2004)**. *"Micellar electrokinetic chromatography using bile salts to predict ecotoxicity of aromatic compounds"*. Journal of Chromatography A, 1052/(1-2), 171-180.
- Bermúdez-Saldaña J.M., Escuder-Gilabert L., Medina-Hernández M.J., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S. **(2005-a)**. *"Chromatographic evaluation of the toxicity in fish of pesticides"*. Journal of Chromatography B, 814/1, 115-125.
- Bermúdez-Saldaña J.M., Escuder-Gilabert L., Medina-Hernández M.J., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S. **(2005-b)**. *"Modelling bioconcentration of pesticides in fish using biopartitioning micellar chromatography"*. Journal of Chromatography A, 1063/(1-2), 153-160.
- Bermúdez-Saldaña J.M., Escuder-Gilabert L., Medina-Hernández M.J., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S. **(2005-c)**. *"Soil sorption coefficient ($\log K_{oc}$) estimation of pesticides using biopartitioning micellar chromatography"*. Trends in Analytical Chemistry, (enviado).
- Berthod A., Girard I., Gonnet C. **(1986-a)**. *"Micellar liquid-chromatography - adsorption-isotherms of 2 ionic surfactants on 5 stationary phases"*. Analytical Chemistry, 58/7, 1356-1358.
- Berthod A., Girard I., Gonnet C. **(1986-b)**. *"Micellar liquid-chromatography - retention study of solutes of various polarities"*. Analytical Chemistry, 58/7, 1359-1362.

- Berthod A., Girard I., Gonnet C. (1987). "Stationary phase in micellar liquid-chromatography - surfactant adsorption and interaction with ionic solutes" en Hinze W.L., Armstrong D.W. (Editores) "Ordered media in chemical separations". ACS Symposium Series, 342, 130-141.
- Berthod A., Dorsey J.G. (1988-a). "Micelles in mobile phases". Analisis, 16/2, 75-89.
- Berthod A., Roussel A. (1988-b). "The role of the stationary phase in micellar liquid-chromatography - adsorption and efficiency". Journal of Chromatography, 449/2, 349-360.
- Berthod A., Borgerding M.F., Hinze W.L. (1991). "Investigation of the causes of reduced efficiency in micellar liquid chromatography". Journal of Chromatography, 556, 263-275.
- Berthod A. (1997). "Causes and remediation of reduced efficiency in micellar liquid chromatography". Journal of Chromatography A, 7807(1-2), 191-266.
- Berthod A., García Álvarez-Coque M.C. (2000). "Micellar liquid chromatography". Chromatographic Science Series, 83, Marcel Dekker, Nueva York (EE.UU.).
- Berthod A., Carda-Broch S. (2004). "Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods". Journal of Chromatography A, 1037/(1-2), 3-14.
- Bertucci C., Bartolini M., Gotti R., Andrisano V. (2003). "Drug affinity to immobilized target biopolymers by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis". Journal of Chromatography B, 797/(1-2), 111-129.
- Biagi G.L., Barbaro A.M., Gamba M.F., Guerra M.C. (1964). "Partition data of penicillins determined by means of reversed-phase thin-layer chromatography". Journal of Chromatography, 41, 371-379.
- Biagi G.L., Gandolfi O., Guerra M.C., Barbaro A.M., Cantelliforti G. (1975). " R_M values of phenols - their relationship with $\log P$ values and activity". Journal of Medicinal Chemistry, 18/9, 868-873.
- Biagi G.L., Guerra M.C., Barbaro A.M., Barbieri S., Recanatini M., Borea P.A., Pietrogrande M.C. (1990-a). "Study of the lipophilic character of xanthine and adenosine derivatives .1. R_M and $\log P$ values". Journal of Chromatography, 498/1, 179-190.
- Biagi G.L., Guerra M.C., Barbaro A.M., Barbieri S., Recanatini M., Borea P.A. (1990-b). "Study of the lipophilic character of xanthine and adenosine derivatives. 2. Relationships between $\log k'$, $\log R_M$ and $\log P$ values". Journal of Liquid Chromatography, 13/5, 913-927.
- Biagi G.L., Barbaro A.M., Sapone A., Recanatini M. (1994-a). "Determination of lipophilicity by means of reversed-phase thin-layer chromatography. 1. Basic aspects and relationship between slope and intercept of TLC equations". Journal of Chromatography A, 662/2, 341-361.

- Biagi G.L., Barbaro A.M., Sapone A., Recanatini M. **(1994-b)**. *"Determination of lipophilicity by means of reversed-phase thin-layer chromatography. 2. Influence of the organic modifier on the slope of the thin-layer chromatographic equation"*. Journal of Chromatography A, 669(1-2), 246-253.
- Biagi G.L., Barbaro A.M., Recanatini M. **(1994-c)**. *"Determination of lipophilicity by means of reversed-phase thin-layer chromatography. 3. Study of the TLC equations for a series of ionizable quinolone derivatives"*. Journal of Chromatography A, 678/1, 127-137.
- Biagi G.L., Barbaro A.M., Sapone A., Borea P.A., Varani K., Recanatini M. **(1996)**. *"Study of lipophilic character of serotonergic ligands"*. Journal of Chromatography A, 723/1, 135-143.
- Bien-Vogelsang U., Deege A., Figue H., Kohler J., Schomburg G. **(1984)** *"Syntheses of stationary phases for reversed-phase LC using silanization and polymer coating"*. Chromatographia, 19, 170-179.
- Bij K.E., Horváth C., Melander W.R., Nahum A. **(1981)**. *"Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases: II. Irregular retention behavior and effect of silanol masking"*. Journal of Chromatography, 203, 65-84.
- Bitteur S., Rosset R. **(1987)**. *"Comparison of octadecyl-bonded silica and styrene-divinylbenzene copolymer sorbents for trace enrichment purposes: Fundamental aspects I. Calibration of the stationary phases in pure water"*. Journal of Chromatography A, 394/2, 279-293.
- Bodor N., Gabanyi A., Wong C.J. **(1989)**. *"A new method for the estimation of partition coefficients"*. Journal of the American Chemical Society, 111, 3783-3786.
- Bodor N., Huang M.J. **(1992)**. *"An extended version of a novel method for the estimation of partition coefficients"*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 81, 272-281.
- Bonet-Domingo E., Torres-Lapasíó J.R., Medina-Hernández M.J., García-Álvarez-Coque **(1994)**. *"Chromatographic monitoring of diuretics in urine samples using a sodium dodecyl sulphate-propanol micellar eluent"*. Analytica Chimica Acta, 287, 201-210.
- Borgerding M.F., Hinze W.L. **(1985)**. *"Characterization and evaluation of the use of nonionic polyoxyethylene(23)dodecanol micellar mobile phases in reversed-phase high-performance liquid-chromatography"*. Analytical Chemistry, 57/12, 2183-2190.
- Borgerding M.F., Quina F.H., Hinze W.L., Bowermaster J., McNair H.M. **(1988)**. *"Investigation of the retention mechanism in nonionic micellar liquid chromatography using and alkylbenzene homologous series"*. Analytical Chemistry, 60/22, 2520-2527.
- Borgerding M.F., Hinze W.L., Stafford L.D., Fulp G.W., Hamlin W.C. **(1989)**. *"Investigations of stationary phase modification by the mobile phase surfactant in micellar liquid-chromatography"*. Analytical Chemistry, 61/13, 1353-1358.

- Bosch E., Bou P., Rosés M. (1994). "Linear description of solute retention in reversed-phase liquid chromatography by a new mobile phase polarity parameter". *Analytica Chimica Acta*, 299/2, 219-229.
- Bosch E., Bou P., Allemann H., Rosés M. (1996). "Retention of ionizable compounds on HPLC. pH scale in methanol/water and the pK and pH values of buffers". *Analytical Chemistry*, 68/20, 3651-3657.
- Bosch E., Espinosa S., Rosés M. (1998). "Retention of ionizable compounds on high-performance liquid chromatography III. Variation of pK values of acids and pH values of buffers in acetonitrile-water mobile phases". *Journal of Chromatography A*, 824/2, 137-146
- Boyce C.B.C., Milborrow B.V. (1965). "A simple assessment of partition data for correlating structure and biological activity using thin-layer chromatography". *Nature*, 208/5010, 537-539.
- Bradbury S.P. (1995). "Quantitative structure-activity-relationships and ecological risk assessment-an overview of predictive aquatic toxicology research". *Toxicology Letters*, 79/(1-3), 229-237.
- Brändström A. (1963). "A rapid method for determination of distribution coefficient of bases for biological purposes". *Acta Chemica Scandinavica*, 17/5, 1218.
- Braumann T., Weber G., Grimme L.H. (1983). "Quantitative structure-activity relationships for herbicides. Reversed-phase liquid chromatographic retention parameter, $\log k_w$ versus liquid-liquid partition coefficient as a model of the hydrophobicity of phenylureas, s-triazines and phenoxycarbonic acid derivatives". *Journal of Chromatography*, 261, 329-343.
- Braumann T. (1986). "Determination of hydrophobic parameters by reversed-phase liquid-chromatography-theory, experimental-techniques, and application in studies on quantitative structure-activity-relationships". *Journal of Chromatography*, 373/2, 191-225.
- Breyer E.D., Strasters J.K., Khaledi M.G. (1991). "Quantitative retention-biological activity relationship study by micellar liquid chromatography". *Analytical Chemistry*, 63/8, 828-833.
- Briggs G.G. (1981). "Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition-coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29/5, 1050-1059.
- Brooke D.N., Dobbs A.J., Williams N. (1986). "Octanol-water partition coefficients (P)-measurement, estimation, and interpretation, particularly for chemicals with P-greater than-10(5)". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 11/3, 251-260.
- Brooke D., Nielsen I., Debruijn J., Hermens J. (1990). "An interlaboratory evaluation of the stir-flask method for the determination of octanol-water partition-coefficients (logPow)". *Chemosphere*, 21/1-2, 119-133.



- Burns S.T., Khaledi M.G. (2002). "Determination of liposome-water partition coefficients (K_{lw}) using liposome electrokinetic chromatography (LEKC)". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91/7, 1601-1612.
- Busch M.H.A., Carels L.B., Boelens H.F.M., Kraak J.C., Poppe H. (1997). "Comparison of five methods for the study of drug-protein binding in affinity capillary electrophoresis". *Journal of Chromatography A*, 777/2, 311-328.
- Caldwell G.W., Masucci J.A., Evangelisto M., White R. (1998). "Evaluation of the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine - Drug discovery column for high-performance liquid chromatographic screening of drug-membrane interactions". *Journal of Chromatography A*, 800/2, 161-169.
- Canals I., Portal J.A., Bosch E., Rosés M. (2000). "Retention of ionizable compounds on HPLC. 4. Mobile-phase pH measurement in methanol/water". *Analytical Chemistry*, 72/8, 1802-1809.
- Canals I., Oumada F.Z., Rosés M., Bosch E. (2001-a). "Retention of ionizable compounds on HPLC. 6. pH measurements with the glass electrode in methanol/water mixtures". *Journal of Chromatography A*, 911/2, 191-202.
- Canals I., Valkó K., Bosch E.; Hill A.P., Rosés M. (2001-b). "Retention of ionizable compounds on HPLC. 8. Influence of mobile-phase pH change on the chromatographic retention of acids and bases during gradient elution". *Analytical Chemistry*, 73/20, 4937-4945.
- Canals I., Portal J.A., Rosés M., Bosch E. (2002-a). "Retention of ionizable compounds on HPLC. Modelling retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of pH and solvent composition with methanol/water mobile phases". *Chromatographia*, 55/(9-10), 565-571.
- Canals I., Portal J.A., Rosés M., Bosch E. (2002-b). "Retention of ionizable compounds on HPLC. Modelling retention for neutral and ionizable compounds by linear solvation energy relationship". *Chromatographia*, 56/(7-8), 431-437.
- Castells C.B., Ràfols C., Rosés M., Bosch E. (2003). "Effect of temperature on pH measurements and acid-base equilibria in methanol-water mixtures". *Journal of Chromatography A*, 1002/(1-2), 41-53.
- Castells C.B., Gagliardi L.G., Ràfols C., Rosés M., Bosch E. (2004). "Effect of temperature on the chromatographic retention of ionizable compounds I. Methanol-water mobile phases". *Journal of Chromatography A*, 1042/(1-2), 23-36.
- Catalá-Icardo M., Medina-Hernández M.J., García Álvarez-Coque M.C. (1995). "Determination of amino-acids by micellar high-performance liquid-chromatography and pre-column derivatization with *o*-phthalaldehyde and *N*-acetyl-L-cysteine". *Journal of Liquid Chromatography*, 18/14, 2827-2841.

- Chen N., Zhang Y., Terabe S., Nakagawa T. (1994). "Effect of physico-chemical properties and molecular structure on the micelle-water partition coefficient in micellar electrokinetic chromatography". *Journal of Chromatography A*, 678/2, 327-332.
- Chilmonczyk Z., Ksycińska H., Poleć I. (1998). "Application of chiral chromatographic parameters in quantitative structure-activity relationship analysis of homologous malathion derivatives". *Journal of Chromatography B*, 720/(1-2), 65-69.
- Cholbi-Cholbi M.F., Martínez-Pla J.J., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. (2004). "Determination of anticonvulsant drugs in pharmaceutical preparations by micellar liquid chromatography". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 27/1, 153-170.
- Cichna M., Markl P., Huber J.F.K. (1995). "Determination of true octanol water partition-coefficients by means of solvent generated liquid-liquid chromatography". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13/(4-5), 339-351.
- Clark W.G., Craig Brater D., Johnson A.R. (1992). "Goth. Farmacología Médica". 13ª edición, Mosby, Madrid (España).
- Collander R. (1951). "The partition of organic compounds between higher alcohols and water". *Acta Chemica Scandinavica*, 5/5, 774-780.
- Collet J., Gareil P. (1997). "Micellar electrokinetic chromatography of long chain saturated and unsaturated free fatty acids with neutral micelles: Considerations regarding selectivity and resolution optimization". *Journal of Chromatography A*, 792/1-2, 165-177.
- Comer J. (1994). "The acid test". *Chemistry in Britain*, 30/12, 983-986.
- Comer J., Tam K. (2001). "Lipophilicity profiles: theory and measurement" en Testa B., van de Waterbeemd H., Folkers G., Guy R.H. (Editores) "Pharmacokinetic optimization in drug research: biological, physicochemical, and computational strategies". Wiley-Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurich (Alemania). Páginas 275-304.
- Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, <http://www.portalfarma.com>.
- Cronin M.T.D., Dearden J.C. (1995). "QSAR in toxicology. 3. Prediction of chronic toxicities". *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 14/4, 329-334.
- Cronin M.T.D., Schultz T.W. (1996). "Structure-toxicity relationships for phenols to *Tetrahymena pyriformis*". *Chemosphere*, 32/8, 1453-1468.
- Cronin M.T.D., Dearden J.C., Moss G.P., Murray-Dickson G. (1999). "Investigation of the mechanism of flux accross human skin in vitro by quantitative structure-permeability relationships". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7, 325-330.

- Cronin M.T.D., Schultz T.W. (2003). *"Pitfalls in QSAR"*. Journal of Molecular Structure (Teochem), 662, 39-51.
- Cros A.F.A. (1863). *"Action de l'alcool amylique sur l'organisme"*. Tesis Doctoral, Universidad de Estrasburgo, Facultad de Medicina, Estrasburgo (Francia).
- Crum-Brown A., Fraser T.R. (1868). *"On the connection between chemical constitution and physiological action. Part 1. On the physiological action of the salts of the ammonium bases, derived from scrychnina, brucia, thebia, codeia, morphia and nicotia"*. Transactions of the Royal Society of Edinburgh-Earth Sciences, 25, 151-203.
- Cserhádi T., Valkó K. (1994). *"Chromatographic determination of molecular interactions: applications in Biochemistry, Chemistry and Biophysics"*. CRC Press, Boca Raton, Florida (EE.UU.).
- Cuéllar Rodríguez S. (coordinador) (1995). *"Introducción a la química de los medicamentos"*. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Heliopatía Artística, S.L., Madrid (España).
- Cuenca-Benito M., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. (1998). *"Quantitative retention-structure and retention-activity relationships of barbiturates by micellar liquid chromatography"*. Journal of Chromatography A, 814/(1-2), 121-132.
- Dai J., Jin L., Yao S., Wang L. (2001). *"Prediction of partition coefficient and toxicity for benzaldehyde compounds by their capacity factors and various molecular descriptors"*. Chemosphere, 42/8, 899-907.
- Danielsson L.G., Zhang Y.H. (1994). *"Mechanized determination of n-octanol water partition constants using liquid-liquid segmented flow extraction"*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 12/12, 1475-1481.
- Danielsson L.G., Zhang Y.H. (1996). *"Methods for determining n-octanol-water partition constants"*. Trends in Analytical Chemistry, 15/4, 188-196.
- Davydov V.Y., Filatova G.N., Smolkova-Keulemansova E., Zima Y. (1988). *"Evaluation of the retention of cardiac-glycosides and steroid-hormones in reversed-phase liquid-chromatography and their biological-activity according to the contribution of hydrophilic and hydrophobic groups to retention"*. Chromatographia, 25/12, 1059-1066.
- del Río J. (Editor) (2000). *"Farmacología básica"*. 2ª edición, Editorial Síntesis, S.A., Madrid (España).
- De Biasi V., Lough W.J., Evans M.B. (1986). *"Study of the lipophilicity of organic-bases by reversed-phase liquid-chromatography with alkaline eluents"*. Journal of Chromatography, 353, 279-284.

- Demare S., Roy D., Legendre Y. (1999). "Factors governing the retention of solutes on chromatographic immobilized artificial membranes: Application to anti-inflammatory and analgesic drugs". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 22/17, 2675-2688.
- Detroyer A., Vander Heyden Y., Carda-Broch S., García-Álvarez-Coque M.C., Massart D.L. (2001). "Quantitative structure-retention and retention-activity relationships of β -blocking agents by micellar liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 912/2, 211-221.
- Detroyer A., Vander Heyden Y., Cambré I., Massart D.L. (2003). "Chemometric comparison of recent chromatographic and electrophoretic methods in a quantitative structure-retention and retention-activity relationship context". *Journal of Chromatography A*, 986/2, 227-238.
- DeVoe H., Miller M.M., Wasik S.P. (1981). "Generator columns and high-pressure liquid-chromatography for determining aqueous solubilities and octanol-water partition-coefficients of hydrophobic substances". *Journal of Research of The National Bureau of Standards*, 86/4, 361-366.
- De Voogt P., Wegener J.W.M., Brinkman U.A.T., Govers H. (1991). "Retention of neutral and basic heteroaromatic hydrocarbons in RPLC and its use in predictive studies. 1. Concentration of the organic modifier". *Science of the Total Environment*, 109, 69-87.
- De Young L.R., Dill K.A. (1988). "Solute partitioning into lipid bilayer-membranes". *Biochemistry*, 27/14, 5281-5289.
- De Young L.R., Dill K.A. (1990). "Partitioning of nonpolar solutes into bilayers and amorphous n-alkanes". *Journal of Physical Chemistry*, 94/2, 801-809.
- Dias N.C., Poole C.F. (2000). "Optimization of ternary mobile phases in reversed-phase thin-layer chromatography by use of a mixture-design approach with the solvation-parameter model". *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 13/5, 337-347.
- Dill K.A., Flory P.J. (1981). "Molecular-organization in micelles and vesicles". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Physical Sciences*, 78/2, 676-680.
- Dill K.A., Naghizadeh J., Marqusee J.A. (1988). "Chain molecules at high-densities at interfaces". *Annual Review of Physical Chemistry*, 39, 425-461.
- Dinelli G., Mallegni R., Vicari A. (1997). "Micellar electrokinetic capillary chromatography as a method for the determination of n-octanol/water partition coefficients of pesticides". *Electrophoresis*, 18/2, 214-219.

- Directiva 2001/59/CE de la Comisión de 6 de agosto de 2001, por la que se adapta, por vigésima octava vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas. Capítulo C.19: "*Cálculo del coeficiente de adsorción (K_{oc}) en suelos y en lodos de aguas residuales mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*". Diario Oficial de las Comunidades Europeas del 21/08/2001, nº L 225, 238-245.
- Djaković-Sekulić T.L., Petrović S.M., Perišić-Janjić N.U., Petrović S.D. (2001). "*HPLC behavior and hydrophobic parameters of some anilides*". *Chromatographia*, 54/(1-2), 60-64.
- Dorsey J.G., De Echegaray M.T., Landy J.S. (1983). "*Efficiency enhancement in micellar liquid-chromatography*". *Analytical Chemistry*, 55/6, 924-928.
- Dorsey J.G., Khaledi M.G., Landy J.S., Lin J.L. (1984). "*Gradient elution micellar liquid-chromatography*". *Journal of Chromatography*, 316, 183-191.
- Dorsey J.G. (1987). "*Micellar liquid-chromatography*". *Advances in Chromatography*, 27, 167-214.
- Dorsey J.G., Khaledi M.G. (1993). "*Hydrophobicity estimations by reversed-phase liquid chromatography. Implications for biological partitioning processes*". *Journal of Chromatography A*, 656/(1-2), 485-499.
- Dross K., Sonntag C., Mannhold R. (1994). "*Determination of the hydrophobicity parameter R_{Mw} by reversed-phase thin-layer chromatography*". *Journal of Chromatography A*, 673/1, 113-124.
- Du C.M., Valkó K., Bevan C., Reynolds D., Abraham M.H. (1998). "*Rapid gradient RP HPLC method for lipophilicity determination: A solvation equation based comparison with isocratic methods*". *Analytical Chemistry*, 70/20, 4228-4234.
- Du C.M., Valkó K., Bevan C., Reynolds D., Abraham M.H. (2001). "*Rapid method for estimating octanol-water partition coefficient ($\log P_{oct}$) from isocratic RP-HPLC and a hydrogen bond acidity term (A)*". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24/5, 635-649.
- Ducarme A., Neuwels M., Goldstein S., Massingham R. (1998). "*IAM retention and blood brain barrier penetration*". *European Journal of Medicinal Chemistry*, 33/3, 215-223.
- Durrani Z., Winnie A.P. (1991). "*Brain-stem toxicity with reversible locked-in syndrome after intrascalene brachial-plexus block*". *Anesthesia and Analgesia*, 72/2, 249-252.
- El Seoud O.A. (1989). "*Effects of organized surfactant assemblies on acid-base equilibria*". *Advances in Colloid and Interface Science*, 30/(1-2), 1-30.
- Escher B.I., Behra R., Eggen R.I.L., Fent K. (1997). "*Molecular mechanisms in ecotoxicology: an interplay between environmental chemistry and biology*". *Chimia*, 51/12, 915-921.

- Escuder-Gilabert L., Martín-Biosca Y., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J., Sagrado S. (1999). "The chromatographic quantification of hydrophobicity using micellar mobile phases". *Chromatographia*, 50(5-6), 325-332.
- Escuder-Gilabert L., Sagrado S., Medina-Hernández M.J., Villanueva-Camañas R.M. (2001). "Determination of procaine and tetracaine in plasma samples by micellar liquid chromatography and direct injection of sample". *Chromatographia*, 53(5-6), 256-260.
- Escuder-Gilabert L., Martín-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. (2002). "Quality control of pharmaceuticals containing non-steroidal anti-inflammatory drugs by micellar liquid chromatography". *Chromatographia*, 55(5-6), 283-288.
- Escuder-Gilabert L., Molero-Monfort M., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S., Medina-Hernández M.J. (2004-a). "Potential of biopartitioning micellar chromatography as an in vitro technique for predicting drug penetration across the blood-brain barrier". *Journal of Chromatography B*, 807/2, 193-201.
- Escuder-Gilabert L., Bermúdez-Saldaña J.M., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J., Sagrado S. (2004-b). "Reliability of the retention factor estimations in liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 1033/2, 247-255.
- Espinosa S., Bosch E., Rosés M. (2000). "Retention of ionizable compounds on HPLC. 5. pH scales and the retention of acids and bases with acetonitrile-water mobile phases". *Analytical Chemistry*, 72/21, 5193-5200.
- Espinosa S., Bosch E., Rosés M. (2002-a). "Retention of ionizable compounds in high-performance liquid chromatography IX. Modelling retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of pH and solvent composition with acetonitrile/water mobile phases". *Journal of Chromatography A*, 947/1, 47-58.
- Espinosa S., Bosch E., Rosés M. (2002-b). "Retention of ionizable compounds on high-performance liquid chromatography XI. Global linear solvation energy relationships for neutral and ionizable compounds". *Journal of Chromatography A*, 945/(1-2), 83-96.
- Espinosa S., Bosch E., Rosés M. (2002-c). "Retention of ionizable compounds on HPLC. 12. The properties of liquid chromatography buffers in acetonitrile-water mobile phases that influence HPLC retention". *Analytical Chemistry*, 74/15, 3809-3818.
- Espinosa S., Bosch E., Rosés M. (2002-d). "Retention of ionizable compounds in high-performance liquid chromatography 14. Acid-base pK values in acetonitrile-water mobile phases". *Journal of Chromatography A*, 964/(1-2), 55-66.
- Esplugues J. (Director) (1981). "Perspectivas terapéuticas con su fundamento farmacológico". 2ª edición, Fundación García Muñoz-Sección SABER, Valencia (España).

- Fent K. (2003). *"Ecotoxicological problems associated with contaminated sites"*. Toxicology Letters, 140-141, 353-365.
- Ferreira M.M.C. (2002). *"Multivariate QSAR"*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 13/6, 742-753.
- Festing M.F.W., Baumans V., Combes R.D., Halder M., Hendriksen C.F.M., Howard B.R., Lovell D.P., Moore G.J., Overend P., Wilson M.S. (1998). *"Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions"*. The report and recommendations of ECVAM Workshop 29. Alternatives to Laboratory Animals, 26, 283-301.
- Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisky C.D., Muir D.C.G. (1998). *"Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient"*. Environmental Toxicology and Chemistry, 17/5, 951-961.
- Flórez J., Armijo J.A., Mediavilla A. (Directores) (1997). *"Farmacología humana"*. 3ª edición, Ediciones Científicas y Técnicas, S.A., Barcelona (España).
- Foley J.P. (1990). *"Critical compilation of solute micelle binding constants and related parameters from micellar liquid-chromatographic measurements"*. Analytica Chimica Acta, 231/2, 237-247.
- Foucault A.P. (1991). *"Countercurrent chromatography"*. Analytical Chemistry, 63/10, 569A-570A, 572A-579A.
- Free S.M. Jr., Wilson J.W. (1964). *"A mathematical contribution to structure activity studies"*. Journal of Medicinal Chemistry, 7/4, 395-399.
- Fuguet E., Ràfols C., Bosch E., Rosés M., Abraham M.H. (2001). *"Solute-solvent interactions in micellar electrokinetic chromatography. Selectivity of lithium docetyl sulfate-lithium perfluorooctanesulfonate mixed-micellar buffers"*. Journal of Chromatography A, 907, 257-265.
- Fuguet E., Ràfols C., Bosch E., Abraham M.H. Rosés M. (2002). *"Solute-solvent interactions in micellar electrokinetic chromatography III. Characterization of the selectivity of micellar electrokinetic chromatography systems"*. Journal of Chromatography A, 942/1-2, 237-248.
- Fujita T., Iwasa J., Hansch C. (1964). *"A new substituent constant, π , derived from partition coefficients"*. Journal of the American Chemical Society, 86/23, 5175-5179.
- Gago F., Álvarez-Builla J., Elguero J., Díez-Masa J.C. (1987). *"Correlation of octanol/water partition coefficients with hydrophobicity measurements obtained by micellar chromatography"*. Analytical Chemistry, 59/6, 921-923.

- García M.A., Vera S., Bombin M., Marina M.L. (1993). "Optimization of the separation selectivity of a group of benzene and naphthalene derivatives in micellar high-performance liquid-chromatography using a C-18 column and alcohols as modifiers in the mobile-phase". *Journal of Chromatography*, 646/2, 297-305.
- García M.A., Marina M.L. (1994). "Study of the k' or $\log k' - \log P_{ow}$ correlation for a group of benzene derivatives and polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar liquid chromatography with a C₈ column". *Journal of Chromatography A*, 687/2, 233-239.
- García M.A., Díez-Masa J.C., Marina M.L. (1996). "Correlation between the logarithm of capacity factors for aromatic compounds in micellar electrokinetic chromatography and their octanol-water partition coefficients". *Journal of Chromatography A*, 742/(1-2), 251-256.
- García M.A., Vitha M.F., Marina M.L. (2000). "Linear solvation energy relationship study of retention in micellar liquid chromatography on a C₁₈ column using sodium dodecyl sulfate and cetyltrimethylammonium bromide mobile phases with alcohol modifiers". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 23/6, 873-895.
- García M.A., Vitha M.F., Sandquist J., Mulville K., Marina M.L. (2001). "Study of retention in micellar liquid chromatography on a C₈ column by the use of linear solvation energy relationships". *Journal of Chromatography A*, 918/1, 1-11.
- García-Domínguez J.A., Díez-Masa J.C. (2001). "Retention parameters in chromatography. IUPAC recommendations 2001. Part A. Hold-up volume concept in column chromatography". *Pure and Applied Chemistry*, 73/6, 969-992.
- Garg R., Kurup S., Hansch C. (2001). "Comparative QSAR: on the toxicology of the phenolic OH moiety". *Critical Reviews in Toxicology*, 31/2, 223-245.
- Geetha T., Singh S. (2000). "Applications of immobilized stationary-phase liquid chromatography: a potential in vitro technique". *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3/12, 406-416.
- Genty M. González G., Clere C., Desangle-Gouty V., Legendre J.Y. (2001). "Determination of the passive absorption through the rat intestine using chromatographic indices and molar volume". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12/3, 223-229.
- Gil-Agustí M., García-Álvarez-Coque M.C., Esteve-Romero J. (2000). "Correlation between hydrophobicity and retention data of several antihistamines in reversed-phase liquid chromatography with aqueous-organic and micellar-organic mobile phases". *Analytica Chimica Acta*, 421/1, 45-55.
- Goldberg L. (Editor) (1983). "Structure-activity correlation as a predictive tool in toxicology". Hemisphere Publishing, Washington D.C. (EE.UU.).



- González V., Rodríguez Delgado M.A., Sánchez M.J., García Montelongo F. **(1992)**. *"Solute-micelle association constants and correlation of octanol-water coefficients with hydrophobicity for polycyclic aromatic-hydrocarbons by micellar chromatography"*. *Chromatographia*, 34/(11-12), 627-635.
- Gottschalk I., Lagerquist C., Zuo S.S., Lundqvist A., Lundahl P. **(2002)**. *"Immobilized-biomembrane affinity chromatography for binding studies of membrane proteins"*. *Journal of Chromatography B*, 768/1, 31-40.
- Gramatica P., Corradi M., Consonni V. **(2000)**. *"Modelling and prediction of soil sorption coefficients of non-ionic organic pesticides by molecular descriptors"*. *Chemosphere*, 41/5, 763-777.
- Grover M., Singh B., Bakshi M., Singh S. **(2000)**. *"Quantitative structure-property relationships in pharmaceutical research-Part 1"*. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3/1, 28-35.
- Hage D.S., Austin J. **(2000)**. *"High-performance affinity chromatography and immobilized serum albumin as probes for drug- and hormone-protein binding"*. *Journal of Chromatography B*, 739/1, 39-54.
- Haky J.E., Vemulapalli S. **(1990)**. *"Comparison of octadecyl-bonded alumina and other stationary phases for lipophilicity estimation by high-performance liquid-chromatography"*. *Journal of Liquid Chromatography*, 13/15, 3111-3131.
- Hammett L.P. **(1937)**. *"The effect of structures upon the reactions of organic compounds. Benzene derivatives"*. *Journal of the American Chemical Society*, 59/1, 96-103.
- Hammett L.P. **(1940)**. *"Physical organic chemistry"*. McGraw-Hill, Nueva York (EE.UU.).
- Hanna M., de Biasi V., Bond B., Salter C., Hutt A.J., Camilleri P. **(1998)**. *"Estimation of the partitioning characteristics of drugs: A comparison of a large and diverse drug series utilizing chromatographic and electrophoretic methodology"*. *Analytical Chemistry*, 70/10, 2092-2099.
- Hanna M., de Biasi V., Bond B., Camilleri P., Hutt A.J. **(2000)**. *"Biomembrane lipids as components of chromatographic phases: Comparative chromatography on coated and bonded phases"*. *Chromatographia*, 52/(11-12), 710-720.
- Hansch C., Maloney P.P., Fujita T., Muir R.M. **(1962)**. *"Correlation of biological activity of phenoxyacetic acids with Hammett substituent constants and partition coefficients"*. *Nature (London)*, 194, 178-180.
- Hansch C., Fujita T. **(1964)**. *" ρ - σ - π Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure"*. *Journal of the American Chemical Society*, 86/8, 1616-1626.
- Hansch C., Anderson S.M. **(1967)**. *"Effect of intramolecular hydrophobic bonding on partition coefficients"*. *The Journal of Organic Chemistry*, 32/8, 2583-2586.

- Hansch C. (1969). "A quantitative approach to biochemical structure-activity relationships". *Accounts of Chemical Research*, 2/8, 232-239.
- Hansch C. (1971). "Quantitative structure-activity relationships in drug design" en Ariëns E.J. (Editor) "Drug design" (Volumen I). Academic Press, Nueva York (EE.UU.).
- Hansch C., Leo A. (Editores) (1979). "Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology". Wiley-Interscience, Nueva York (EE.UU.).
- Hansch. C. (Editor) (1990-a). "Comprehensive medicinal chemistry". "Quantitative drug design" (Volumen 4). Pergamon Press, Oxford (Reino Unido).
- Hansch. C. (Editor) (1990-b). "Comprehensive medicinal chemistry". "Cumulative subject index & drug compendium"(Volumen 6). Pergamon Press, Oxford (Reino Unido).
- Hansch C., Hoekman D., Gao H. (1996). "Comparative QSAR: toward a deeper understanding of chemicobiological interactions". *Chemical Reviews*, 96/3, 1045-1075.
- Hansen O.R. (1962). "Hammett series with biological activity". *Acta Chemica Scandinavica*, 16/7, 1593-1600.
- Hardman J.G., Limbird L.E., Molinoff P.B., Ruddon R.W., Goodman Gilman A. (Editores) (1996). "Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica". 9ª edición, McGraw-Hill Interamericana, Ciudad de México, (México).
- Hasegawa T., Takagi K., Nadai M., Miyamoto K. (1991). "Protein-binding of xantine derivatives to guinea-pig serum-albumin". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80/4, 349-352.
- He X., Ding Y., Li D., Lin B. (2004). "Recent advances in the study of biomolecular interactions by capillary electrophoresis". *Electrophoresis*, 25/(4-5), 697-711.
- Herbert B.J., Dorsey J.G. (1995). "n-Octanol water partition-coefficient estimation by micellar electrokinetic capillary chromatography". *Analytical Chemistry*, 67/4, 744-749.
- Hinze W.L. (1987). "Organized surfactant assemblies in separation science" en Hinze W.L., Armstrong D.W. (Editores) "Ordered media in chemical separations". ACS Symposium Series, 342, 2-82.
- Hinze W.L., Weber S.G. (1991). "Why the relationship between the logarithm of k' and homologue number in micellar chromatography is not linear". *Analytical Chemistry*, 63/17, 1808-1811.
- Hodson J., Williams N.A. (1988). "The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by high performance liquid chromatography". *Chemosphere*, 17/1, 67-77.
- Hong M., Weekley B.S., Grieb S.J., Foley J.P. (1998). "Electrokinetic chromatography using thermodynamically stable vesicles and mixed micelles formed from oppositely charged surfactants". *Analytical Chemistry*, 70/10, 1394-1403.

- Horváth C., Melander W., Molnár I. (1977). "Liquid-chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary phases". *Analytical Chemistry*, 49/1, 142-154.
- Hsieh M.M., Dorsey J.G. (1995). "Bioavailability estimation by reversed-phase liquid chromatography: high bonding density C-18 phases for modeling biopartitioning processes". *Analytical Chemistry*, 67/1, 48-57.
- Huang H., Wang X., Ou W., Zhao J., Shao Y., Wang L. (2003). "Acute toxicity of benzene derivatives to the tadpoles (*Rana japonica*) and QSAR analyses". *Chemosphere*, 53/8, 963-970.
- Ishihama Y., Oda Y., Uchikawa K., Asakawa N. (1994). "Correlation of octanol-water partition coefficients with capacity factors measured by micellar electrokinetic chromatography". *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 42/7, 1525-1527.
- Ishihama Y., Oda Y., Uchikawa K., Asakawa N. (1995). "Evaluation of solute hydrophobicity by microemulsion electrokinetic chromatography". *Analytical Chemistry*, 67/9, 1588-1595.
- Ishihama Y., Oda Y., Asakawa N. (1996-a). "A hydrophobicity scale based on the migration index from microemulsion electrokinetic chromatography of anionic solutes". *Analytical Chemistry*, 68/6, 1028-1032.
- Ishihama Y., Oda Y., Asakawa N. (1996-b). "Hydrophobicity of cationic solutes measured by electrokinetic chromatography with cationic microemulsions". *Analytical Chemistry*, 68/23, 4281-4284.
- Ishihama Y., Asakawa N. (1999). "Characterization of lipophilicity scales using vectors from solvation energy descriptors". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88/12, 1305-1312.
- Iwasa J., Fujita T., Hansch C. (1965). "Substituent constants for aliphatic functions obtained from partition coefficients". *Journal of Medicinal Chemistry*, 8/2, 150-153.
- Jandera P. (1984). "Reversed-phase liquid chromatography of homologous series : A general method for prediction of retention". *Journal of Chromatography A*, 314, 13-36.
- Jiménez O., Marina M.L. (1997). "Retention modeling in micellar liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 780/(1-2), 149-163.
- Jiménez Torres N.V., Casabó Alós V., Sancho Chust V. (Directores) (1997). "Manual de procedimientos para farmacocinética clínica". 1ª edición, AFAHPE-Fundación para el desarrollo clínico de la Farmacia, Valencia (España).
- Jiskra J., Claessens H.A., Cramers C.A., Kaliszan R. (2002). "Quantitative structure-retention relationships in comparative studies of behavior of stationary phases under high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography conditions". *Journal of Chromatography A*, 977/2, 193-206.

- Jinno K., Yokoyama Y. (1991). "Retention prediction for polymer additives in reversed-phase liquid-chromatography". *Journal of Chromatography*, 550(1-2), 325-334.
- Johnson B.P., Khaledi M.G., Dorsey J.G. (1986). "Solvatochromic solvent polarity measurements and retention in reversed-phase liquid chromatography". *Analytical Chemistry*, 58/12, 2354-2365.
- Kaibara A., Hohda C., Hirata N., Hirose M., Nakagawa T. (1990). "Evaluation of solute hydrophobicity by reversed-phase high-performance liquid-chromatography using aqueous binary mobile phases". *Chromatographia*, 29(5-6), 275-288.
- Kaliszan R. (1987). "Quantitative structure-chromatographic retention relationships". Wiley, Nueva York (EE.UU.).
- Kaliszan R., Blain R.W., Hartwick R.A. (1988-a). "A new HPLC method of hydrophobicity evaluation employing poly(butadiene)-coated alumina columns". *Chromatographia*, 25/1, 5-7.
- Kaliszan R., Petruszewicz J., Blain R.W., Hartwick R.A. (1988-b). "Determination of hydrophobicity parameters on polybutadiene-coated alumina and their application in quantitative structure-activity-relationships analysis". *Journal of Chromatography*, 458, 395-404.
- Kaliszan R. (1990). "High-performance liquid-chromatographic methods and procedures of hydrophobicity determination". *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 9/2, 83-87.
- Kaliszan R. (1992). "Quantitative structure-retention relationships". *Analytical Chemistry*, 64/11, 619A-631A.
- Kaliszan R. (1993). "Quantitative structure-retention relationships applied to reversed-phase high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 656, 417-435.
- Kaliszan R., Nasal A., Bucinski A. (1994). "Chromatographic hydrophobicity parameter determined on an immobilized artificial membrane column-relationships to standard measures of hydrophobicity and bioactivity". *European Journal of Medicinal Chemistry*, 29/2, 163-170.
- Kaliszan R., Nasal A., Turowski M. (1996). "Quantitative structure-retention relationships in the examination of the topography of the binding site of antihistamine drugs on α_1 -acid glycoprotein". *Journal of Chromatography A*, 722(1-2), 25-32.
- Kaliszan R., van Straten M.A., Markuszewski M., Cramers C.A., Claessens H.A. (1999-a). "Molecular mechanism of retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography and classification of modern stationary phases by using quantitative structure-retention relationships". *Journal of Chromatography A*, 855/2, 455-486.
- Kaliszan R. (1999-b). "Chromatography and capillary electrophoresis in modelling the basic process of drug action". *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 18/6, 400-410.

- Kaliszan R., Haber P., Baczek T., Siluk D. (2001). "Gradient HPLC in the determination of drug lipophilicity and acidity". *Pure and Applied Chemistry*, 73/9, 1465-1475.
- Kaliszan R., Nasal A., Markuszewski M.J. (2003). "New approaches to chromatographic determination of lipophilicity of xenobiotics". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377/5, 803-811.
- Karcher W., Karabunarliev S. (1996). "The use of computer based structure-activity relationships in the risk assessment of industrial chemicals". *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 36/4, 672-677.
- Karelson M., Lobanov V.S. (1996). "Quantum-chemical descriptors in QSAR/QSPR studies". *Chemical Reviews*, 96/3, 1027-1043.
- Kelly K.A., Burns S.T., Khaledi M.G. (2001). "Prediction of retention in micellar electrokinetic chromatography from solute structure. 1. Sodium dodecyl sulphate micelles". *Analytical Chemistry*, 73/24, 6057-6062.
- Khaledi M.G., Peuler E., Negh-Ngwainbi J. (1987). "Retention behaviour of homologous series in reversed-phase liquid chromatography using micellar, hydro-organic, and hybrid mobile phases". *Analytical Chemistry*, 59/23, 2738-2747.
- Khaledi M.G. (1988-a). "Hydrophobic selectivity in micellar and hydroorganic reversed-phase liquid-chromatography". *Analytical Chemistry*, 60/9, 876-887.
- Khaledi M.G. (1988-b). "Bioanalytical capabilities of micellar liquid-chromatography". *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 7/8, 293-300.
- Khaledi M.G., Breyer E.D. (1989). "Quantitation of hydrophobicity with micellar liquid-chromatography". *Analytical Chemistry*, 61/9, 1040-1047.
- Khaledi M.G., Rodgers A.H. (1990-a). "Micellar-mediated shifts of ionization-constants of amino-acids and peptides". *Analytica Chimica Acta*, 239/1, 121-128.
- Khaledi M.G., Strasters J.K., Rodgers A.H., Breyer E.D. (1990-b). "Simultaneous enhancement of separation selectivity and solvent strength in reversed-phase liquid-chromatography using micelles in hydro organic-solvents". *Analytical Chemistry*, 62/2, 130-136.
- Khaledi M.G. (1997). "Micelles as separation media in high-performance liquid-chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview". *Journal of Chromatography A*, 780/(1-2), 3-40.
- Khaledi M.G., Bumgarner J.G., Hadjmohammadi M. (1998). "Characterization of mixed micellar pseudostationary phases in electrokinetic chromatography using linear solvation energy relationships". *Journal of Chromatography A*, 802, 35-47.

- Kiridena W., Poole C.F. (1998). "Structure-driven retention model for solvent selection and optimization in reversed-phase thin-layer chromatography". *Journal of Chromatography A*, 802/2, 335-347.
- Kiridena W., Poole C.F. (1999). "Structure-driven retention model for method development in reversed-phase thin-layer chromatography on octadecylsiloxane-bonded layers". *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 12/1, 13-25.
- Kirkbright G.F., Mullins F.G.P. (1984). "Separation of dithiocarbamates by high-performance liquid-chromatography using a micellar mobile phase". *Analyst*, 109/4, 493-496.
- Kirkman C.M., Cheng Z.B., Uden P.C., Stratton W.J., Henderson D.E. (1984). "Developments in the high-performance liquid-chromatography of metallo-organic compounds". *Journal of Chromatography*, 317, 569-578.
- Klein W., Kördel W., Weiß M., Poremski H.J. (1988). "Updating of the OECD test guideline 107 «partition coefficient n-octanol/water». OECD Laboratory intercomparison test on the HPLC method". *Chemosphere*, 17/2, 361-386.
- Klimeš J., Klimešová V., Waisser K. (1991). "Chromatographic behaviour of dipyridylsulphides. Relationship between log*k'* values and structure by reversed-phase high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 595/(1-2), 334-336.
- Klotz W.L., Schure M.R., Foley J.P. (2001). "Determination of octanol-water partition coefficients of pesticides by microemulsion electrokinetic chromatography". *Journal of Chromatography A*, 930/(1-2), 145-154.
- Klotz W.L., Schure M.R., Foley J.P. (2002). "Rapid estimation of octanol-water partition coefficients using synthesized vesicles in electrokinetic chromatography". *Journal of Chromatography A*, 962/(1-2), 207-219.
- Könemann H. (1981). "Quantitative structure-activity-relationships in fish toxicity studies. Part 1: relationship for 50 industrial pollutants". *Toxicology*, 19/3, 209-221.
- Korolkovas A., Burckhalter J.H. (1983). "Compendio esencial de química farmacéutica". Versión Española: Granados Jarque R., Bosch Cartes J., Editorial Reverté, S.A., Barcelona (España).
- Kraak J.C., Vanrooij H.H., Thus J.L.G. (1986). "Reversed-phase ion-pair systems for the prediction of normal-octanol-water partition-coefficients of basic compounds by high-performance liquid-chromatography". *Journal of Chromatography*, 352, 455-463.
- Kubinyi H. (2002). "From narcosis to hyperspace: the history of QSAR". *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 21, 348-356.

- Lambert W.J., Wright L.A. **(1989)**. *"Prediction of alkane water partition-coefficients using a C₁₈ derivatized polystyrene divinylbenzene stationary phase"*. Journal of Chromatography, 464/2, 400-404.
- Lambert W.J., Wright L.A., Stevens J.K. **(1990)**. *"Development of a preformulation lipophilicity screen utilizing a C-18-derivatized polystyrene-divinylbenzene high-performance liquid-chromatographic (HPLC) column"*. Pharmaceutical Research, 7/6, 577-586.
- Landy J.S., Dorsey J.G. **(1984)**. *"Rapid gradient capabilities of micellar liquid-chromatography"*. Journal of Chromatographic Science, 22/2, 68-70.
- Landy J.S., Dorsey J.G. **(1985)**. *"Characterization of micellar mobile phases for reversed-phase chromatography"*. Analytica Chimica Acta, 178/2, 179-188.
- Lanin S.N., Nikitin Y.S. **(1991)**. *"Molecular interactions in liquid chromatography"*. Journal of Chromatography A, 537, 33-49.
- Lavine B.K., Whitte A.J., Han J.H. **(1991)**. *"Solute retention in micellar liquid chromatography"*. Journal of Chromatography A, 542, 29-40.
- Leo A., Hansch C., Elkins D. **(1971)**. *"Partition coefficients and their uses"*. Chemical Reviews, 71/6, 525-616.
- Leo A. **(1983)**. *"The octanol water partition-coefficient of aromatic solutes: the effect of electronic interactions, alkyl chains, hydrogen-bonds, and ortho-substitution"*. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2, 6, 825-838.
- Leo A. **(2000)**. *"Octanol/water partition coefficients"* en Boethling R.S., Mackay D. (Editores) *"Handbook of property estimation methods for chemicals"*. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida (EE.UU).
- Lepetit G. **(1977)**. *"pH-dependent lipid solubility of drugs"*. Pharmazie, 32/5, 289-291.
- Lin Z., Zhong P., Yin K., Wang L., Yu H. **(2003)**. *"Quantification of joint effect for hydrogen bond and development of QSARs for predicting mixture toxicity"*. Chemosphere, 52/7, 1199-1208.
- Liu X.Y., Nakamura C., Yang Q., Kamo N., Miyake J. **(2002)**. *"Immobilized liposome chromatography to study drug-membrane interactions. Correlation with drug absorption in humans"*. Journal of Chromatography A, 961/1, 113-118.
- Lombardo F., Shalaeva M.Y., Tupper K.A., Gao F., Abraham M.H. **(2000)**. *"ElogP(oct): A tool for lipophilicity determination in drug discovery"*. Journal of Medicinal Chemistry, 43/15, 2922-2928.

- Lombardo F., Shalaeva M.Y., Tupper K.A., Gao F. (2001). "ElogD(oct): A tool for lipophilicity determination in drug discovery. 2. Basic and neutral compounds". *Journal of Medicinal Chemistry*, 44/15, 2490-2497.
- Lu G.H., Yuan X., Zhao Y.H. (2001). "QSAR study on the toxicity of substituted benzenes to the algae (*Scenedesmus obliquus*)". *Chemosphere*, 44/3, 437-440.
- Lüllmann H., Mohr K., Ziegler A., Bieger D. (2000). "Color Atlas of Pharmacology". 2ª edición, Thieme Stuttgart, Nueva York (EE.UU.).
- Lundahl P., Zeng C.M., Hagglund C.L., Gottschalk I., Greijer E. (1999). "Chromatographic approaches to liposomes, proteoliposomes and biomembrane vesicles". *Journal of Chromatography B*, 722/(1-2), 103-120.
- Mackay D., Fraser A. (2000). "Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models". *Environmental Pollution*, 110/3, 375-391.
- Mailhot H. (1987). "Prediction of algal bioaccumulation and uptake rate of 9 organic compounds by 10 physicochemical properties". *Environmental Science & Technology*, 21/10, 1009-1013.
- Marcinkiewicz S., Green J. (1963). "Paper chromatography and chemical structure : VII. The separation of meta- and para-derivatives of benzene". *Journal of Chromatography*, 10/3, 372-388.
- Marina M.L., García M.A. (1994). "Micellar liquid chromatography with hybrid eluents". *Journal of Liquid Chromatography*, 17/5, 957-980.
- Marina M.L., García M.A., Pastor M., Vera S. (1995). "A statistical study of the correlation between k' or $\log k'$ and $\log P_{ow}$ for a group of benzene and naphthalene derivatives in micellar liquid-chromatography using a C_{18} column". *Chromatographia*, 40/(3-4), 185-192.
- Marqusee J.A., Dill K.A. (1986). "Solute partitioning into chain molecule interphases-monolayers, bilayer-membranes, and micelles". *Journal of Chemical Physics*, 85/1, 434-444.
- Martin A.J.P., Syngé R.L.M. (1941). "A new form of chromatography employing two liquid phases: 1. A theory of chromatography 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins". *Biochemical Journal*, 35, 1358-1368.
- Martín-Biosca Y., Molero-Monfort M., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. (1999). "Development of predictive retention-activity relationship models of antipsychotic drugs by micellar liquid chromatography". *Biomedical Chromatography*, 13/7, 478-492.
- Martín-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. (2000-a). "Determination of phenobarbital in plasma by micellar liquid chromatography". *Biomedical Chromatography*, 14/2, 113-117.



- Martín-Biosca Y., Molero-Monfort M., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. **(2000-b)**. *"Development of predictive retention-activity relationship models of barbiturates by micellar liquid chromatography"*. Quantitative Structure-Activity Relationships, 19/3, 247-256.
- Martín-Biosca Y., Molero-Monfort M., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. **(2001)**. *"Development of predictive retention-activity models of butyrophenones by biopartitioning micellar chromatography"*. Biomedical Chromatography, 15/5, 334-341.
- Martín-Biosca Y., Molero-Monfort M., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. **(2003)**. *"Rapid in vitro test to predict ocular tissue permeability based on biopartitioning micellar chromatography"*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 20/2, 209-216.
- Martínez-Pla J.J., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. **(2001)**. *"Retention-property relationships of anticonvulsant drugs by biopartitioning micellar chromatography"*. Journal of Chromatography B, 757/1, 89-99.
- Martínez-Pla J.J., Martín-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. **(2003)**. *"Biopartitioning micellar chromatography to predict skin permeability"*. Biomedical Chromatography, 17/8, 530-537.
- Martínez-Pla J.J., Escuder-Gilabert L., Bermúdez-Saldaña J.M., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. **(2004)**. *"High-throughput drug pharmacokinetic profile estimation by biopartitioning micellar chromatography"*. The 11th International Workshop on Quantitative Structure-Activity Relationships in the Human Health and Environmental Sciences (QSAR 2004), Liverpool, Reino Unido. Abstract Book, Página 43.
- Massart D.L., Vandeginste B.G.M, Buydens L.M.C., Lewi P.J., Smeyers-Verbeke J. **(1997)**. *"Handbook of Chemometrics and Qualimetrics"*. Elsevier, Amsterdam (Holanda).
- Maxwell D.R., Taylor E.M., Gray W.R. **(1961)**. *"Relative activity of some inhibitors of mono-amine oxidase in potentiating action of tryptamine in vitro and in vivo"*. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy, 17/3, 310-320.
- McNaught A.D., Wilkinson A. **(2003)**. *"Compendio de terminología química. Recomendaciones de la IUPAC"*. 2ª edición. Versión Española: Senent Pérez S., Rodríguez Renuncio J.A., Armesto Vilas D., González de Amézua Carrión M., Pando García-Pumarino C., Editorial Síntesis, Madrid (España).
- Medina-Hernández M.J., García Álvarez-Coque M.C. **(1992)**. *"Solute-mobile phase and solute-stationary phase interactions in micellar liquid chromatography. A review"*. The Analyst, 117/5, 831-837.

- Medina-Hernández M.J., Bonet-Domingo E., Ramis-Ramos G., García Álvarez-Coque M.C. (1993). "On the retention of diuretics in micellar liquid-chromatography and their site of action within the nephron". *Analytical Letters*, 26/9, 1881-1889.
- Medina-Hernández M.J., Catalá-Icardo M., García Álvarez-Coque M.C. (1995-a). "Correlation between hydrophobicity of amino acids and retention data in reversed-phase liquid chromatography with micellar eluents". *Chromatographia*, 41/(7-8), 455-461.
- Medina-Hernández M.J., Sagrado S. (1995-b). "Chromatographic quantification of hydrophobicity using micellar mobile phases". *Journal of Chromatography A*, 718/2, 273-282.
- Méndez A., Bosch E., Rosés M., Neue U.D. (2003). "Comparison of the acidity of residual silanol groups in several liquid chromatography columns". *Journal of Chromatography A*, 986/1, 33-44.
- Meyer H.H. (1899). "Zur theorie der alkoholnarkose. I. Welche eigenschaft der anestetica bedingt ihre narkotische wirkung?". *Archiv for Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 42, 109-118.
- Meylan W.M., Howard P.H., Aronson D., Printup H., Gouchie S. (1997). "Improved method for estimating bioconcentration factor (BCF) from octanol-water partition coefficient". Documento preparado por la "Syracuse Research Corporation"(SRC) para la "US Environmental Protection Agency", SRC-TR-97-006 (2ª actualización), Syracuse Research Corporation, Environmental Science Center, Nueva York (EE.UU.).
- Meylan W.M., Howard P.H., (1999-a). "User's guide for PCKOCWIN, version 1.6. Soil adsorption coefficient (K_{oc}) program for Microsoft Windows". Syracuse Research Corporation, Environmental Science Center, Nueva York (EE.UU.).
- Meylan W.M., Howard P.H., (1999-b). "User's guide for the ECOSAR Class Program, MS-Windows version 0.99e". Syracuse Research Corporation, Environmental Science Center, Nueva York (EE.UU.).
- Meylan W.M., Howard P.H., (1999-c). "User's guide for DERMWIN, version 1.4. Dermal Permeability coefficient estimation program for Microsoft Windows". Syracuse Research Corporation, Environmental Science Center, Nueva York (EE.UU.).
- Meylan W.M., Howard P.H., Boethling R.S., Aronson D., Printup H., Gouchie S. (1999-d). "Improved method for estimating bioconcentration/bioaccumulation factor from octanol/water partition coefficient". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18/4, 664-672.
- Michels J.J., Dorsey J.G. (1990). "Estimation of the reversed-phase liquid-chromatographic lipophilicity parameter $\log k'_w$ using ET-30 solvatochromism". *Journal of Chromatography*, 499, 435-451.

- Minick D.J., Frenz J.H., Patrick M.A., Brent D.A. **(1988)**. *"A comprehensive method for determining hydrophobicity constants by reversed-phase high-performance liquid chromatography"*. Journal of Medicinal Chemistry, 31/10, 1923-1933.
- Mirrlees M.S., Moulton S.J., Murphy C.T., Taylor P.J. **(1976)**. *"Direct measurement of octanol-water partition-coefficients by high-pressure liquid-chromatography"*. Journal of Medicinal Chemistry, 19/5, 615-619.
- Miyake K., Terada H. **(1978)**. *"Preparation of a column with octanol-like properties for high-performance liquid-chromatography - direct measurements of partition-coefficients in an octanol-water system"*. Journal of Chromatography, 157, 386-390.
- Miyake K., Kitaura F., Mizuno N., Terada H. **(1987)**. *"Determination of partition-coefficient and acid dissociation-constant by high-performance liquid-chromatography on porous polymer gel as a stationary phase"*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 35/1, 377-388.
- Miyake K., Mizuno N., Terada H. **(1988)**. *"Effect of hydrogen-bonding on the high-performance liquid-chromatographic behavior of organic-compounds - relationship between capacity factors and partition-coefficients"*. Journal of Chromatography, 439/2, 227-235.
- Moaddel R., Lu L., Baynham M., Wainer I.W. **(2002)**. *"Immobilized receptor- and transporter-based liquid chromatographic phases for on-line pharmacological and biochemical studies: a mini-review"*. Journal of Chromatography B, 768/1, 41-53.
- Molero-Monfort M., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. **(1999)**. *"Retention-activity relationship studies of benzodiazepines by micellar liquid chromatography"*. Biomedical Chromatography, 13/6, 394-400.
- Molero-Monfort M., Martín-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. **(2000)**. *"Micellar liquid chromatography for prediction of drug transport"*. Journal of Chromatography A, 870/(1-2), 1-11.
- Molero-Monfort M., Escuder-Gilabert L., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S., Medina-Hernández M.J. **(2001)**. *"Biopartitioning micellar chromatography: an in vitro technique for predicting human drug absorption"*. Journal of Chromatography B, 753/2, 225-236.
- Mullins F.G.P., Kirkbright G.F. **(1984)**. *"Determination of inorganic anions by high-performance liquid-chromatography using a micellar mobile phase"*. Analyst, 109/9, 1217-1221.
- Mullins F.G.P., Kirkbright G.F. **(1986)**. *"Selectivity and efficiency measurements in high-performance liquid-chromatography using micellar hexadecyltrimethylammonium bromide in the mobile phase"*. Analyst, 111/11, 1273-1279.

- Nasal A., Sznitowska M., Bucinski A., Kaliszan R. (1995). "Hydrophobicity parameter from high-performance liquid-chromatography on an immobilized artificial membrane column and its relationship to bioactivity". *Journal of Chromatography A*, 692(1-2), 83-89.
- Nasal A., Siluk D., Kaliszan R. (2003). "Chromatographic retention parameters in medicinal chemistry and molecular pharmacology". *Current Medicinal Chemistry*, 10, 381-426.
- Nawrocki J. (1997). "The silanol group and its role in liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 779(1-2), 29-71.
- Nendza M., Volmer J., Klein W. (1990). "Risk assessment based upon QSAR estimates" en Karcher W., Devillers J. (Editores) "Practical applications of quantitative structure-activity relationships (QSAR) in environmental Chemistry and Toxicology". Kluwer Publishing, Dordrecht (Holanda).
- Netzeva T.I., Schultz T.W., Aptula A.O., Cronin M.T.D. (2003). "Partial least squares modelling of the acute toxicity of aliphatic compounds to *Tetrahymena pyriformis*". SAR and QSAR in Environmental Research, 14(4), 265-283.
- NTP reports. National Toxicology Program. U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health's National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS). <http://ntp-server.niehs.nih.gov/>.
- Nys G.G., Rekker R.F. (1973). "Statistical-analysis of a series of partition-coefficients with special reference to predictability of folding of drug molecules - introduction of hydrophobic fragmental constants (*f* values)". *Chimica Therapeutica*, 8/5, 521-535.
- Nys G.G., Rekker R.F. (1974). "Concept of hydrophobic fragment constant (*f*-value) II. Extension of its applicability to calculation of lipophilicities of aromatic and heteroaromatic structures". *European Journal of Medicinal Chemistry*, 9/4, 361-375.
- Oddis J.A. (1984). "Drug Information 84". American Society of Hospital Pharmacist, Bethesda (EE.UU.).
- OECD (1995). "OECD Guidelines for the testing of chemicals. Section 1: physical-chemical properties. Test N° 107: partition coefficient (*n*-octanol/water): shake flask method". Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Francia).
- OECD (2000). "OECD Guidelines for the testing of chemicals. Section 1: physical-chemical properties. Test N° 122: partition coefficient (*n*-octanol/water): pH-metric method for ionisable substances". Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Francia).
- OECD (2002). "OECD Guidelines for the testing of chemicals. Section 1: physical-chemical properties. Test N° 117: partition coefficient (*n*-octanol/water): HPLC method". Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris (Francia).

- OPPTS 830.7570 **(1995)**. *"Partition coefficient (n-octanol/H₂O), estimation by liquid chromatography"*. Products Properties Test Guidelines, Environmental Protection Agency (EE.UU.). Publication Number 712-C-96-040. http://www.epa.gov/docs/OPPTS_Harmonized/830_Product_Properties_Test_Guidelines/Drafts/
- Overton E. **(1901)**. *"Studien über die narkose, zugleich ein beitrage zur allgemeinen pharmakologie"*. Verlag von Guston Fischer, Jena (Alemania).
- Park J.H., Carr P.W., Abraham M.H, Taft R.W, Doherty R.M, Kamlet M.J. **(1988)**. *"Solute-solvent interactions in chemistry and biology. 5. Some observations regarding different retention properties of hplc stationary phases"*. *Chromatographia*, 25/5, 373-381.
- Pehourcq F., Jarry C., Bannwarth B. **(2003)**. *"Potential of immobilized artificial membrane chromatography for lipophilicity determination of arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs"*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33/2, 137-144.
- PHYSPROP Database. On-line interactive demo version of PHYSPROP. The Physical Properties Database. Syracuse Research Cooperation. <http://www.syrres.com/esc/physdemo.htm>.
- Pidgeon C., Venkataram U.V. **(1989)**. *"Immobilized artificial membrane chromatography-supports composed of membrane-lipids"*. *Analytical Biochemistry*, 176/1, 36-47.
- Pidgeon C., Ong S., Choi H., Llu H. **(1994)**. *"Preparation of mixed ligand immobilized artificial membranes for predicting drug binding to membranes"*. *Analytical Chemistry*, 66/17, 2701-2709.
- Pidgeon C., Ong S., Liu H., Qiu X., Pidgeon M., Dantzing A.H., Munroe J., Hornback W.J., Kasher J.S., Glunz L., Szczerba T. **(1995)**. *"IAM chromatography: an in vitro screen for predicting drug membrane permeability"*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38/4, 590-594.
- Platts J.A., Abraham M.H., Butina D., Hersey A. **(2000)**. *"Estimation of molecular linear free energy relationship descriptors by a group contribution approach. 2. Prediction of partition coefficients"*. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 40/1, 71-80.
- Platts J.A., Abraham M.H., Zhao Y.H., Hersey A., Ijaz L., Butina D. **(2001)**. *"Correlation and prediction of a large blood-brain distribution data set-an LFER study"*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 36, 719-730.
- Pliska V., Testa B., van de Waterbeemed (Editores) **(1995)**. *"Lipophilicity in drug action and toxicology"*. VCH Publishers, Weinheim (Alemania).
- Poole C.F., Poole S.K. **(1997)**. *"Interphase model for retention and selectivity in micellar electrokinetic chromatography"*. *Journal of Chromatography A*, 792/(1-2), 89-104.
- Poole C.F., Dias N.C. **(2000)**. *"Practitioner's guide to method development in thin-layer chromatography"*. *Journal of Chromatography A*, 892/(1-2), 123-142.

- Poole S.K., Durham D., Kibbey C. (2000). "Rapid method for estimating the octanol-water partition coefficient ($\log P_{ow}$) by microemulsion electrokinetic chromatography". Journal of Chromatography B, 745/1, 117-126.
- Poole S.K., Poole C.F. (2003-a). "Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients". Journal of Chromatography B, 797/(1-2), 3-19.
- Poole S.K., Patel S., Dehring K., Workman H., Dong J. (2003-b). "Estimation of octanol-water partition coefficients for neutral and weakly acidic compounds by microemulsion electrokinetic chromatography using dynamically coated capillary columns". Journal of Chromatography B, 793/2, 265-274.
- Pramauro E. (1990). "Els pesticides i el medi ambient". Servei de Publicacions de la Universitat de València, Valencia (España).
- Puricelli E.C.M., Leguizamón E.S (2002). "Herbicidas hormonales". Catedra de malezas. Universidad Nacional de Rosario. http://www.fcagr.unr.edu.ar/malezas/Apuntes/Herbicidas_Hormonales.doc.
- Quiñones-Torrel C., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. (1999). "Development of predictive retention-activity relationship models of tricyclic antidepressants by micellar liquid chromatography". Journal of Medicinal Chemistry, 42/16, 3154-3162.
- Quiñones-Torrel C., Sagrado-Vives S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. (2001). "An LD_{50} model for predicting psychotropic drug toxicity using biopartitioning micellar chromatography". Biomedical Chromatography, 15/1, 31-40.
- Quiñones-Torrel C., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. (2002-a). "Opioid analgetics retention-pharmacologic activity models using biopartitioning micellar chromatography". Journal of Chromatography B, 766/2, 265-277.
- Quiñones-Torrel C., Martín-Biosca Y., Martínez-Pla J.J., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. (2002-b). "QRAR models for central nervous system drugs using biopartitioning micellar chromatography". Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2/2, 145-161.
- Rand G.M. (Editor) (1995). "Fundamentals of aquatic toxicology". 2ª edición, Taylor & Francis Publishers, North Palm Beach, Florida (EE.UU.).
- Rapado-Martínez I., García Álvarez-Coque M.C., Villanueva-Camañas R.M. (1997). "Liquid chromatographic procedure for the evaluation of beta-blockers in pharmaceuticals using hybrid micellar mobile phases". Journal of Chromatography A, 765/2, 221-231.
- Rapado-Martínez I., Villanueva-Camañas R.M., García Álvarez-Coque M.C. (1999). "Micellar liquid chromatography: a worthy technique for the determination of -antagonists in urine samples". Analytical Chemistry, 71/2, 319-326.

- Reddy K., Locke M. (1996). "Molecular properties as descriptors of octanol-water partition coefficients of herbicides". *Water, Air and Soil Pollution*, 86, 389-405.
- Reichel A., Begley D.J. (1998). "Potential of immobilized artificial membranes for predicting drug penetration across the blood-brain barrier". *Pharmaceutical Research*, 15/8, 1270-1274.
- Rekker R.F., Mannhold R. (1992). "Calculation of drug lipophilicity. The hydrophobic fragmental constant approach". VCH, Weinheim (Alemania).
- Ren S.J., Schultz T.W. (2002). "Identifying the mechanism of aquatic toxicity of selected compounds by hydrophobicity and electrophilicity descriptors". *Toxicology Letters* 129/(1-2), 151-160.
- Repetto G. (1995). "Recientes avances en la validación y aceptación de métodos alternativos". *Revista de Toxicología*, 12, 3-9.
- Repetto M., Sanz P. (1995-a). "Fundamentos de ecotoxicología" en Repetto M. (Editor) "Toxicología Avanzada". Diaz de Santos, Madrid (España).
- Repetto M., Martínez D., San P. (1995-b). "Actualización de la toxicología de los plaguicidas" en Repetto M. (Editor) "Toxicología Avanzada". Diaz de Santos, Madrid (España).
- Reynolds J.E.F. (Editor) (1982). "Martindale. The extra pharmacopoeia". 28ª edición, The Pharmaceutical Press, Londres (Reino Unido).
- Richardsorn B.J. (1869). *Medical Times and Gazette*, 2, 703.
- Richet M.C. (1893). "Noté sur le rapport entre la toxicité et les propriétés physiques des corps". *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales*, 45, 775-776.
- Riekkola M.L., Jönsson J.Å., Smith R.M. (2004). "Terminology for analytical capillary electromigration techniques. IUPAC recommendations 2003". *Pure and Applied Chemistry*, 76/2, 443-451.
- Riley C.M., Tomlinson E., Jefferies T.M. (1979). "Functional-group behavior in ion-pair reversed-phase high-performance liquid-chromatography using surface-active pairing ions". *Journal of Chromatography*, 185, 197-224.
- Rittich B., Pirochtová M. (1990). "Chromatographic behaviour of aromatic acids in reversed-phase high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography*, 523, 227-233.
- Rittich B., Pirochtová M., Hrib J., Jurtikova K., Dolezal P. (1992). "The antifungal activity of some aliphatic and aromatic acids". *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 57/5, 1134-1142.
- Riu J., Rius F.X. (1996). "Assessing the accuracy of analytical methods using linear regression with errors in both axes". *Analytical Chemistry*, 68/11, 1851-1857.

- Rodgers A.H., Khaledi M.G. (1994). "Influence of pH on retention and selectivity in micellar liquid chromatography: consequences of micellar-induced shifts of ionization constants". *Analytical Chemistry*, 66/3, 327-334.
- Rogers K.S., Cammarata A. (1969). "Superdelocalizability and charge density. A correlation with partition coefficients". *Journal of Medicinal Chemistry*, 12/4, 692-693.
- Rodríguez Delgado M.A., Sánchez M.J., González V., García Montelongo F. (1993). "Correlations between retention data of polycyclic aromatic-hydrocarbons in micellar liquid-chromatography and several molecular descriptors". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 345/12, 748-752.
- Rosés M., Canals I., Allemann H., Siigur K., Bosch E. (1996). "Retention of ionizable compounds on HPLC. 2. Effect of pH, ionic strength and mobile phase composition on the retention of weak acids". *Analytical Chemistry*, 68/23, 4094-4100.
- Rosés M., Ràfols C, Bosch E., Martínez A.M., Abraham MH (1999). "Solute-solvent interactions in micellar electrokinetic chromatography. Characterization of sodium dodecyl sulfate-Brij 35 micellar systems for quantitative structure-activity relationship modelling". *Journal of Chromatography A*, 845/(1-2), 217-226.
- Rosés M., Oumada F.Z., Bosch E. (2001). "Retention of ionizable compounds on high-performance liquid chromatography VII. Characterization of the retention of ionic solutes in a C₁₈ column by mass spectrometry with electrospray ionization". *Journal of Chromatography A*, 910/2, 187-194.
- Rosés M., Bosch E. (2002). "Influence of mobile phase acid-base equilibria on the chromatographic behaviour of protolytic compounds". *Journal of Chromatography A*, 982/1, 1-30.
- Rosés M. (2004). "Determination of the pH of binary mobile phases for reversed-phase liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 1037/(1-2), 283-298.
- Salminen T., Pulli A., Taskinen J. (1997). "Relationship between immobilised artificial membrane chromatographic retention and the brain penetration of structurally diverse drugs". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15/4, 469-477.
- Sanchis-Mallols J.M., Villanueva-Camañas R.M., Sagrado S., Medina-Hernández M.J. (1997). "Quantitative retention-structure and retention-activity relationships studies of ionic and non-ionic catecholamines by micellar liquid chromatography". *Chromatographia*, 11/12, 605-612.
- Sándi Á. Nagy M., Szepesy L. (2000). "Characterization of reversed-phase columns using linear free energy relationship III. Effect of the organic modifier and the mobile phase composition". *Journal of Chromatography A*, 893, 215-234.

- Sangster J. (1989). "*Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds*". Journal of Physical and Chemical Reference Data, 18/3, 1111-1229.
- Sangster J. (1997). "*Octanol-water partition coefficients: Fundamentals and physical chemistry*". Wiley, Nueva York (EE.UU.).
- Scherrer R.A., Howard S.M. (1977). "*Use of distribution coefficients in quantitative structure-activity relationships*". Journal of Medicinal Chemistry, 20/1, 53-58.
- Schoenmakers P.J., Billiet H.A.H., Tijssen R., De Galan L. (1978). "*Gradient selection in reversed-phase liquid-chromatography*". Journal of Chromatography, 149, 519-537.
- Schoenmakers P.J., Billiet H.A.H., De Galan L. (1981). "*Systematic study of ternary solvent behavior in reversed-phase liquid-chromatography*". Journal of Chromatography, 218, 261-284.
- Schorderet M. (Director) (1988). "*Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*". Editions Slatkine, Genève (Suiza).
- Schultz T.W., Cronin M.T.D., Walker J.D., Aptula A.O. (2003-a). "*Quantitative structure-activity relationships (QSARs) in toxicology: a historical perspective*". Journal of Molecular Structure-THEOCHEM, 622/(1-2), 1-22.
- Schultz T.W., Cronin M.T.D., Netzeva T.I. (2003-b). "*The present status of QSAR in toxicology*". Journal of Molecular Structure-THEOCHEM, 622/(1-2), 23-38.
- Schwarzenbach R.M., Gschwend P.M., Imboden D.M. (1993). "*Environmental organic chemistry*". John Wiley & Sons, Nueva York (EE.UU.).
- Seiler P. (1974). "*Simultaneous determination of partition-coefficient and acidity constant of a substance*". European Journal of Medicinal Chemistry, 9/6, 663-665.
- Sherblom P.M., Eganhouse R.P. (1988). "*Correlations between octanol-water partition coefficients and reversed-phase high-performance liquid chromatography capacity factors: Chlorobiphenyls and alkylbenzenes*". Journal of Chromatography A, 454, 37-50.
- Smith J.T., Vinjamoori D.V. (1995). "*Rapid determination of logarithmic partition-coefficients between n-octanol and water using micellar electrokinetic capillary chromatography*". Journal of Chromatography B-Biomedical Applications, 669/1, 59-66.
- Snyder L.R., Dolan J.W., Gant J.R. (1979). "*Gradient elution in high-performance liquid-chromatography .1. Theoretical basis for reversed-phase systems*". Journal of Chromatography, 165/1, 3-30.
- Soczewiński E., Wachtmeister C.A. (1962). "*The relation between the composition of certain ternary two-phase solvent systems and R_M values*". Journal of Chromatography, 7/3, 311-320.

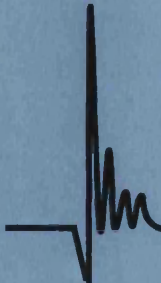
- Stewart B.H., Chan O.H. (1998-a). "Use of immobilized artificial membrane chromatography for drug transport applications". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87/12, 1471-1478.
- Stewart B.H., Chung F.Y., Tait B., John C., Chan O.H. (1998-b). "Hydrophobicity of HIV protease inhibitors by immobilized artificial membrane chromatography: application and significance to drug transport". *Pharmaceutical Research*, 15/9, 1401-1406.
- Stratton L.P., Hynes J.B., Priest D.G., Doig M.T., Barron D.A., Asleson G.L. (1986). "Micellar high-performance liquid-chromatographic determination of folic acid polyglutamate hydrolase activity". *Journal Of Chromatography*, 357/1, 183-189.
- Szabó G., Gucci J., Kördel W., Zsolnay A., Major V., Keresztes P. (1999). "Comparison of different HPLC stationary phases for determination of soil-water distribution coefficient, K_{oc} values of organic chemicals in RP-HPLC system". *Chemosphere*, 39/3, 431-442.
- Taillardat-Bertschinger A., Carrupt P.A., Barbato F., Testa B. (2003). "Immobilized artificial membrane HPLC in drug research". *Journal of Medicinal Chemistry*, 46/5, 655-665.
- Taft R.W. (1952). "Polar and steric substituent constants for aliphatic and o-benzoate groups from rates of esterification and hydrolysis of esters". *Journal of the American Chemical Society*, 74/12, 3120-3128.
- Taft R.W. (1956). "Separation of polar, steric and resonance effects in reactivity" en Newman M.S. (Editor) "Steric effects in organic chemistry". Wiley, Nueva York (EE.UU.), 556-675.
- Takeda S., Wakida S., Yamane M., Kawahara A., Higashi K. (1993). "Migration behavior of phthalate-esters in micellar electrokinetic chromatography with or without added methanol". *Analytical Chemistry*, 65/18, 2489-2492.
- Tan L.C., Carr P.W. (1998). "Study of retention in reversed-phase liquid chromatography using linear solvation energy relationships II. The mobile phase". *Journal of Chromatography A*, 799/(1-2), 1-19.
- Tanaka A., Nakamura K., Nakanishi I., Fujiwara H. (1994). "A novel and useful descriptor for hydrophobicity, partition coefficient micellar-water, and its application to a QSAR study of antiplatelet agents". *Journal of Medicinal Chemistry*, 37/26, 4563-4566.
- Tate P.A., Dorsey J.G. (2004). "Column selection for liquid chromatographic estimation of the K'_w hydrophobicity parameter". *Journal of Chromatography A*, 1042/(1-2), 37-48.
- Taylor R.B., Ochekepe N.A., Wangboonskul J. (1989). "Quantitative structure retention relationship studies of some basic antimalarial compounds". *Journal of Liquid Chromatography*, 12/9, 1645-1668.
- Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A., Ando T. (1984). "Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries". *Analytical Chemistry*, 56/1, 111-113.

- Terada H. (1972). *"Partition behavior of para-aminobenzoic acid and sulfonamides at various pH values"*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 20/4, 765.
- Tomasella F.P., Cline-Love L.J. (1990). *"Thermodynamic properties in micellar liquid chromatography based on the three-phase equilibrium model"*. Analytical Chemistry, 62/13, 1315-1319.
- Tomasella F.P., Fett J., Cline Love L.J. (1991). *"Effects of organic modifier and temperature on micellar liquid chromatography"*. Analytical Chemistry, 63/5, 474-479.
- Torres-Lapasíó J.R., Villanueva-Camañas R.M., Sanchis-Malloles J.M., Medina-Hernández M.J., García Álvarez-Coque M.C. (1993). *"Modeling of the retention behavior of solutes in micellar liquid-chromatography with organic modifiers"*. Journal of Chromatography, 639/2, 87-96.
- Torres-Lapasíó J.R., Villanueva-Camañas R.M., Sanchis-Malloles J.M., Medina-Hernández M.J., García Álvarez-Coque M.C. (1994). *"Interpretive strategy for optimization of surfactant and alcohol concentration in micellar liquid-chromatography"*. Journal of Chromatography A, 677/2, 239-253.
- Torres-Lapasíó J.R., García-Álvarez-Coque M.C., Rosés M., Bosch E. (2002). *"Prediction of the retention in reversed-phase liquid chromatography using solute-mobile phase-stationary phase polarity parameters"*. Journal of Chromatography A, 955/1, 19-34.
- Torres-Lapasíó J.R., García-Álvarez-Coque M.C., Rosés M., Bosch E., Zissimos A.M., Abraham M.H. (2004). *"Analysis of a solute polarity parameter in reversed-phase liquid chromatography on a linear solvation relationship basis"*. Analytica Chimica Acta, 515/1, 209-227.
- Treiner C. (1983). *"Partition-coefficients of 20 polar-molecules between water and trimethyldodecylammonium bromide micelles - correlation with the water+octanol system"*. Journal of Colloid and Interface Science, 93/1, 33-42.
- Treiner C., Chattopadhyay A.K. (1986). *"Correlation of partition-coefficients for polar aromatic and aliphatic molecules between trimethyldodecylammonium bromide micelles+water and octanol+water-systems at 298.15-K"*. Journal of Colloid and Interface Science, 109/1, 101-108.
- Trone M.D., Leonard M.S., Khaledi M.G. (2000-a). *"Congeneric behaviour in estimations of octanol-water partition coefficients by micellar electrokinetic chromatography"*. Analytical Chemistry, 72, 1228-1235.
- Trone M.D., Khaledi M.G. (2000-b). *"Statistical evaluation of linear solvation energy relationships models used to characterize chemical selectivity in micellar electrokinetic chromatography"*. Journal of Chromatography A, 886, 245-257.

- Turowski M., Kaliszan R. (1997). "Keratin immobilized on silica as a new stationary phase for chromatographic modelling of skin permeation". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15/(9-10), 1325-1333.
- Turowski M., Kaliszan R. (1998). "Collagen immobilised on silica derivatives as a new stationary phase for HPLC". *Biomedical Chromatography*, 12/4, 187-192.
- US EPA (1992). "Dermal exposure assessment: principles and applications". EPA/600/8-91-011B, Interim Report. U.S. Environmental Protection Agency, Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment, Washington DC (EE.UU.).
- Valkó K. (1987). "RP-HPLC retention data for measuring structural similarity of compounds for QSAR studies". *Journal of Liquid Chromatography*, 10/(8-9), 1663-1686.
- Valkó K., Snyder L.R., Glajch J.L. (1993-a). "Retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of mobile-phase composition". *Journal of Chromatography A*, 656/(1-2), 501-520.
- Valkó K., Slégel P. (1993-b). "New chromatographic hydrophobicity index (φ_0) based on the slope and the intercept of the logk' versus organic phase concentration plot". *Journal of Chromatography A*, 631/(1-2), 49-61.
- Valkó K., Bevan C., Reynolds D. (1997). "Chromatographic hydrophobicity index by fast-gradient RP HPLC: A high-throughput alternative to logP/logD". *Analytical Chemistry*, 69/11, 2022-2029.
- Valkó K., Du C.M., Bevan C.D., Reynolds D.P., Abraham M.H. (2000). "Rapid-gradient HPLC method for measuring drug interactions with immobilized artificial membrane: comparison with other lipophilicity measures". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89/8, 1085-1096.
- Valkó K., Du C.M., Bevan C., Reynolds D.P., Abraham M.H. (2001). "Rapid method for the estimation of octanol/water partition coefficient (logP-oct) from gradient RP-HPLC retention and a hydrogen bond acidity term ($\Sigma \alpha(H)(2)$)". *Current Medicinal Chemistry*, 8/9, 1137-1146.
- Valkó K. (2004). "Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution". *Journal of Chromatography A*, 1037/(1-2), 299-310.
- van Bavel B., Andersson P., Wingfors H., Ahgren J., Bergqvist P.A., Norrgren L., Rappe C., Tysklind M. (1996). "Multivariate modeling of PCB bioaccumulation in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15/6, 947-954.
- Veith G.D., Call D.J., Brooke L.T. (1983). "Structure toxicity relationships for the fathead minnow, *pimephales-promelas* - narcotic industrial-chemicals". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40/6, 743-748.

- Villanueva-Camañas R.M., Sanchis-Mallols J.M., Torres-Lapasió J.R., Ramis-Ramos G. (1995). *"Analysis of pharmaceutical preparations containing catecholamines by micellar liquid chromatography with spectrophotometric detection"*. *The Analyst*, 120/6, 1767-1772.
- Voet D., Voet J. (1992). *"Bioquímica"*. Omega, Barcelona (España).
- Walther B., Carrupt P.A., El Tayar N., Testa B. (1989). *"8-Substituted xanthenes as phosphodiesterase inhibitors-conformation-dependent lipophilicity and structure-activity-relationships"*. *Helvetica Chimica Acta*, 72/3, 507-517.
- Warne M.S.J., Connell D.W., Hawker D.W. (1989). *"Development of QSAR's based on high performance liquid chromatography capacity factors to describe non-specific toxicity"*. *Chemosphere*, 19/(8-9), 1113-1128.
- Watarai H. (1991). *"Microemulsion capillary electrophoresis"*. *Chemistry Letters*, 3, 391-394.
- Wehmeyer K.R., Tu J., Jin Y., King S., Stella M., Stanton D.T., Strasburg R., Kenseth J., Wong K.S. (2003). *"The application of multiplexed microemulsion electrokinetic chromatography for the rapid determination of logP_{ow} values of neutral and basic compounds"*. *LCGC North America*, 21/11, 1078-1088.
- Wang X.L., Ma Y.J., Yu W.J., Geyer H.J. (1997). *"Two-compartment thermodynamic model for bioconcentration of hydrophobic organic chemicals by alga: Quantitative relationship between bioconcentration factor and surface area of marine algae or octanol/water partition coefficient"*. *Chemosphere*, 35/8, 1781-1797.
- Wong D.C.L., Chai E.Y., Chu K.K., Dorn P.B. (1999). *"Prediction of ecotoxicity of hydrocarbon-contaminated soils using physicochemical parameters"*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18/11, 2611-2621.
- Wong K.S., Kenseth J., Strasburg R. (2004). *"Validation and long-term assessment of an approach for the high throughput determination of lipophilicity (logP_{ow}) values using multiplexed, absorbance-based capillary electrophoresis"*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93/4, 916-931.
- Worgan A.D.P., Dearden J.C., Edwards R., Netzeva T.I., Cronin M.T.D. (2003). *"Evaluation of a novel short-term algal toxicity assay by the development of QSARs and inter-species relationships for narcotic chemicals"*. *QSAR & Combinatorial Science*, 22/2, 204-209.
- Wu Y.S., Lee H.K., Li S.F.Y. (1998). *"Rapid estimation of octanol-water partition coefficients of pesticides by micellar electrokinetic chromatography"*. *Electrophoresis*, 19/10, 1719-1727.
- Yamagami C., Takao N. (1991). *"Hydrophobicity parameters determined by reversed-phase liquid-chromatography. 2. Dependence of retention behavior of pyrazines on mobile phase-composition"*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 39/5, 1217-1221.

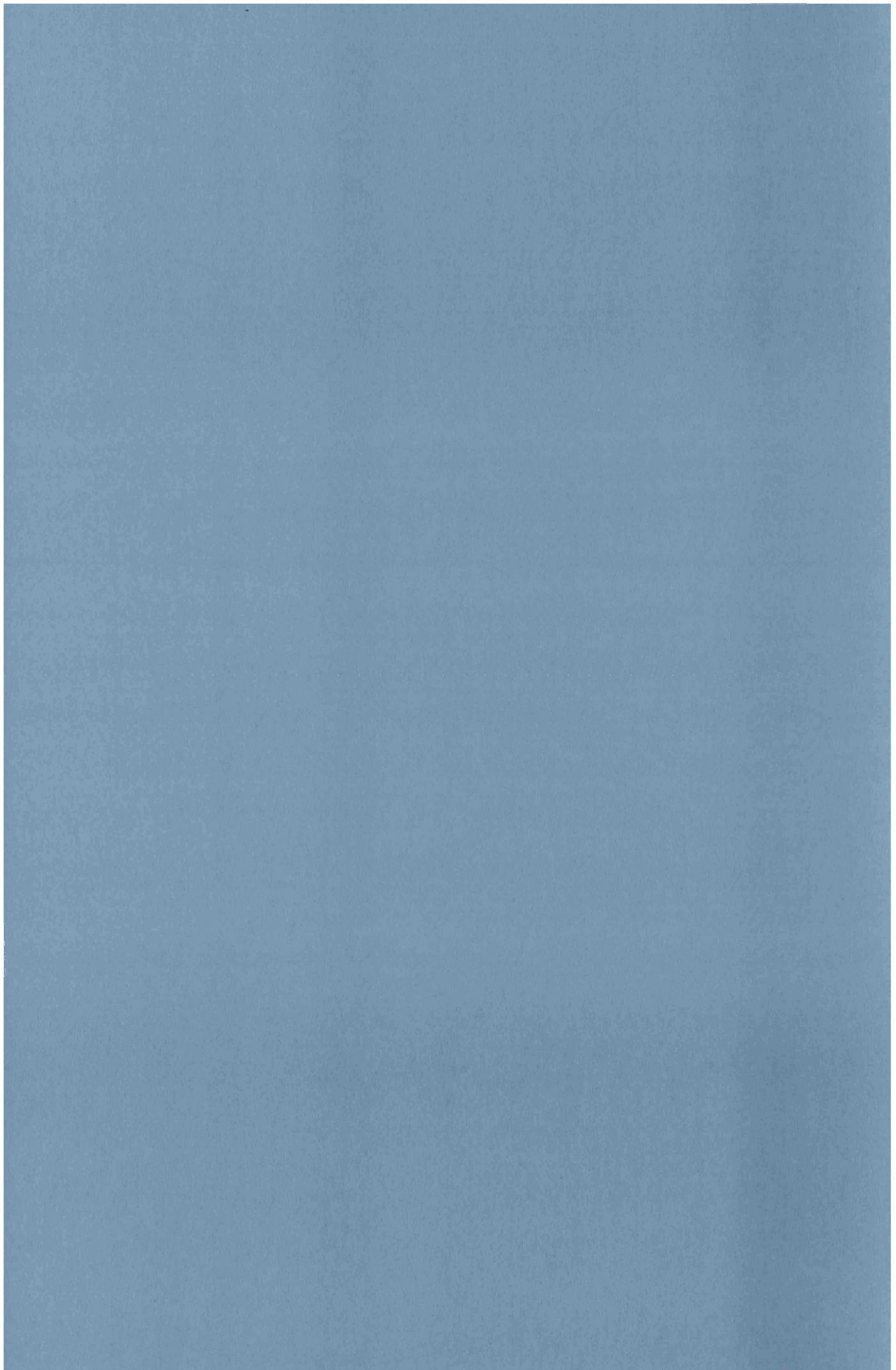
- Yamagami C., Yokota M., Takao N. (1994-a). *"Hydrophobicity parameters determined by reversed-phase liquid chromatography. 8. Hydrogen-bond effects of ester and amide groups in heteroaromatic compounds on the relationship between the capacity factor and the octanol-water partition coefficient"*. Journal of Chromatography A, 662/1, 49-60.
- Yamagami C., Yokota M., Takao N. (1994-b). *"Hydrophobicity parameters determined by reversed-phase liquid-chromatography. 9. Relationship between capacity factor and water-octanol partition-coefficient of monosubstituted pyrimidines"*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 42/4, 907-912.
- Yamagami C., Katashiba N. (1996). *"Hydrophobicity parameters determined by reversed-phase liquid chromatography. 11. Prediction of logP values for phenyl N-methyl and phenyl N,N-dimethylcarbamates"*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 44/7, 1338-1343.
- Yamaguchi J., Hanai T. (1989). *"Selectivity of alkyl-bonded phases in reversed-phase liquid-chromatography of hydrophobic compounds"*. Chromatographia, 27/(7-8), 371-377.
- Yang S.Y., Bumgarner J.G., Kruk L.F.R., Khaledi M.G. (1996). *"Quantitative structure-activity relationships studies with micellar electrokinetic chromatography - Influence of surfactant type and mixed micelles on estimation of hydrophobicity and bioavailability"*. Journal of Chromatography A, 721/2, 323-335.
- Yarmchuk P., Weinberger R., Hirsch R.F., Cline-Love L.J. (1982). *"Selectivity in liquid-chromatography with micellar mobile phases"*. Analytical Chemistry, 54/13, 2233-2238.
- Yarmchuk P., Weinberger R., Hirsch R.F., Cline-Love L.J. (1984). *"Effects of restricted mass-transfer on the efficiency of micellar chromatography"*. Journal of Chromatography, 283, 47-60.
- Yin J.M., Liu H.L., Pidgeon C. (1998). *"Synthesis and immobilization of ceramide analogs on silica particles"*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 8/2, 179-182.
- Yoshida F., Topliss J.G. (2000). *"QSAR model for drug human oral bioavailability"*. Journal of Medicinal Chemistry, 43, 2575-2585.
- Zhao Y.H., Le J., Abraham M.H., Hersey A. Eddershaw P.J., Luscombe C.N., Boutina D., Beck G., Sherborne B., Cooper I., Platts J.A. (2001). *"Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure-activity relationship (QSAR) with the Abraham Descriptors"*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 90/6, 749-784.
- Zou H., Zhang Y., Hong M., Lu P. (1992). *"Measurement of partition coefficients by reversed-phase ion-pair liquid chromatography"*. Journal of Chromatography A, 625/2, 169-175.



CAPÍTULO XII

Anexos

XII.1.- Anexo I: Nomenclatura	313
XII.1.1.- Siglas	313
XII.1.2.- Descriptores estructurales y propiedades físico-químicas	315
XII.1.3.- Parámetros cromatográficos	316
XII.1.4.- Parámetros electroforéticos	317
XII.1.5.- Actividades biológicas	318
XII.1.6.- Parámetros estadísticos	319
XII.2.- Anexo II: Compendio de estructuras moleculares, valores del logaritmo de las relaciones de reparto <i>n</i> -octanol/agua y de las constantes de protonación de los compuestos estudiados	320
XII.2.1.- Anestésicos locales	321
XII.2.2.- Antiepilépticos	322
XII.2.3.- Antidepresivos tricíclicos	323
XII.2.4.- Antihistamínicos	325
XII.2.5.- Antiinflamatorios no esteroideos	326
XII.2.6.- Antipsicóticos	328
XII.2.7.- Barbitúricos	330
XII.2.8.- Benzodiazepinas	331
XII.2.9.- β-Bloqueantes	332
XII.2.10.- Catecolaminas	333
XII.2.11.- Derivados del benceno mono- y di- sustituidos	334
XII.2.12.- Derivados OPA-NAC de aminoácidos	335
XII.2.13.- Diuréticos	336
XII.2.14.- Fenilureas	337
XII.2.15.- Fenoles	338
XII.2.16.- Fenoxiácidos	339
XII.2.17.- Hidrocarburos aromáticos	340
XII.2.18.- Otros plaguicidas	341
XII.2.19.- Otros compuestos orgánicos	343
XII.3.- Anexo III: Propiedades de los surfactantes utilizados	344



XII.1.- Anexo I: nomenclatura

XII.1.1.- Siglas

Atendiendo a las recomendaciones de la IUPAC (*McNaught A.D. y col., 2003*), en la presente Tesis Doctoral se han utilizado las siglas en inglés o bien en el idioma en el que se originó y sólo se han utilizado en castellano las que tienen una probada utilización en dicho idioma. En este Anexo se indica, cuando procede, el término en inglés en cursiva y su traducción en castellano.

- 3Rs/3ERRES: reemplazo, reducción y refinamiento del uso de animales de experimentación.
- ADME: absorción, distribución, metabolismo y excreción de xenobióticos.
- AGP: " *α_1 -acid glycoprotein*". α_1 -Glicoproteína ácida.
- AINEs: antiinflamatorios no esteroideos.
- ANOVA: "*analysis of variance*". Análisis de varianza.
- AOT: Bis(2-etilhexil)sulfosuccinato sódico.
- BLS: "*bivariate least squares*". Mínimos cuadrados bivariantes.
- Brij35: polioxietileno(23)lauril éter.
- BSA: "*bovine serum albumin*". Albúmina de suero bovino.
- C₁₄TAB: "*tetradecyltrimethylammonium bromide*". Bromuro de tetradeciltrimetilamonio.
- CADD: "*computer-aided drug design*". Diseño molecular asistido por ordenador.
- CCC: "*counter-current chromatography*". Cromatografía en contracorriente.
- CMB: Cromatografía micelar de bio-reparto. En inglés se denomina BMC ("*biopartitioning micellar chromatography*").
- CMC: "*critical micellar concentration*". Concentración micelar crítica.
- COX: ciclooxigenasa.
- CTAB o C₁₆TAB: "*cetyltrimethylammonium bromide*". Bromuro de cetiltrimetilamonio.
- DHP: "*dihexadecyl hydrogen phosphate*". Dihexadecil hidrógenofosfato.
- DPPC: "*dipalmitoyl-L- α -phosphatidylcholine*". Dipalmitoil-L- α -fosfatidilcolina.
- DPPG: "*dipalmitoyl-L- α -phosphatidylglycerol*". Dipalmitoil-L- α -fosfatidilglicerol.
- DTAB: "*n-dodecyltrimethylammonium bromide*". Bromuro de *n*-dodeciltrimetilamonio.
- DTAC: "*dodecyltrimethylammonium chloride*". Cloruro de dodeciltrimetilamonio.
- EKC: "*electrokinetic chromatography*". Cromatografía capilar electrocinética. También se denomina ECC ("*electrokinetic capillary chromatography*", cromatografía capilar electrocinética).
- EPA: "*environmental protection agency*". Agencia de protección medioambiental.
- EPL: "*egg phospholipid liposomes*". Liposomas de fosfolípidos de huevo.



- FIA: "*flow injection analysis*". Análisis por inyección en flujo.
- HPTLC: "*high-performance thin layer chromatography*". Cromatografía de capa fina de alta eficacia.
- HSA: "*human serum albumin*". Albúmina de suero humano.
- IAM: "*immobilised artificial membrane*". Membrana artificial inmovilizada.
- IBAC: "*immobilised biomembrane affinity chromatography*". Cromatografía de afinidad con biomembranas inmovilizadas.
- IBC: "*immobilised biomembrane chromatography*". Cromatografía con biomembranas inmovilizadas.
- IBiPaC: "*immobilised biomembrane partitioning chromatography*". Cromatografía de reparto con biomembranas inmovilizadas.
- ILC: "*immobilised liposome chromatography*". Cromatografía con liposomas inmovilizados.
- IUPAC: "*International Union of Pure and Applied Chemistry*". Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.
- LEKC: "*liposome electrokinetic chromatography*". Cromatografía electrocinética con liposomas.
- LFER: "*linear free energy relationship*". Relación lineal de energía libre.
- LiPFOS: "*lithium perfluorooctane sulfonate*". Perfluorooctano sulfonato de litio.
- LSER: "*linear solvation energy relationship*". Relación lineal de energía de solvatación.
- LV: "*latent variable*". Variable latente obtenida mediante regresión con mínimos cuadrados parciales.
- MEEKC: "*microemulsion electrokinetic chromatography*". Cromatografía electrocinética con microemulsiones.
- MEKC: "*micellar electrokinetic chromatography*". Cromatografía electrocinética micelar.
- MG: "*methylglycolate*". Metilglicolato.
- ML: "*membrane liposomes*". Liposomas de lípidos de membrana.
- MLC: "*micellar liquid chromatography*". Cromatografía líquida micelar.
- MLR: "*multiple linear regression*". Regresión lineal múltiple.
- MMEEKC: "*multiplexed microemulsion electrokinetic chromatography*". "MEEKC multiplexo".
- NAC: "*N-acetyl-L-cysteine*". *N*-acetil-L-cisteína.
- ODS: "*octadecylsilane*". Octadecilsilano.
- OECD: "*Organisation for the Economic Cooperation and Development*". Organización para la cooperación y desarrollo económico.
- OLS: "*ordinary least squares*". Mínimos cuadrados ordinarios.
- OPA: "*o-phthalaldehyde*". *o*-Ftalaldehído.

- PA: "*phosphatidic acid*". Ácido fosfatídico.
- PBS: "*phosphate buffer saline*". Tampón fosfato salino.
- PC: "*phosphatidylcholine*". Fosfatidilcolina.
- PCs: "*principal components*". Componentes principales.
- PCA: "*principal component analysis*". Análisis en componentes principales.
- PCR: "*principal component regression*". Regresión en componentes principales.
- PE: "*phosphatidylethanolamine*". Fosfatidiletanolamina.
- PG: "*phosphatidylglycerol*". Fosfatidilglicerol.
- PLS: "*partial least squares*". Regresión por mínimos cuadrados parciales.
- PS: "*phosphatidylserine*". Fosfatidilserina.
- QRAR: "*quantitative retention-activity relationship*". Relación cuantitativa retención-actividad.
- QSAR: "*quantitative structure-activity relationship*". Relación cuantitativa estructura-actividad.
- QSMR: "*quantitative structure-migration relationship*". Relación cuantitativa estructura-migración.
- QSRR: "*quantitative structure-retention relationship*". Relación cuantitativa estructura-retención.
- RP-HPLC: "*reversed phase high performance liquid chromatography*". Cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa, o simplemente RPLC ("*reversed phase liquid chromatography*").
- RP-TLC: "*reversed phase thin-layer chromatography*". Cromatografía de capa fina en fase inversa.
- SAR: "*structure-activity relationship*". Relación estructura-actividad (de tipo cualitativo).
- SC: "*sodium cholate*". Colato sódico
- SDP: "*sodium mono-n-dodecyl phosphate*". Mono-*n*-dodecil fosfato sódico.
- SDS: "*sodium dodecyl sulphate*". Dodecilsulfato sódico.
- SOS: "*sodium octyl sulfate*". Octil sulfato sódico
- TLC: "*thin-layer chromatography*". Cromatografía de capa fina.
- VEKC: "*vesicle electrokinetic chromatography*". Cromatografía electrocinética con vesículas.
- WLS: "*weighted least squares*". Mínimos cuadrados ponderados.

XII.1.2.- Descriptores estructurales y propiedades físico-químicas

- α : carga molar total de un compuesto a un pH dado.
- α_A : carga molar negativa de un compuesto a un pH dado.
- α_B : carga molar positiva de un compuesto a un pH dado.
- β_H : constante de protonación acumulativa.
- δ_i : fracción molar de la especie i del compuesto a un pH dado.
- π : constante hidrófoba de los sustituyentes propuesta por Corwin Hansch.
- σ^* : parámetro de polaridad de Taft (descriptor de tipo electrónico).
- σ : constante de Hammett (descriptor de tipo electrónico).
- A ; $\sum \alpha_2^H$: acidez efectiva de los enlaces de hidrógeno (descriptor solvatocrómico de Abraham).
- B ; $\sum \beta_2^H$: basicidad efectiva de los enlaces de hidrógeno (descriptor solvatocrómico de Abraham).
- E ; R_2 : exceso de refracción molar (descriptor solvatocrómico de Abraham).
- E_s : parámetro estérico de Taft.
- f : constante hidrófoba de fragmentación de Rekker.
- K_a : constante de acidez.
- K_H : constante de protonación.
- $\log D$: logaritmo de la relación de distribución (usualmente en el sistema bifásico n -octanol/agua, también aparece en la bibliografía como $\log D_{ow}$).
- $\log P$: logaritmo de la relación de reparto (usualmente en el sistema bifásico n -octanol/agua, también aparece en la bibliografía como $\log P_{ow}$ o $\log K_{ow}$).
- M_f : peso molecular (descriptor de tipo estérico).
- Pr : "parachor" (descriptor de tipo estérico).
- R_m : refracción molar (descriptor de tipo estérico y electrónico).
- r_w : radio de van der Waals (descriptor de tipo estérico).
- S ; π_2^H : dipolaridad/polarizabilidad (descriptor solvatocrómico de Abraham).
- SP : propiedad del soluto en un sistema dado.
- V ; V_x : volumen molar característico de McGowan (descriptor solvatocrómico de Abraham).
- V_m : volumen molar (descriptor de tipo estérico).

XII.1.3.- Parámetros cromatográficos

- ϕ : fracción en volumen de modificador orgánico en la fase móvil.
- ϕ_0 : proporción de modificador orgánico en la fase móvil necesaria para que $\log k$ sea igual a 0.
- C_{M^*} : concentración micelar crítica.
- CHI : índice cromatográfico por gradiente de hidrofobicidad.
- d_c : diámetro interno de la columna cromatográfica.
- d_p : diámetro de partícula.
- $E_T(30)$: escala solvatocrómica para la medida de la polaridad de la fase móvil.
- k : factor de retención.
- K_{AM} : constante de asociación soluto-micela.
- k_{CMB} : factor de retención obtenido en cromatografía micelar de bio-reparto.
- k_{IAM} : factor de retención obtenido con columnas de membranas artificiales inmovilizadas.
- k_{M^*} : factor de retención correspondiente a una concentración de surfactante igual a la CMC.
- k_R : factor de retención normalizado de un analito.
- k_{REF} : factor de retención de referencia.
- K_S : factor de capacidad específico en IBiPaC.
- k_w : factor de retención extrapolado para una fase móvil con un contenido en modificador orgánico igual a 0.
- k_{wIAM} : factor de retención obtenido con columnas de membranas artificiales inmovilizadas extrapolado a una fase móvil con un contenido en modificador orgánico igual a 0.
- L : longitud de la columna cromatográfica.
- $[M]$: concentración total de surfactante en la fase móvil menos la concentración micelar crítica.
- R_F : factor de retardo en cromatografía en plano.
- R_M : función logarítmica del factor de retardo en cromatografía en plano.
- R_{Mw} : parámetro R_M extrapolado a una fase móvil sin modificador orgánico.
- S : fuerza eluyente de la fase móvil.
- t_M^0 : "tiempo total básico".
- t_R^0 : tiempo total de retención de un analito.
- $t_{R(REF)}^0$: tiempo total de retención de un analito de referencia.
- V_M : volumen de la fase móvil en la columna.
- V_R : volumen de retención de un compuesto.
- V_S : volumen de la fase estacionaria.

XII.1.4.- Parámetros electroforéticos

- μ_{eo}^m : movilidad electroosmótica en cromatografía electrocinética micelar.
- μ_{eo}^z : movilidad electroosmótica en electroforesis capilar zonal.
- $\mu_{ep,i}^m$: movilidad electroforética del soluto i en cromatografía electrocinética micelar.
- $\mu_{ep,i}^z$: movilidad electroforética del soluto i en electroforesis capilar zonal.
- $\mu_{tot,i}^m$: movilidad electroforética total del analito i en cromatografía electrocinética micelar.
- $\mu_{tot,i}^z$: movilidad electroforética total del analito i en electroforesis capilar zonal.
- $\tilde{K}_{MEKC,i}$: factor de afinidad del analito i en MEKC en presencia de micelas neutras.
- L_{eff} : longitud efectiva del capilar.
- L_{tot} : longitud total del capilar.
- t_{eo}^m : "tiempo básico electroosmótico" en cromatografía electrocinética micelar.
- t_{eo}^z : "tiempo básico electroosmótico" en electroforesis capilar zonal.
- $t_{m,i}^m$: tiempo de migración del analito i en cromatografía electrocinética micelar.
- $t_{m,i}^z$: tiempo de migración del analito i en electroforesis capilar zonal.
- V : voltaje aplicado.

XII.1.5.- Actividades biológicas

- BCF : factor de bioconcentración.
- ChV : valor crónico.
- Cl : aclaramiento plasmático.
- EC_{50} : concentración efectiva mediana.
- IC_{50} : concentración inhibitoria mediana.
- K_{oc} : coeficiente de adsorción en suelos normalizado por el contenido en carbono orgánico.
- LC_{50} : concentración letal mediana.
- $LOEC$: concentración mínima de sustancia que provoca algún efecto adverso.
- $NOEC$: concentración máxima de sustancia que no provoca ningún efecto adverso.
- $t_{1/2}$: semivida de eliminación o biológica.
- TD : dosis tóxica.
- TD_{Lo} : dosis tóxica mínima.
- V_d : volumen de distribución.

XII.1.6.- Parámetros estadísticos

- α : nivel de significación (prefijado a priori) de un modelo.
- b_i : coeficientes de ajuste del modelo.
- e_i : residuo de la molécula i en el modelo.
- F : cociente entre la varianza modelada y la residual obtenido a partir de un análisis de varianza (ANOVA, siglas inglesas de "*analysis of variance*").
- $IC_{100(1-\alpha)\%}$: intervalo de confianza de los coeficientes de ajuste (b_i) del modelo para un nivel de significación α , o lo que es lo mismo, para un nivel de confianza (NC) del $100(1-\alpha)\%$.
- n : número de moléculas (o de objetos) incluidas en el modelo.
- p : probabilidad asociada al ANOVA del modelo de regresión y a los coeficientes de ajuste del mismo. Es una medida del nivel de significación (calculado a posteriori) del modelo o de los coeficientes de ajuste.
- r : coeficiente de correlación (momento-producto).
- r' : coeficiente de correlación ajustado a los grados de libertad.
- r^2 : coeficiente de determinación.
- r'^2 : coeficiente de determinación ajustado a los grados de libertad.
- $RMSEC$: siglas inglesas de "*root-mean-square error of calibration*". Raíz cuadrada del error al cuadrado medio en calibración.
- $RMSECV$: siglas en inglés de "*root-mean-square error of cross-validation*". Raíz cuadrada del error al cuadrado medio en validación cruzada.
- $RMSECV_i$: siglas en inglés de "*root-mean-square error of cross-validation for interpolation*". Raíz cuadrada del error al cuadrado medio en validación cruzada ("*leave-one-out cross-validation*") para las predicciones obtenidas por interpolación en el modelo.
- s : desviación estándar.
- s_{b_i} : desviación estándar de los coeficientes de ajuste b_i .
- $s_{y/x}$: desviación estándar de los residuos de y (también denominada error típico o error estándar de la estimación y representada con las notaciones s_e o SE). Se puede utilizar para la construcción de los límites de predicción para nuevas observaciones.
- $t_{\alpha/2,\nu}$: valor tabulado de la distribución t de Student para un nivel de significación de $\alpha/2$ y ν grados de libertad.
- y_i : valor de la variable y para la molécula i .
- \hat{y}_i : valor de la variable dependiente predicho por el modelo para la molécula i .

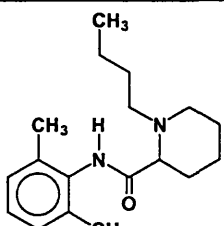
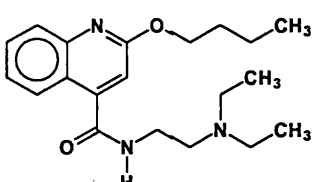
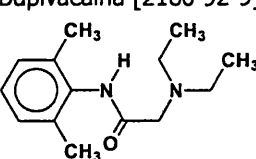
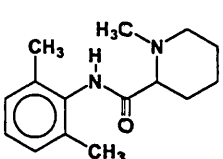
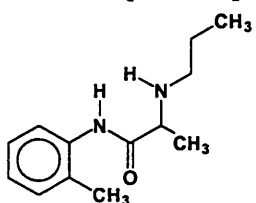
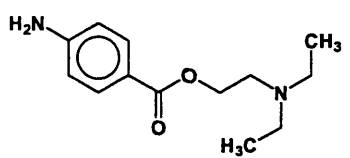
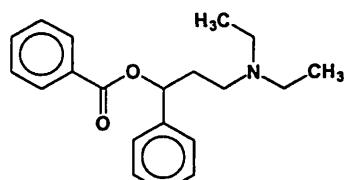
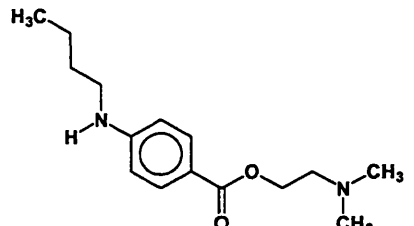
XII.2.- Anexo II: Compendio de estructuras moleculares, valores del logaritmo de las relaciones de reparto *n*-octanol/agua y de las constantes de protonación de los compuestos estudiados

En el presente Anexo se muestra para cada uno de los analitos estudiados su estructura molecular, su número registrado en el "Chemical Abstracts Service" (CAS), el valor del logaritmo de la relación de reparto *n*-octanol/agua ($\log P$) y los valores del logaritmo de las constantes de protonación ($\log K_H$) que se han utilizado en todos los Capítulos de la presente Tesis Doctoral, a menos que se indique lo contrario en un Capítulo específico.

Los valores de $\log P$ son experimentales y se han tomado de la bibliografía (*Hansch C., 1990-b; PHYSPROP Database*). En su defecto, se han utilizado valores calculados con los programas informáticos KOWWIN (v. 1.66), CLOGP (*Hansch C., 1990-b*) y ACD/logP (versión de demostración). Asimismo, los valores $\log K_H$ también se han obtenido de la bibliografía (*Reynolds J.E.F., 1982; Hansch C., 1990-b; Hardman J.G. y col. 1996; Yoshida F. y col., 2000; PHYSPROP Database*) y a menos que se indique lo contrario están determinados en medio acuoso y a 25 °C.

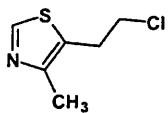
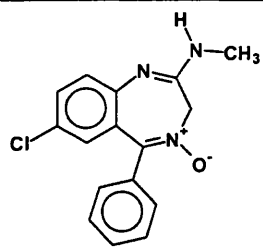
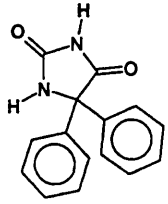
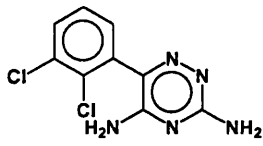
Adicionalmente, se indica si el valor de $\log K_H$ mostrado corresponde a un grupo funcional con un carácter ácido (A) o básico (B). La letra (N) hace referencia a un analito sin propiedades ácido-base o bien un analito para el que no se han encontrado los valores de $\log K_H$ en la bibliografía pero sí claras referencias a que no está ionizado al pH estudiado.

XII.2.1.- Anestésicos locales

Compuesto [N° CAS]	log <i>P</i>	log <i>K</i> _H	Compuesto [N° CAS]	log <i>P</i>	log <i>K</i> _H
	3.41	8.10 (B)		4.40	8.85 (B)
Bupivacaína [2180-92-9]			Dibucaina [85-79-0]		
	2.26	7.90 (B)		1.75	7.70 (B)
Lidocaína [137-58-6]			Mepivacaína [96-88-8]		
	2.11	7.89 (B)		1.87	8.80 (B)
Prilocaína [721-50-6]			Procaína [59-46-1]		
	4.63 ^a	7.53 (B)		3.73	8.39 (B)
Propanocaína [493-76-5]			Tetracaína [94-24-6]		

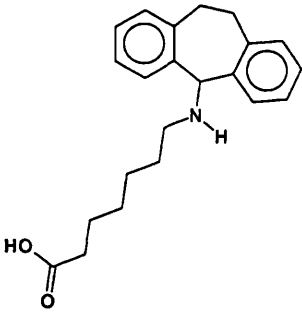
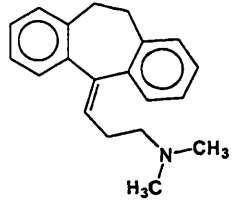
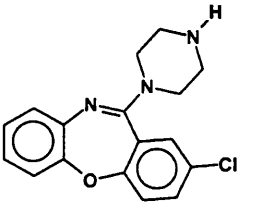
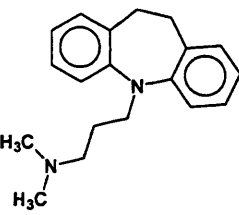
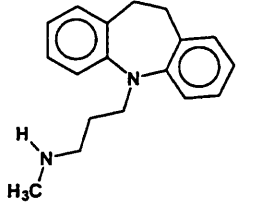
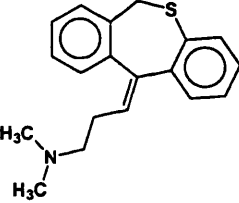
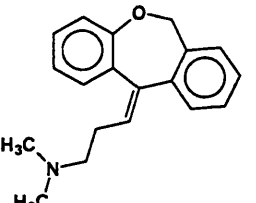
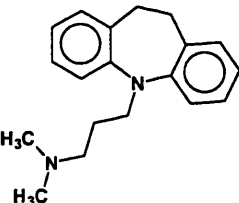
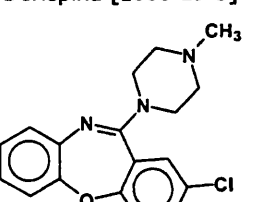
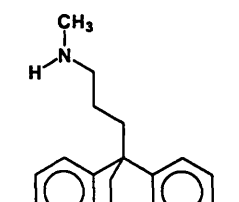
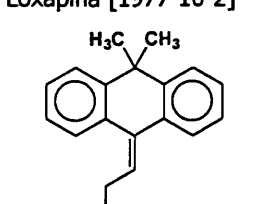
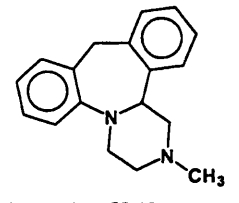
^a Valor de log*P* calculado con el programa KOWWIN (v. 1.66).

XII.2.2.- Antiepilépticos

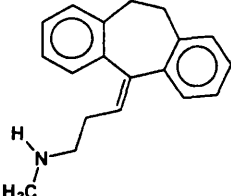
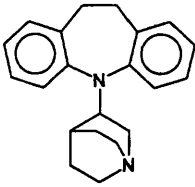
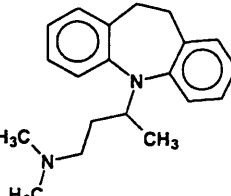
Compuesto [N° CAS]	log <i>P</i>	log <i>K_H</i>	Compuesto [N° CAS]	log <i>P</i>	log <i>K_H</i>
 Clometiazol [533-45-9]	2.12	3.2 (B)	 Clordiazepóxido [58-25-3]	2.44	4.76 (B)
 Fenitoína [57-41-0]	2.47	8.3 (A)	 Lamotrigina [84057-84-1]	2.08 ^a	5.7 (B)

^a Valor de log*P* calculado con el programa CLOGP (*Hansch C., 1990-b*).

XII.2.3.- Antidepresivos tricíclicos

Compuesto [N° CAS]	log P	log K _H	Compuesto [N° CAS]	log P	log K _H
 Amineptina [57574-09-1]	2.66 ^a	7.69 ^b (B) 5.24 ^b (A)	 Amitriptilina [50-48-6]	5.04	9.42 (B)
 Amoxapina [14028-44-5]	3.38 ^a	7.6 (B)	 Clomipramina [303-49-1]	5.19	9.38 (B)
 Desipramina [50-47-5]	4.90	10.44 (B)	 Dosulepina [113-53-1]	4.49	9.25 (B)
 Doxepina [1668-19-5]	4.29	9.0 (B)	 Imipramina [50-49-7]	4.80	9.5 (B)
 Loxapina [1977-10-2]	3.6 ^a	6.6 (B)	 Maprotilina [10262-69-8]	4.52 ^a	10.5 (B)
 Melitraceno [5118-29-6]	4.81 ^a	7.38 ^b (B)	 Mianserina [24219-97-4]	4.26 ^c	7.1 (B)

(Continúa en la página siguiente)

Compuesto [N° CAS]	log <i>P</i>	log <i>K_H</i>	Compuesto [N° CAS]	log <i>P</i>	log <i>K_H</i>
 Nortriptilina [894-71-3] ^d	4.28	9.7 (B)	 Quinupramina [31721-17-2]	5.62 ^a	7.85 ^b (B)
 Trimipramina [739-71-9]	5.43 ^a	6.77 ^b (B)			

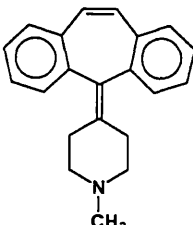
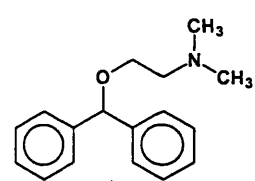
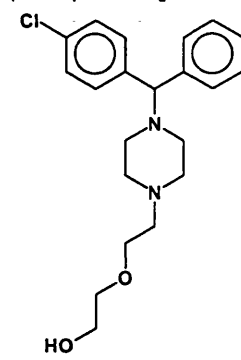
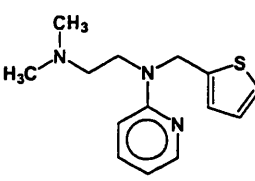
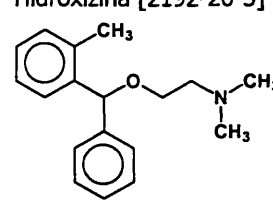
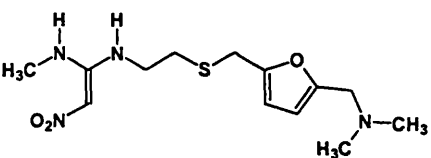
^a Valor de log *P* calculado con el programa KOWWIN (v. 1.66).

^b Constante de protonación determinada en medio micelar de Brij35 y a temperatura ambiente (*Quiñones-Torrel C. y col., 1999*).

^c Valor de log *P* calculado con el programa CLOGP (*Hansch C., 1990-b*).

^d Número CAS correspondiente a la sal clorhidrato.

XII.2.4.- Antihistamínicos

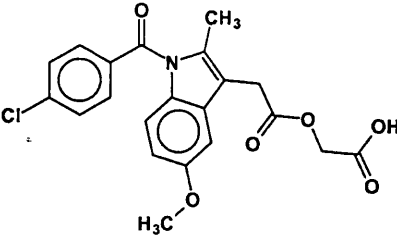
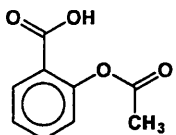
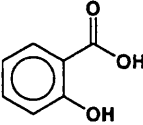
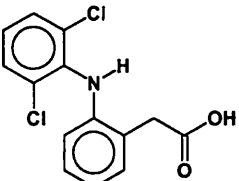
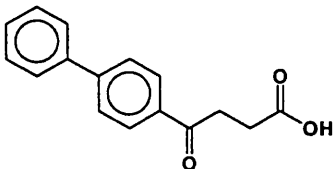
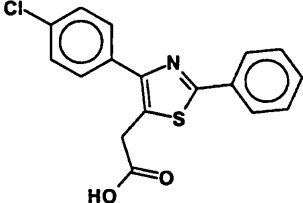
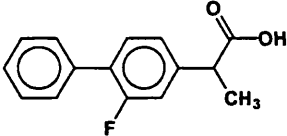
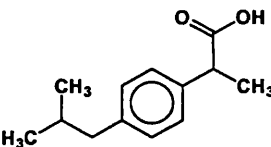
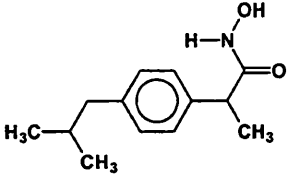
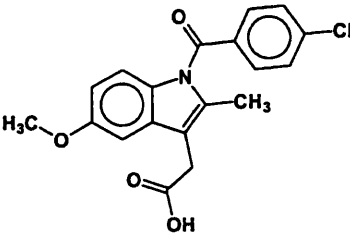
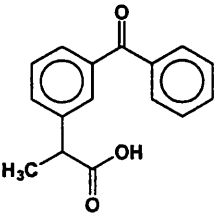
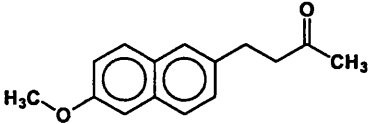
Compuesto [N° CAS]	log P	log K _H	Compuesto [N° CAS]	log P	log K _H
 Ciproheptadina [129-03-3]	4.69	8.87 (B)	 Difenhidramina [58-73-1]	3.27	9.0 (B)
 Hidroxizina [2192-20-3] ^b	2.36 ^a	7.1 (B) 2.1 (B)	 Metapirileno [91-80-5]	2.87	8.9 (B) 3.7 (B)
 Orfenadrina [83-98-7]	3.77	8.4 (B)	 Ranitidina [66357-35-5]	0.27	8.2 (B) 2.3 (B)

^a Valor de log P calculado con el programa KOWWIN (v. 1.66).

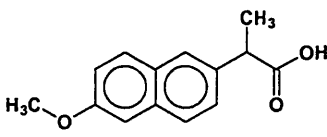
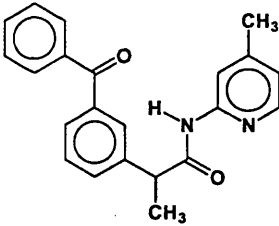
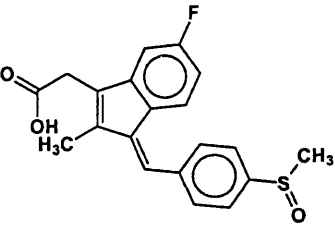
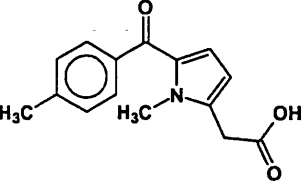
^b Número CAS correspondiente a la sal diclorhidrato.



XII.2.5.- Antiinflamatorios no esteroideos

Compuesto [N° CAS]	logP	logK _H	Compuesto [N° CAS]	logP	logK _H
 <p>Acemetacina [53164-05-9]</p>	4.13	4.0 (A)	 <p>Ácido acetilsalicílico [50-78-2]</p>	1.19	3.5 (A)
 <p>Ácido salicílico [69-72-7]</p>	2.26	13.4 (A) 2.97 (A)	 <p>Diclofenac [15307-86-5]</p>	4.40	4.5 (A)
 <p>Fenbufeno [36330-85-5]</p>	3.62	4.51 (A)	 <p>Fentiazac [18046-21-4]</p>	5.19	3.6 (A)
 <p>Flurbiprofeno [5104-49-4]</p>	4.16	4.27 (A)	 <p>Ibuprofeno [15687-27-1]</p>	3.50	5.2 (A)
 <p>Ibuproxam [53648-05-8]</p>	2.79 ^a	(N)	 <p>Indometacina [53-86-1]</p>	4.27	4.5 (A)
 <p>Ketoprofeno [22071-15-4]</p>	3.12	4.6 (A)	 <p>Nabumetona [42924-53-8]</p>	3.08	(N)

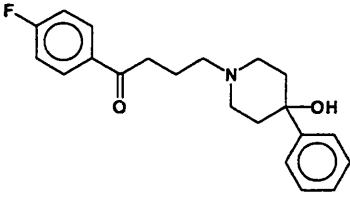
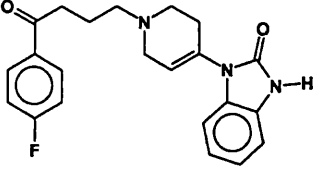
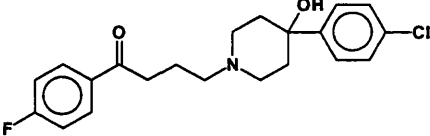
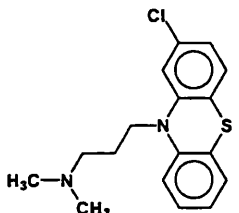
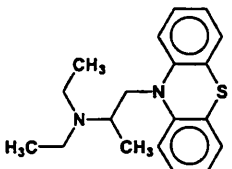
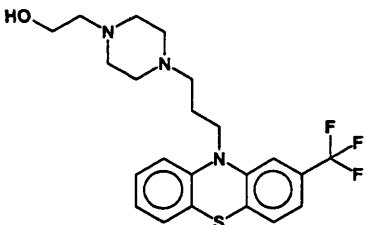
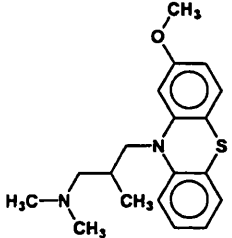
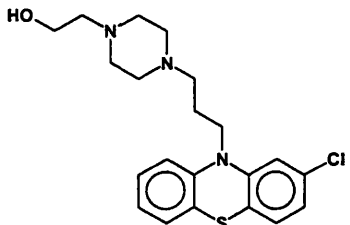
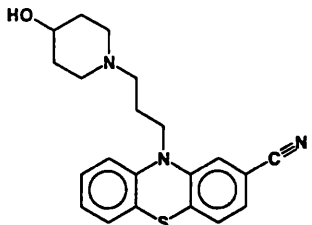
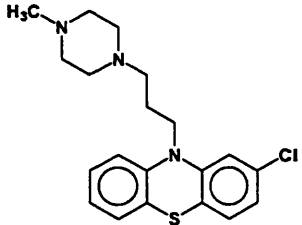
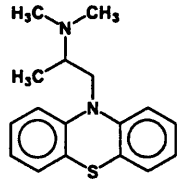
(Continúa en la página siguiente)

Compuesto [N° CAS]	log P	log K _H	Compuesto [N° CAS]	log P	log K _H
 Naproxeno [22204-53-1]	3.18	4.2 (A)	 Piketoprofeno [60576-13-8]	4.24 ^b	(N)
 Sulindac [38194-50-2]	3.42	4.5 (A)	 Tolmetín [26171-23-3]	2.79	3.5 (A)

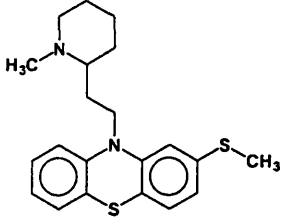
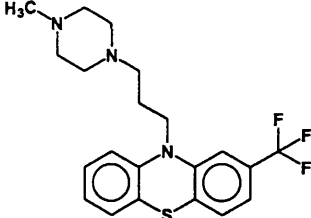
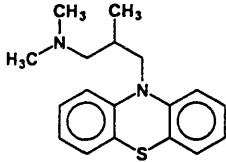
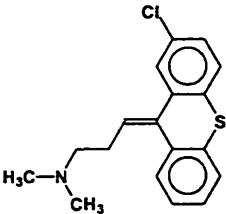
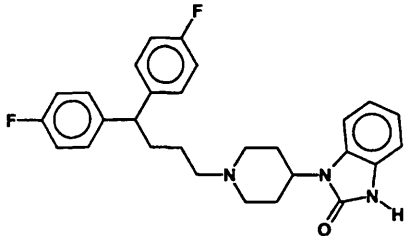
^a Valor de log P calculado con el programa KOWWIN (v. 1.66).

^b Valor de log P calculado con el programa CLOGP (Hansch C., 1990-b).

XII.2.6.- Antipsicóticos

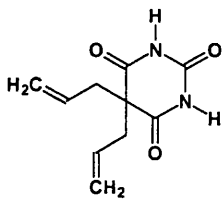
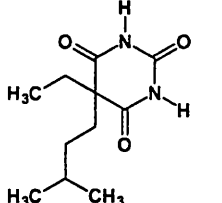
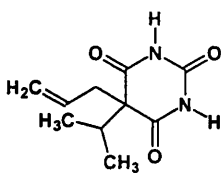
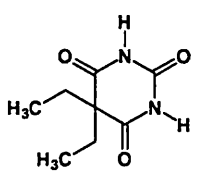
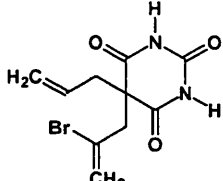
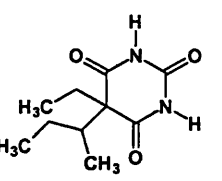
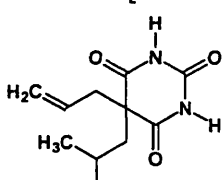
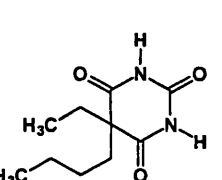
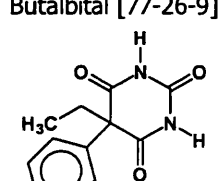
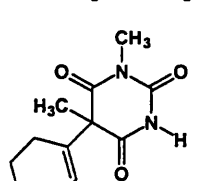
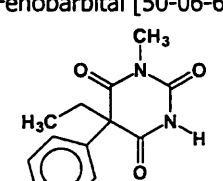
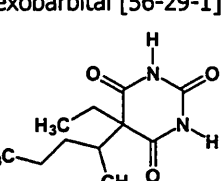
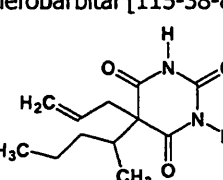
Compuesto [N° CAS]	logP	logK _H	Compuesto [N° CAS]	logP	logK _H
Butirofenonas					
 Bromperidol [10457-90-6]	4.45 ^a	8.65 (B)	 Droperidol [548-73-2]	3.50	7.6 (B)
 Haloperidol [52-86-8]	3.36	8.3 (B)			
Fenotiazinas					
 Clorpromazina [50-53-3]	5.35	9.3 (B)	 Etopropazina [522-00-9]	4.77	9.6 (B)
 Flufenazina [69-23-8]	4.36	8.1 (B) 3.9 (B)	 Metotrimeprazina [60-99-1]	4.68	9.2 (B)
 Perfenazina [58-39-9]	4.20	7.8 (B) 3.7 (B)	 Periciazina [2622-26-6]	3.52	8.3 (B)
 Proclorperazina [58-38-8]	4.88	8.1 (B) 3.78 (B)	 Prometazina [60-87-7]	4.81	9.1 (B)

(Continúa en la página siguiente)

Compuesto [N° CAS]	log P	log K _H	Compuesto [N° CAS]	log P	log K _H
 Tioridazina [50-52-2]	5.9	9.5 (B)	 Trifluoperazina [117-89-5]	5.03	8.1 (B)
 Trimeprazina [84-96-8]	4.71	9.0 (B)			
Otros antipsicóticos					
 Clorprotixeno [113-59-7]	5.18	7.6 (B)	 Pimozida [2062-78-4]	6.3	8.6 (B) 7.3 (B)

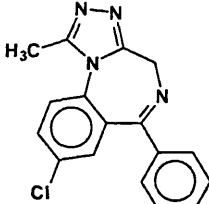
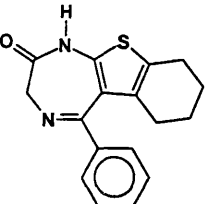
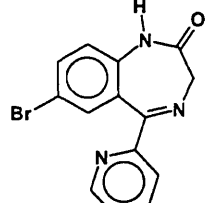
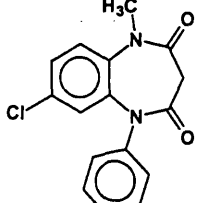
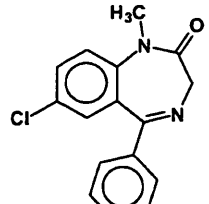
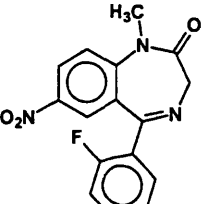
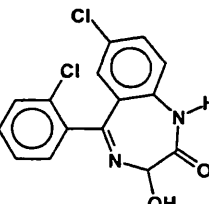
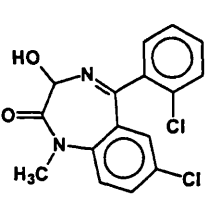
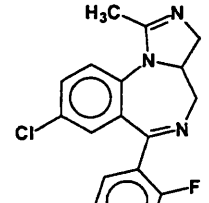
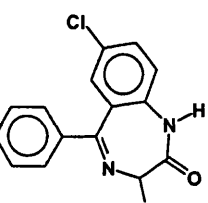
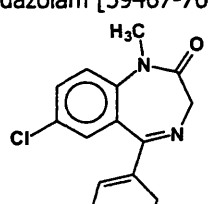
^a Valor de log P calculado con el programa KOWWIN (v. 1.66).

XII.2.7.- Barbitúricos

Compuesto [N° CAS]	log P	log K _H	Compuesto [N° CAS]	log P	log K _H
 Alobarbital [52-43-7]	1.05	7.77 (A)	 Amobarbital [57-43-2]	2.07	7.8 (A)
 Aprobarbital [77-02-01]	1.15	7.99 (A)	 Barbital [57-44-3]	0.65	7.97 (A)
 Bralobarbital [561-86-4]	1.71 ^a	7.7 (A)	 Butabarbital [125-40-6]	1.65	7.9 (A)
 Butalbital [77-26-9]	1.87 ^a	7.79 (A)	 Butetal [77-28-1]	1.73	8.1 (A)
 Fenobarbital [50-06-6]	1.47	7.4 (A)	 Hexobarbital [56-29-1]	1.49	8.2 (A)
 Mefobarbital [115-38-8]	1.84	7.8 (A)	 Pentobarbital [76-74-4]	2.07	8.0 (A)
 Secobarbital [76-73-3]	1.97	12.6 (A) 7.9 (A)			

^a Valor de log P calculado con el programa KOWWIN (v. 1.66).

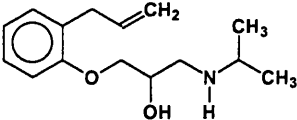
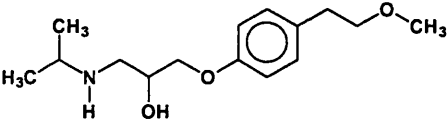
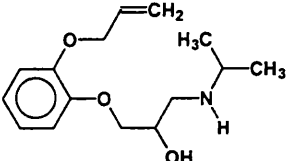
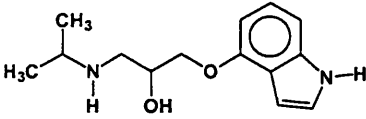
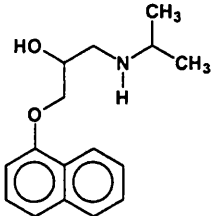
XII.2.8.- Benzodiazepinas

Compuesto [N° CAS]	log <i>P</i>	log <i>K</i> _H	Compuesto [N° CAS]	log <i>P</i>	log <i>K</i> _H
 Alprazolam [28981-97-7]	2.12	6.2 (B)	 Bentazepam [29462-18-8]	3.36 ^a	(N)
 Bromazepam [1812-30-02]	2.05	11.0 (A) 2.9 (B)	 Clobazam [22316-47-8]	2.12	(N)
 Diazepam [439-14-5]	2.80	3.3 (B)	 Flunitrazepam [1622-62-4]	2.06	1.8 (B)
 Lorazepam [846-49-1]	2.51	11.5 (A) 1.3 (B)	 Lormetazepam [848-75-9]	2.23 ^b	(N)
 Midazolam [59467-70-8]	4.33 ^b	6.2 (B)	 Oxazepam [604-75-1]	2.24	11.6 (A) 1.7 (B)
 Tetrazepam [10379-14-3]	3.2	(N)			

^a Valor de log*P* calculado con el programa CLOGP (Hansch *C.*, 1990-*b*).

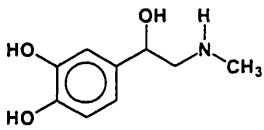
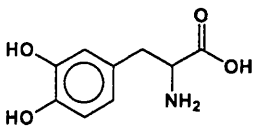
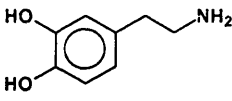
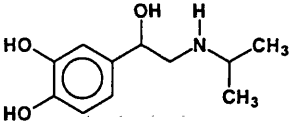
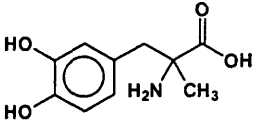
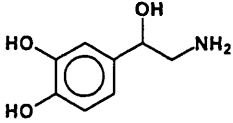
^b Valor de log*P* calculado con el programa KOWWIN (v. 1.66).

XII.2.9.- β-Bloqueantes

Compuesto [N° CAS]	log <i>P</i>	log <i>K_H</i>	Compuesto [N° CAS]	log <i>P</i>	log <i>K_H</i>
 Alprenolol [13655-52-2]	3.1	9.65 (B)	 Metoprolol [37350-58-6]	1.88	9.7 (B)
 Oxprenolol [6452-71-7]	2.18	9.5 (B)	 Pindolol [13523-86-9]	1.75	9.7 (B) 8.8 (B)
 Propranolol [318-98-9] ^a	3.56	9.45 (B)			

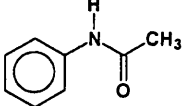
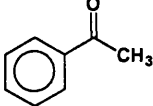
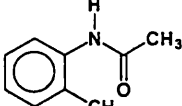
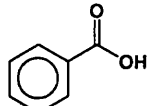
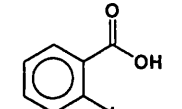
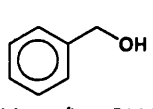
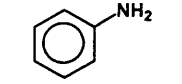
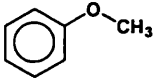
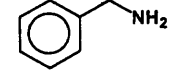
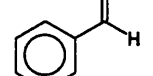
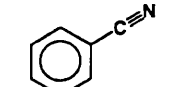
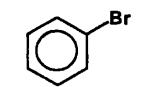
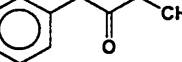
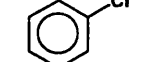
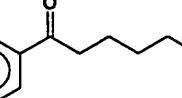
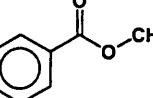
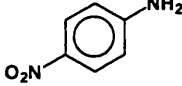
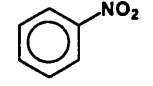
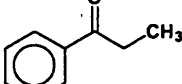
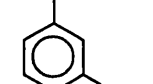
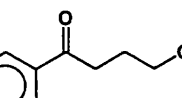
^a Número CAS correspondiente a la sal clorhidrato.

XII.2.10.- Catecolaminas

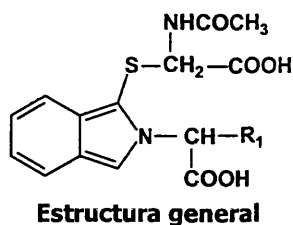
Compuesto [N° CAS]	log P	log K _H	Compuesto [N° CAS]	log P	log K _H
 Adrenalina [51-43-4]	-0.63	12.0 (A) 10.2 (A) 8.7 (B)	 L-Dopa [59-92-7]	-0.22	13.4 (A) 9.7 (A) 8.7 (B) 3.8 (A) ^a
 Dopamina [51-61-6]	0.12	13.0 (A) 9.9 (A) 8.7 (B)	 Isoproterenol [7683-59-2]	0.25	12.0 (A) 10.1 (A) 8.6 (B)
 2-Metil-L-dopa [555-30-6]	0.12	12.0 (A) 10.6 (A) 9.2 (B) 4.2 (A) ^a	 Noradrenalina [51-41-2]	-0.88	12.0 (A) 9.8 (A) 8.6 (B)

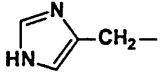
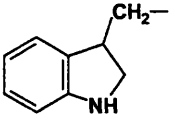
^a Constantes de protonación del grupo carboxilo en disolución micelar de SDS y a temperatura ambiente (Villanueva-Camañas R.M. y col., 1995).

XII.2.11.- Derivados del benceno mono- y di-sustituídos

Compuesto [N° CAS]	log <i>P</i>	log <i>K</i> _H	Compuesto [N° CAS]	log <i>P</i>	log <i>K</i> _H
 Acetanilida [103-84-4]	1.16	0.5 (B)	 Acetofenona [96-86-2]	1.58	(N)
 o-Acetotoluidida [120-66-1]	0.85	(N)	 Ácido benzoico [65-85-0]	1.87	4.2 (A)
 Ácido 2-iodobenzoico [88-67-5]	2.4	2.93 (A)	 Alcohol bencílico [100-51-6]	1.10	(N)
 Anilina [62-53-3]	0.9	4.6 (B)	 Anisol [100-66-3]	2.11	(N)
 Bencilamina [100-46-9]	1.49	9.33 (B)	 Benzaldehido [100-52-7]	1.48	(N)
 Benzonitrilo [100-47-0]	1.56	(N)	 Bromobenceno [108-86-1]	2.99	(N)
 Butirofenona [495-40-9]	2.65	(N)	 Clorobenceno [108-90-7]	2.84	(N)
 Hexanofenona [942-92-7]	3.58	(N)	 Metilbenzoato [93-58-3]	2.12	(N)
 p-Nitroanilina [100-01-6]	1.39	1.0 (B)	 Nitrobenceno [98-95-3]	1.85	(N)
 Propiofenona [93-55-0]	2.19	(N)	 Resorcinol [108-46-3]	0.8	11.32 (A) 9.15 (A)
 Valerofenona [1009-14-9]	3.11	(N)			

XII.2.12.- Derivados OPA-NAC de aminoácidos

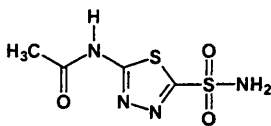
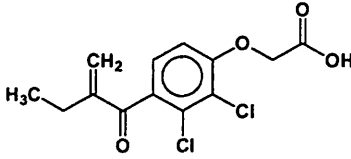
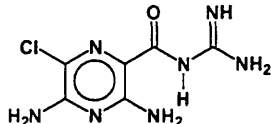
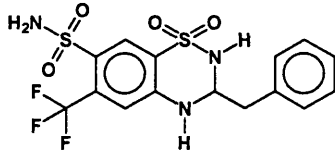
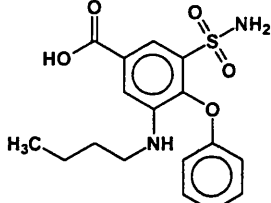
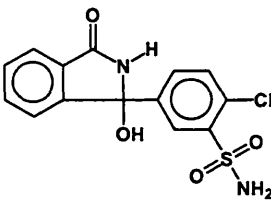
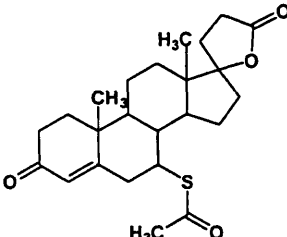
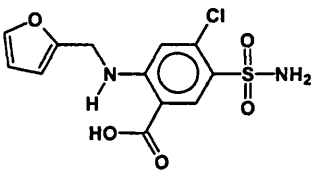
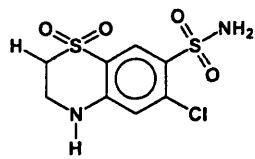
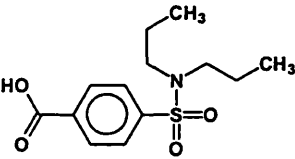
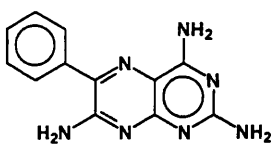
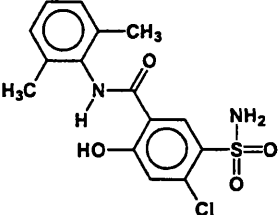


Compuesto	R ₁	log P ^a	log K _H ^b (α-CO ₂ H)	log K _H (α-NH ₃ ⁺)	log K _H (R ₁)
Ácido aspártico	-CH ₂ -COOH	0.78	3.1	9.60	3.9 (A)
Ácido glutámico	-CH ₂ -CH ₂ -COOH	0.89	3.1	9.67	4.32 (A)
Alanina	-CH ₂ -CONH ₂	0.28	3.3	9.69	(N)
Arginina	-(CH ₂) ₃ -NH -C(NH ₂) =NH	0.38	4.02	9.04	13.2 (B)
Cisteína	-CH ₂ -SH	0.12	3.39	8.18	8.35 (A)
Glicina	-H	1.37	3.1	9.60	(N)
Histidina		1.02	2.9	9.17	6.05 (B)
Isoleucina	-CH(CH ₃)-CH ₂ -CH ₃	2.89	3.72	9.68	(N)
Leucina	-CH ₂ -CH(CH ₃)-CH ₃	3.06	3.72	9.60	(N)
Lisina	-(CH ₂) ₄ -NH ₂	1.53	3.29	9.12	10.8 (B)
Metionina	-CH ₂ -CH ₂ -SCH ₃	2.71	2.8	9.21	(N)
Fenilalanina	-CH ₂ -Ph	3.06	3.5	9.13	(N)
Treonina	-CH(CH ₃)-OH	1.64	3.2	9.62	(N)
Triptófano		3.52	3.2	9.39	(N)
Tirosina	-CH ₂ -Ph -OH	2.32	3.5	9.11	9.11 (A)
Valina	-CH(CH ₃)-CH ₃	2.32	3.4	9.62	(N)

^a Valores de log P de los derivados OPA-NAC de aminoácidos obtenidos con el programa ACD/logP (versión de demostración).

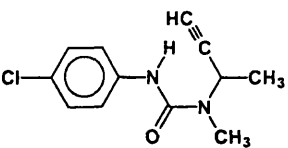
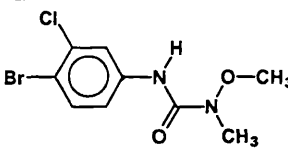
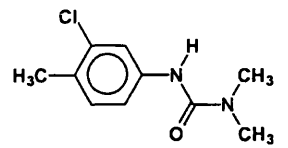
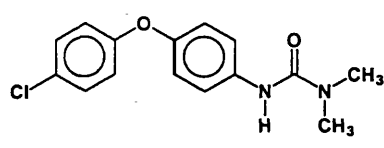
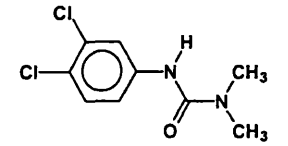
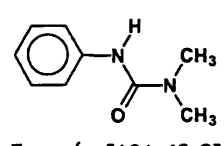
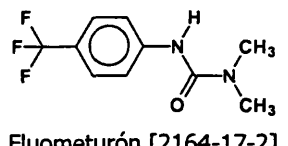
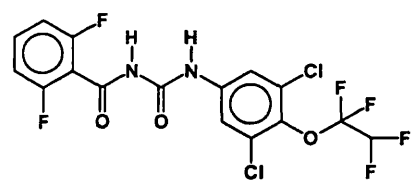
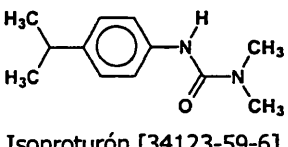
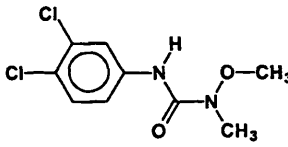
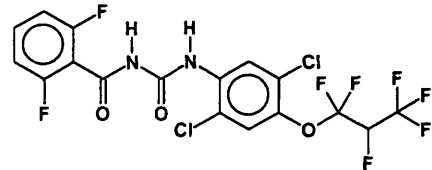
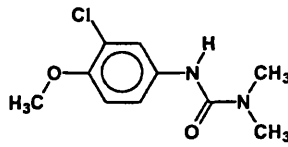
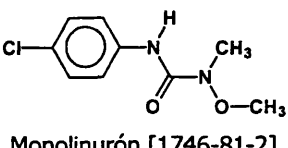
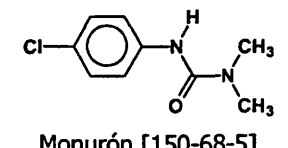
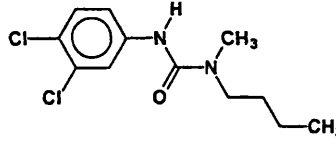
^b Constantes de protonación del grupo carboxilo en medio micelar de SDS y a temperatura ambiente.

XII.2.13.- Diuréticos

Compuesto [N° CAS]	logP	logK _H	Compuesto [N° CAS]	logP	logK _H
 Acetazolamida [59-66-5]	-0.26	9.0 (A) 7.2 (A)	 Ácido etacrínico [58-54-8]	3.88	4.19 (A) ^a
 Amilorida [2609-46-3]	0.09	8.7 (B)	 Bendroflumetiazida [73-48-3]	2.02	8.5 (A)
 Bumetanida [28395-03-1]	2.78	10.0 (A) 7.7 (A) 5.2 (A) ^a	 Clortalidona [77-36-1]	0.24	9.4 (A)
 Espironolactona [52-01-7]	5.053	(N)	 Furosemida [54-31-9]	2.29	7.5 (A) 4.42 (A) ^a
 Hidroclorotiazida [58-93-5]	-0.07	9.2 (A) 7.0 (A)	 Probenecid [57-66-9]	3.30	4.65 (A) ^a
 Triamtereno [396-01-0]	1.30	6.2 (B)	 Xipamida [14293-44-8]	4.01	10.0 (A) 5.47 (A) ^a

^a Constantes de protonación en disolución micelar de SDS y temperatura ambiente (Bonet-Domingo E. y col., 1994).

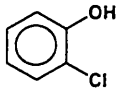
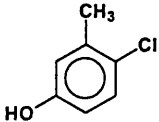
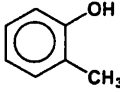
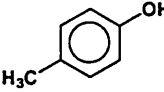
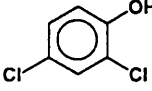
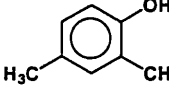
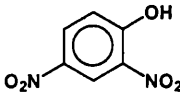
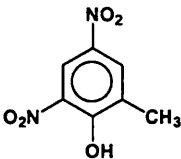
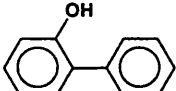
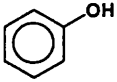
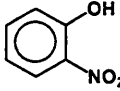
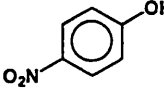
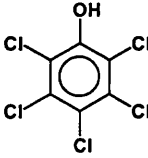
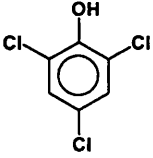
XII.2.14.- Fenilureas

Compuesto [Nº CAS]	logP	logK _H	Compuesto [Nº CAS]	logP	logK _H
 Buturón [3766-60-7]	3.00	(N)	 Clorbromurón [13360-45-7]	3.09	(N)
 Clorotolurón [15545-48-9]	2.41	(N)	 Cloroxurón [1982-47-4]	3.7	(N)
 Diurón [330-54-1]	2.68	(N)	 Fenurón [101-42-8]	0.98	(N)
 Fluometurón [2164-17-2]	2.42	(N)	 Hexaflumurón [86479-06-3]	5.64 ^a	(N)
 Isoproturón [34123-59-6]	2.87	(N)	 Linurón [330-55-2]	3.2	(N)
 Lufenurón [103055-07-8]	6.61 ^a	(N)	 Metoxurón [19937-59-8]	1.64	(N)
 Monolinurón [1746-81-2]	2.30	(N)	 Monurón [150-68-5]	1.94	(N)
 Neburón [555-37-3]	4.15 ^a	(N)			

^a Valor de logP calculado con el programa KOWWIN (v. 1.66).

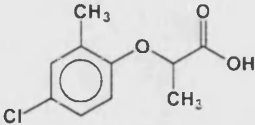
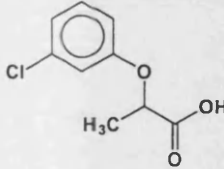
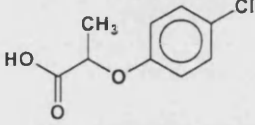
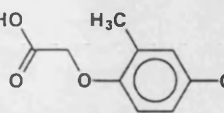
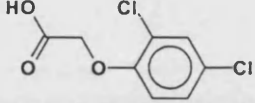
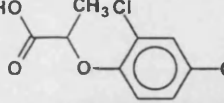
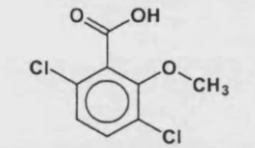
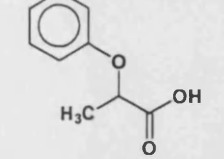
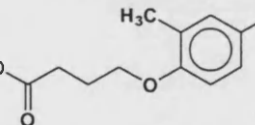
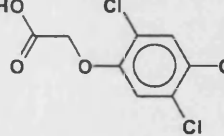
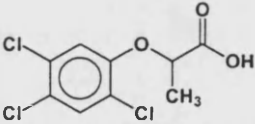


XII.2.15.- Fenoles

Compuesto [N° CAS]	log P	log K _{ow}	Compuesto [N° CAS]	log P	log K _{ow}
 2-Clorofenol [95-57-8]	2.15	8.56 (A)	 4-Cloro-3-metilfenol [59-50-7]	3.1	9.55 (A)
 o-Cresol [95-48-7]	1.95	10.3 (A)	 p-Cresol [106-44-5]	1.94	10.3 (A)
 2,4-Diclorofenol [120-83-2]	3.06	7.89 (A)	 2,4-Dimetilfenol [105-67-9]	2.30	10.6 (A)
 2,4-Dinitrofenol [51-28-5]	1.67	4.09 (A)	 4,6-Dinitro-o-cresol [534-52-1]	2.12	4.31 (A)
 2-Fenilfenol [90-43-7]	3.28 ^a	9.97 (A)	 Fenol [108-95-2]	1.46	9.99 (A)
 2-Nitrofenol [88-75-5]	1.79	7.23 (A)	 4-Nitrofenol [100-02-7]	1.91	7.15 (A)
 Pentaclorofenol [87-86-5]	5.12	4.7 (A)	 2,4,6-Triclorofenol [88-06-2]	3.69	6.23 (A)

^a Valor de log P calculado con el programa KOWWIN (v. 1.66).

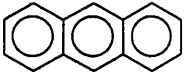

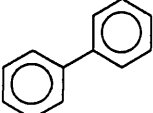
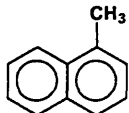
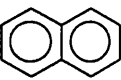
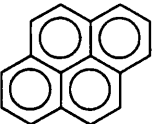
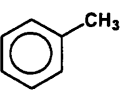
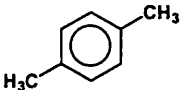
XII.2.16.- Fenoxiácidos

Compuesto [N° CAS]	log P	log K _{ow}	Compuesto [N° CAS]	log P	log K _{ow}
 Ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropiónico [93-65-2]	3.13	3.1 (A)	 Ácido 2-(3-clorofenoxi)propiónico [101-10-0]	2.39 ^a	<5 ^b (A)
 Ácido 2-(4-clorofenoxi)propiónico [3307-39-9]	2.31	<5 ^b (A)	 Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético [97-74-6]	3.25	3.13 (A)
 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético [94-75-7]	2.81	2.73 (A)	 Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)propiónico [120-36-5]	3.43	3.1 (A)
 Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico [1918-00-9]	2.21	1.97 (A)	 Ácido 2-fenoxipropiónico [940-31-8]	1.75 ^a	<5 ^b (A)
 Ácido 4-(2-metil-4-clorofenoxi)butírico [94-81-5]	3.50 ^a	6.2 (A)	 Ácido (2,4,5-triclorofenoxi)acético [93-76-5]	3.31	2.83 (A)
 Ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propiónico [93-72-1]	3.80	2.84 (A)			

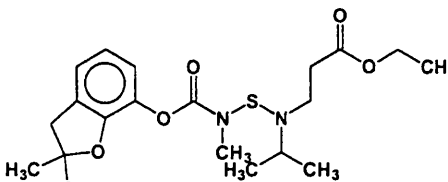
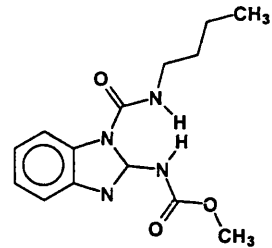
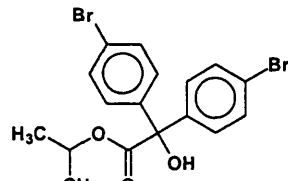
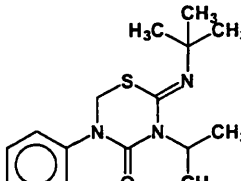
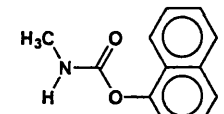
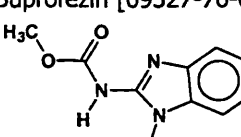
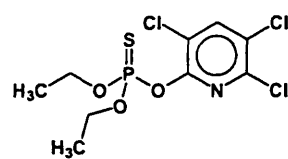
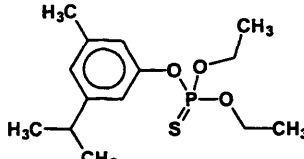
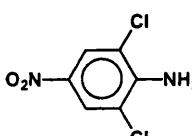
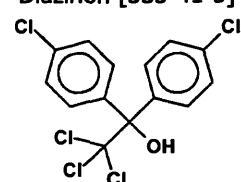
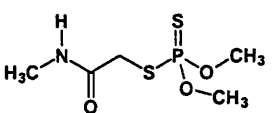
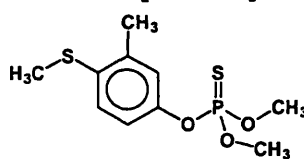
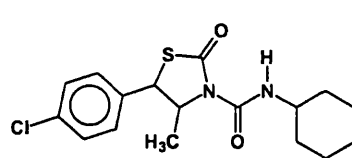
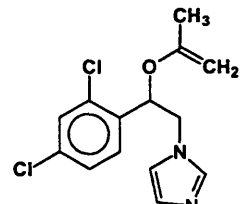
^a Valor de log P calculado con el programa KOWWIN (v. 1.66).^b Valor estimado.

Nomenclatura sistemática	Nomenclatura común
Ácido 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropiónico	Meclorprop; MCPP
Ácido 2-(3-clorofenoxi)propiónico	3-CPPA
Ácido 2-(4-clorofenoxi)propiónico	4-CPPA
Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético	MCPA
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,4-D
Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)propiónico	Diclorprop; 2,4-DP; 2,4-DCPPA
Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico	Dicamba; DC
Ácido 2-fenoxipropiónico	2-PPA
Ácido 4-(2-metil-4-clorofenoxi)butírico	MCPB
Ácido (2,4,5-triclorofenoxi)acético	2,4,5-T
Ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propiónico	Sílvex; 2,4,5-TCPPA

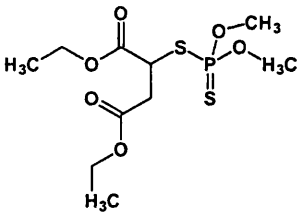
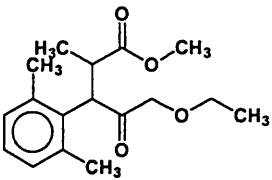
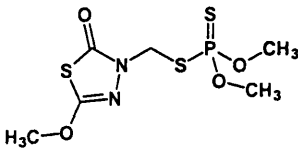
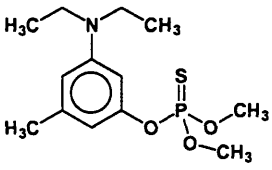
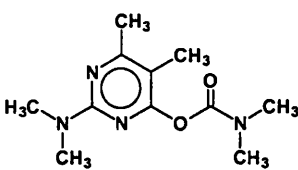
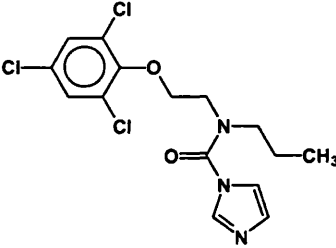
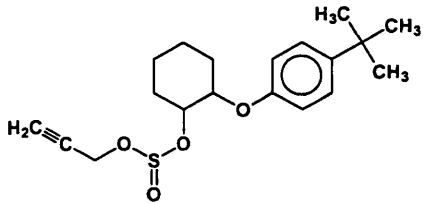
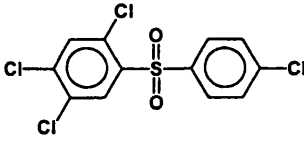
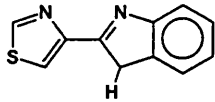
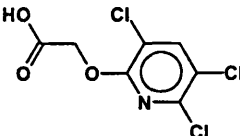
XII.2.17.- Hidrocarburos aromáticos

Compuesto [N° CAS]	log P	log K _H	Compuesto [N° CAS]	log P	log K _H
 Antraceno [120-12-7]	4.45	(N)	 Benceno [71-43-2]	2.13	(N)
 Bifenilo [92-52-4]	3.98	(N)	 1-Metilnaftaleno [90-12-0]	3.93	(N)
 Naftaleno [91-20-3]	3.3	(N)	 Pireno [129-00-0]	4.88	(N)
 Tolueno [108-88-3]	2.73	(N)	 <i>p</i> -Xileno	3.13	(N)

XII.2.18.- Otros plaguicidas

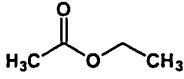
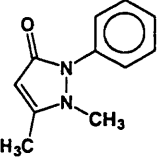
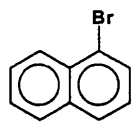
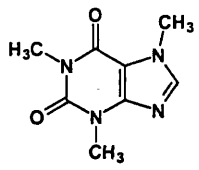
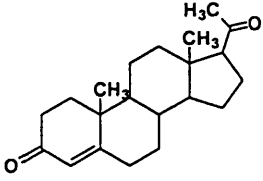
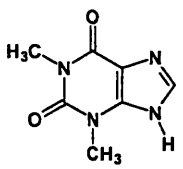
Compuesto [N° CAS]	log P ^a	log K _H	Compuesto [N° CAS]	log P ^a	log K _H
 Benfuracarb [82560-54-1]	4.06	-	 Benomilo [17804-35-2]	2.24	-
 Bromopropilato [18181-80-1]	4.90	(N)	 Buprofezin [69327-76-0]	4.30	-
 Carbarilo [63-25-2]	2.35	(N)	 Carbendazim [10605-21-7]	1.55	4.20 (B)
 Clorpirifós [2921-88-2]	4.66	-	 Diazinón [333-41-5]	3.86	(N)
 Diclorán [99-30-9]	2.76	-2.55 (B)	 Dicofol [115-32-2]	5.81	(N)
 Dimetoato [60-51-5]	0.28	(N)	 Fentión [55-38-9]	4.08	(N)
 Hexitiazox [78587-05-0]	5.57	(N)	 Imazalil [35554-44-0]	4.10	6.53 (B)

(Continúa en la página siguiente)

Compuesto [N° CAS]	log P ^a	log K _H	Compuesto [N° CAS]	log P ^a	log K _H
 <p>Malatión [121-75-5]</p>	2.29	(N)	 <p>Metalaxil [57837-19-1]</p>	1.70	(N)
 <p>Metidatión [950-37-8]</p>	1.58	-	 <p>Metilpirimifós [29232-93-7]</p>	3.44	3.71 (B)
 <p>Pirimicarb [23103-98-2]</p>	1.4	4.53 (B)	 <p>Procloraz [67747-09-5]</p>	4.13	3.80 (B)
 <p>Propargite [2312-35-8]</p>	5.57	(N)	 <p>Tetradifón [116-29-0]</p>	5.18	(N)
 <p>Tiabendazol [148-79-8]</p>	2.00	4.64 (B)	 <p>Triclopir [55335-06-3]</p>	2.53	3.97 (B)

^a Valores de log P calculados con el programa KOWWIN (v. 1.66).

XII.2.19.- Otros compuestos orgánicos

Compuesto [N° CAS]	log P	log K _H	Compuesto [N° CAS]	log P	log K _H
 Acetato de etilo [141-78-6]	0.73	(N)	 Antipirina [60-80-0]	0.38	1.45 (B)
 1-Bromonaftaleno [90-11-9]	4.23	(N)	 Cafeína [58-08-2]	-0.07	14.0 (A) 0.6 (B)
 Progesterona [57-83-0]	3.87	(N)	 Teofilina [58-55-9]	-0.02	8.6 (A) 3.5 (B)

XII.3.- Anexo III: propiedades de los surfactantes utilizados

Surfactante	Fórmula molecular	Carácter	C_M (M) ^a	N^b
Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)	$CH_3(CH_2)_{15}N^+(CH_3)_3 Br^-$	Catiónico	0.0013	78
Dodecilsulfato sódico (SDS)	$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3^- Na^+$	Aniónico	0.0081	62
Polioxietileno(23)lauril éter (Brij35)	$CH_3(CH_2)_{11}(CH_2CH_2O)_{23}OH$	No iónico	0.0001	40

^a Concentración micelar crítica a 25 °C.

^b Número de agregación.


VNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE QUÍMICA

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la fecha, acordó otorgar a esta Tesis doctoral de

D. *Laura Escuder Gilibert*
 la calificación de *EXCELENTE CUM LAUDE*

Valencia, a *11* de *Diciembre* de 2005

El Secretario,

[Firma manuscrita]


Nº 688 del registro de tesis de la Facultad

✓

1. The first part of the text discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. This is essential for ensuring the integrity of the financial statements and for providing a clear audit trail. The second part of the text focuses on the need for transparency and accountability in the reporting process. This involves providing detailed explanations for any significant changes or discrepancies in the data. The final part of the text emphasizes the importance of regular communication and collaboration between the reporting entity and the auditors to resolve any issues promptly and ensure the accuracy of the final report.