

**LOS RETOS DE LA QUÍMICA ANALÍTICA
EN LA
IONTOFORESIS REVERSA**

por

Dña. Concepción Sánchez-Pedreño Martínez

A Ángel, *in memoriam*

Excmo. Sr. Presidente

Ilma. Sra. e Ilmos. Sres. Académicos

Sras. y Sres.

Sean mis primeras palabras de inmenso agradecimiento a los Ilustres Académicos de la Academia de Ciencias de la Región de Murcia, por el gran honor que me han otorgado al nombrarme Académica de Honor de tan prestigiosa institución.

Cuando se me consultó sobre mi aceptación del nombramiento, mi primera sensación fue de enorme sorpresa que, seguidamente, pasó a la de sentirme abrumada, pues no me consideraba con méritos para alcanzar tan alta distinción.

En el desarrollo de mi dilatada vida profesional, como docente e investigadora en Química Analítica, creo con toda sinceridad que solamente podría aportar el haberla desarrollado con vocación, gran esfuerzo y

entusiasmo. Después de meditar un cierto tiempo, comprendí que debía aceptar el nombramiento con complacencia y profundo reconocimiento.

En estos momentos, confieso públicamente que nunca pude ni remotamente vislumbrar, que mi carrera universitaria finalizara con este broche de oro que, por otra parte, me compromete a una modesta pero ilusionada colaboración con la Academia de Ciencias de la Región de Murcia.

La primera y difícil disquisición que se me presentó fue la elección del tema científico que debería exponer en este solemne acto. Después de considerar varias ideas, y emprender algún intento, me decidí finalmente por uno de los temas de investigación incluidos en un proyecto de investigación concedido reciente por el Ministerio de Educación y Ciencia, al equipo de investigación al que pertenezco. En consecuencia, el tema de esta exposición versa sobre “Los retos de la Química Analítica en la Iontoforesis Reversa”.

Si consideramos la reciente definición del Profesor Valcárcel “*La Química Analítica es una ciencia metrológica que desarrolla, optimiza y aplica herramientas (materiales, metodológicas y estratégicas) de amplia naturaleza, que se concretan en procesos de medida encaminados a obtener información (bio)química de calidad, tanto parcial (presencia /concentración en muestra de especies-analitos (bio)químicos) como global*

sobre materias o sistemas de amplia naturaleza (química, bioquímica, biológica) en el espacio y en el tiempo para resolver problemas científicos, técnicos, económicos y sociales”.

En esta amplia definición se resalta el hecho de que en la actualidad, el objeto, los contenidos y la proyección social de la Química Analítica son muy amplios. Bajo esta visión, la Iontoforesis Reversa se encuentra inmersa dentro de la Química Analítica.

FUNDAMENTOS DE LA IONTOFORESIS REVERSA

El control continuo de ciertas sustancias en el organismo humano es esencial para asegurar la eficacia en el tratamiento de varias enfermedades, así como para evitar efectos adversos. Los estudios farmacocinéticos en general y el control terapéutico de fármacos en pacientes en particular, se basan principalmente en la toma de muestras de sangre. Los muestreos menos invasivos, como los de muestras de orina y/o saliva, sólo son útiles para la determinación analítica de ciertas especies. La naturaleza invasiva de la punción para la obtención de sangre limita en muchos casos la frecuencia del control terapéutico, debido a la sensación desagradable asociada al proceso de toma de muestra y al riesgo de infección. Los casos de pacientes insuficientemente controlados ó sin datos farmacocinéticos disponibles, pueden constituir un serio problema.

Por todo ello, existe gran interés en el desarrollo de técnicas no invasivas que suministren información acerca de las concentraciones plasmáticas de sustancias endógenas y de fármacos. La piel ofrece, en principio, una superficie extensa y accesible para realizar el muestreo de estas sustancias. Ya primeras investigaciones demostraron la utilidad del paso a través de la piel (transdérmico) de sustancias por difusión pasiva y por secreción del sudor. Sin embargo, estos mecanismos son lentos y poco eficaces, ya que se requieren tiempos largos para que se acumule la cantidad de sustancia suficiente para que pueda ser analizada, lo que convierte al método en impracticable para un seguimiento farmacológico. Sin embargo, el flujo de sustancias a través de la piel se puede aumentar considerablemente por “iontoforesis”, la cual implica la aplicación de una pequeña corriente eléctrica a través de la piel. Este proceso origina un aumento en el transporte molecular a través de la barrera de la piel y ha encontrado amplia aplicación en la introducción transdérmica de sustancias.

El concepto de la iontoforesis no es nuevo, sus principios básicos fueron ya establecidos por Leduc a principios del siglo pasado. Sin embargo, ha sido recientemente cuando se ha conseguido que los sistemas iontoforéticos de transporte transdérmico hayan llegado al mercado. El proceso iontoforético de transporte hacia los tejidos, de sustancias con actividad farmacológica disueltas en un electrolito, es actualmente un método aceptado para la terapia con ciertos fármacos y ha alcanzado amplia aplicación. La técnica suministra un método no invasivo para controlar la

administración sistémica de pequeñas cantidades de especies con actividad farmacológica a través de la piel. El método de transporte es simple, versátil, efectivo, seguro y puede adaptarse a las necesidades individuales.

Los componentes del equipo son: una fuente de alimentación, un miliamperímetro, un reostato y un sistema electródico (ánodo y cátodo). Este proceso iontoforético que podríamos denominar “iontoforesis directa” ha encontrado amplio campo de aplicación en distintas especialidades médicas. Así, en Dermatología se utiliza en el tratamiento de la hiperhidrosis, en el tratamiento con sales cúpricas para infecciones por hongos, con sales de cinc para el tratamiento de úlceras, con histamina en pruebas de alergia y en la diagnosis de la fibrosis quística mediante la introducción de pilocarpina para la producir la secreción de sudor, entre otras. En Oftalmología, para la introducción de diversos fármacos, como atropina, fluoresceína ó gentamicina. En Estomatología para evitar la hipersensibilidad de la dentina y suministrar anestésicos locales. En Cardiología, para el suministro iontoforético miocardial de fármacos antiarrítmicos. Además, en general se utiliza para el suministro de fármacos, tales como algunos agentes antihipertensivos, antiabéticos, anti-reumáticos, hormonas, vasodilatadores y esteroides, entre otros.

Ahora bien, la simetría de la iontoforesis implica que también se puedan extraer moléculas desde el compartimiento subdérmico a la superficie de la piel. Se tiene entonces el proceso denominado “iontoforesis reversa” que será el tema de esta disertación. El proceso de la “iontoforesis

reversa” ofrece un potencial muy amplio para su uso en Análisis Clínico sin necesidad de muestreo de sangre. Las aplicaciones pueden incluir la química general sanguínea, el control de la glucosa, la detección de marcadores diagnósticos y la monitorización terapéutica de fármacos.

El mecanismo de extracción de sustancias en la iontoforesis reversa implica: electromigración de especies cargadas al electrodo de polaridad opuesta y transporte electroosmótico de moléculas polares neutras y zwitteriónicas hacia el cátodo. En la iontoforesis reversa, se aplica una corriente constante de modo que se produce un flujo de electrones en los conductores metálicos del circuito y un flujo de iones a través de la piel.

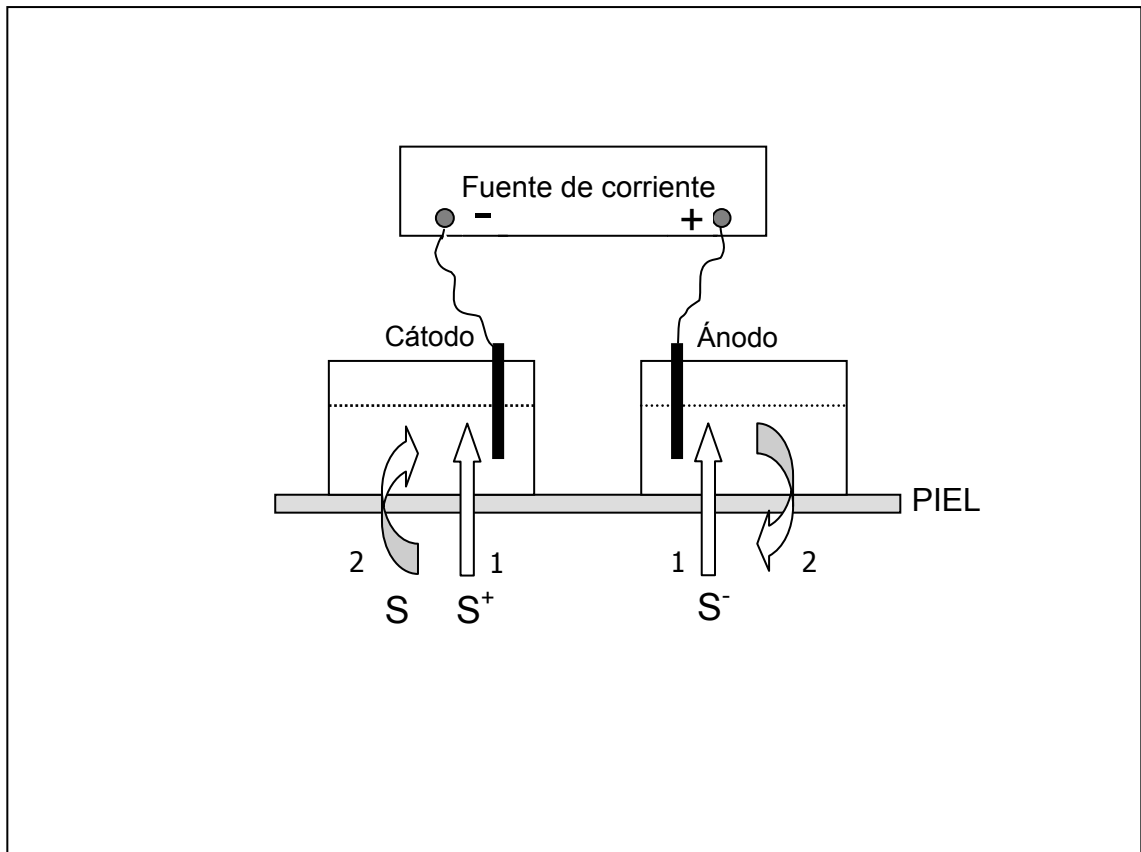


Diagrama esquemático del dispositivo experimental y de los procesos implicados en la iontoforesis inversa: (1) electromigración y (2) electroósmosis.

La cantidad de carga electrónica que fluye a través del conductor metálico está exactamente compensada con la cantidad de carga iónica que fluye a través de la piel. La ley de Faraday aplicada al transporte en el estado estacionario relaciona el número de moles de iones que atraviesan la

piel con la corriente eléctrica, el tiempo de paso de corriente y la carga del ion:

$$M_i = \frac{Ti_i}{Fz_i} \quad (1)$$

donde M_i es el número de moles del ion i , T es el tiempo en segundos, z_i es la valencia, F es la constante de Faraday ($96.487 \text{ C mol}^{-1}$) y i_i es la corriente (A) transportada por la especie i .

Dado que habitualmente hay distintos iones en movimiento a través de la piel, el número total de moles transportados (M) por la corriente total que fluye (I) viene dado por:

$$M = \sum_i M_i = \frac{T}{F} \sum_i \frac{i_i}{z_i} \quad (2)$$

con

$$I = \sum_i i_i \quad (3)$$

lo que conduce al concepto de número de transporte del ión (eficacia del transporte), el cual corresponde a la fracción de la carga total que transporta dicho ión:

$$t_i = \frac{q_i}{I} \quad (4)$$

con lo que la ecuación (1) puede escribirse como:

$$M_i = \frac{t_i I T}{F z_i} \quad (5)$$

El flujo de extracción del ion i medido experimentalmente (J_i , mol s⁻¹) se define como la relación entre el número de moles transportados (M_i) y tiempo de muestreo (T) (es decir la duración de la iontoforesis reversa):

$$J_i = \frac{M_i}{T} = \frac{t_i}{F z_i} I \quad (6)$$

La ecuación (5) muestra que la extracción iontoforética de un cierto ión viene determinada por la intensidad de corriente, el tiempo de iontoforesis y la carga y el número de transporte de dicho ión. La intensidad de corriente (I) está directamente controlada por la fuente empleada, pero está limitada en la práctica “in vivo” a no más de 0,5 mA cm⁻². El tiempo de cada extracción debe ser suficientemente largo para que se disponga de una cantidad suficiente de especie para su determinación analítica, pero no tan largo que se produzcan cambios clínicos significativos en la concentración sistémica. En cualquier caso, la iontoforesis reversa sólo puede suministrar

una estimación del nivel medio del analito en el organismo durante el periodo de muestreo.

La carga z_i del ión extraído viene determinada por su estructura molecular y determina la polaridad del electrodo en el cual se ha de efectuar el muestreo y el análisis. El número de transporte, sin embargo, es difícil de estimar teóricamente y depende de la contribución de otros iones al transporte de carga a través de la piel. Cuando se establece un campo eléctrico a través de una membrana, los iones migran en la dirección dictada por su carga. La velocidad de migración de un ión viene determinada por sus características físico-químicas así como por las propiedades del medio a través del cual se mueve.

La suma de las cargas iónicas individuales que fluyen a través de la piel debe ser igual al número de electrones liberados por la fuente eléctrica suministradora; en otras palabras, hay una competencia entre todos los iones presentes para transportar la carga. El número de transporte del ión de interés (i) puede expresarse también como:

$$t_i = \frac{c_i z_i \mu_i}{\sum_{j=1}^n (c_j z_j \mu_j)} \quad (7)$$

donde c_j es la concentración (mol cm^{-3}), z_j es la valencia y μ_j es la movilidad ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$) de cada uno de “ n ” iones en el sistema. Lógicamente, el número de transporte depende de la concentración (esto es de la cantidad disponible de un ión particular para participar en el transporte de carga a través de la piel).

En la iontoforesis reversa, la concentración del analito es la variable de interés y dependerá, en el caso del control de un fármaco, del régimen de dosificación y de su farmacocinética. Por otra parte, respecto a la electromigración, solamente la fracción ionizada del analito es extraíble y depende por tanto del valor de su pK_a . Por otra parte, para los analitos que se unen a proteínas, solamente la fracción libre puede contribuir significativamente al transporte de carga a través de la piel.

En resumen, podemos concluir que un ión puede actuar como un buen transportador de carga si: es pequeño, está cargado, se encuentra en alta concentración y no está enlazado significativamente a proteínas. Idealmente, deberían minimizarse los iones competidores, lo que en la práctica no es posible en la iontoforesis reversa, donde los principales transportadores de carga son Na^+ y Cl^- .

Por último es de resaltar que el número de transporte es un parámetro dependiente de la composición de la muestra y aplicable por tanto a unas condiciones dadas. El número de transporte t_i se puede determinar experimentalmente, por ejemplo, dividiendo la cantidad total del ión

transportado por la carga total liberada (ecuación 1) o a partir del gradiente de una representación del flujo del ión frente a la intensidad de corriente (ecuación 6).

Por otra parte, al pH fisiológico, la piel está cargada negativamente siendo por tanto selectivamente permeable a cationes. Cuando se impone un campo eléctrico a través de este tipo de membrana aparece un flujo convectivo o electroosmótico de disolvente desde el ánodo hacia el cátodo. Esta corriente de disolvente transporta solutos disueltos, por lo que aumenta el transporte moléculas neutras y, especialmente, polares. La electroósmosis refuerza por tanto el transporte de cationes mientras que actúa contra el de aniones. Las características importantes del mecanismo de transporte electroosmótico son: que el flujo en volumen de disolvente (J_{vd} , volumen x tiempo⁻¹ x área⁻¹) es proporcional al gradiente de potencial a través de la piel y que el flujo electroosmótico del soluto (J_i) es independiente del tamaño molecular. La relación entre el flujo molar J_i del soluto (i) y su concentración molar (c_i) viene dada por:

$$J_i = J_{vd}c_i \quad (8)$$

Se ha determinado el valor de flujo de disolvente durante un proceso de iontoforesis, encontrándose valores entre a 6 y 19 $\mu\text{l h}^{-1} \text{mA}^{-1}$.

Además de la densidad de corriente, el pH y la fuerza iónica son parámetros que pueden influir en la electroosmósis. Las variaciones del pH sobre cualquier lado de la piel pueden cambiar la carga de la membrana y por tanto la selectividad de la permeación. En la práctica *in vivo* solamente puede modificarse el pH de la superficie de la piel.

Para la extracción catódica, el flujo electroosmótico aumenta al disminuir la fuerza iónica de la composición química del comportamiento electroquímico. Este fenómeno es menos importante para la extracción anódica. Sin embargo, hay que tener en cuenta que debe existir una cierta concentración de electrolito que contenga el anión cloruro, en ambos compartimientos (particularmente en el ánodo) para el mantenimiento de la electroquímica del sistema Ag/AgCl.

Para iones pequeños móviles la electromigración es claramente el mecanismo principal; sin embargo, para sustancias neutras polares domina la electroosmósis ya que no hay electromigración posible. Ambos mecanismos de transporte dependen de la corriente aplicada, siendo este efecto menos marcado en la electroosmósis. Cuando el tamaño del ión aumenta, su movilidad se reduce y se dificulta la electromigración. Para cationes esto significa que al aumentar el tamaño molecular el mecanismo dominante cambia de electromigración a electroosmósis; por el contrario, para aniones las dos contribuciones podrían llegar a cancelarse y no se observaría ningún transporte. Así, un ácido débil que se encuentre sólo

parcialmente ionizado al pH fisiológico, puede extraerse más fácilmente en su forma neutra hacia el cátodo.

INNOVACIONES EN LA IONTOFORESIS REVERSA PARA EL ANÁLISIS CLÍNICO

Para aumentar el número de aplicaciones de la iontoforesis reversa en análisis clínico y mejorar la tecnología existente, pueden seguirse cuatro estrategias principales. La primera y de relación más directa con la Química Analítica, consiste en el desarrollo de métodos analíticos más sensibles para la determinación de las especies de interés. Con ello se podrían determinar cantidades extraídas inferiores, ampliándose así el número de especies y fármacos que pueden ser monitorizados, así como disminuirse el tiempo de muestreo.

La segunda estrategia consiste en la optimización de las condiciones iontoforéticas: intensidad, densidad y perfil de la corriente, así como la composición de la fase receptora más apropiada para la extracción de cada especie. Está bien comprobado que el transporte iontoforético es directamente proporcional a la intensidad de corriente y a su tiempo de aplicación. Sin embargo, en la práctica existen limitaciones en el aumento de estos parámetros. Respecto a la densidad de corriente, hay unanimidad

en que $0,5 \text{ mA cm}^{-2}$ es el máximo valor tolerable por el ser humano. Podría pensarse en aumentar la corriente total mediante el aumento de superficie de extracción. Sin embargo, manteniendo la densidad de corriente fija, la sensación experimentada por el paciente aumenta con el área tratada, debido probablemente al mayor número de nociceptores dérmicos activados. Existen al menos otras dos dificultades asociadas con el aumento de la corriente total y el aumento del área expuesta: más corriente significa que los electrodos utilizados (Ag/AgCl) deben recubrirse con una capa mayor de AgCl para asegurar un funcionamiento electroquímico correcto durante todo el periodo de muestreo y que, una mayor área implica el uso de un volumen mayor de disolución para recoger la especie de interés, disminuyendo por tanto la concentración del analito.

Se ha sugerido que la utilización de impulsos de corriente en los que se va alternando la aplicación de corriente con periodos de reposo, puede disminuir el enrojecimiento de la piel que se puede producir durante la iontoforesis. Sin embargo, no se han demostrado dichos beneficios teniendo en cuenta que, como la extracción es ineficiente durante el periodo de reposo, se tiene que aumentar el tiempo total de muestreo. Tampoco se ha demostrado que el uso de corrientes alternas produzca beneficios, si bien el cambio en la polaridad del electrodo al finalizar cada periodo de muestreo, tiene la gran ventaja de que se produce la regeneración de los electrodos Ag/AgCl.

La tercera estrategia consiste en encontrar un método que evite la necesidad de calibrar el proceso de iontoforesis reversa con una extracción de sangre. En efecto, la cantidad del analito extraído se diluye en el fluido aceptor. Su concentración depende de la eficacia del proceso de extracción y del volumen de aceptor. Se precisa por tanto una calibración que relacione la cantidad de analito extraído con su concentración en sangre. Para evitar la extracción de sangre se propuso el empleo de un “estándar interno”. El fundamento del mismo se basa en que durante la iontoforesis reversa se extraen varios compuestos al mismo tiempo, por lo que puede determinarse además del analito de interés (A), alguna otra sustancia cuya concentración en sangre sea constante (EI). Debe existir una proporcionalidad entre la relación de flujos de extracción de A y de EI (J_A/J_{EI}) y la relación de las concentraciones subdérmicas o sanguíneas (C_A/C_{EI}):

$$\frac{J_A}{J_{EI}} = K \frac{C_A}{C_{EI}} \quad (9)$$

Si C_{EI} es fija y conocida, puede calcularse la concentración sanguínea del analito:

$$C_A = \frac{C_{EI}}{K} \frac{J_A}{J_{EI}} \quad (10)$$

Si la constante de proporcionalidad es determinable y es constante en una población de pacientes, la determinación de J_A/J_{EI} junto con el término constante C_{EI}/K permite conocer C_A , sin necesidad de tener que hacer un muestreo de sangre en el paciente.

El éxito de esta idea depende de que el transporte iontoforético del analito y el del estándar interno, sean independientes entre sí. Es decir, que un cambio en el número de transporte del analito, debido por ejemplo a una bajada en su concentración sistémica, no se compense con un aumento en el número de transporte del estándar interno. En este caso fallaría la ecuación (9). El primer éxito de esta idea se obtuvo con la extracción iontoforética reversa del anión valproato usando ácido glutámico como estándar interno. Aunque la concentración de glutamato *in vivo* no es lo suficientemente constante para que este aminoácido se pueda considerar como un estándar interno ideal, sí sirvió para comprobar la validez de esta idea.

Posteriormente se ha conseguido un éxito similar con el par Li^+/Na^+ (analito/estándar interno). El ion sodio es un estándar interno útil y práctico debido al hecho de que su concentración *in vivo* no varía fuera del intervalo 125-145 mM (e incluso un intervalo menor); el Na^+ , por otra parte es también el mayor transportador de carga en la iontoforesis en dirección al cátodo (así como el Cl^- hacia el ánodo). Medidas *in vivo* en pacientes, confirmaron la constancia de la constante de proporcionalidad K de la ecuación (9).

Experiencias realizadas *in vitro* indicaron que el Na^+ podría usarse también como estándar interno para la glucosa. Sin embargo, estudios posteriores realizados *in vivo* pusieron de manifiesto que el flujo electroosmótico, que es el mecanismo de transporte para la glucosa, es un proceso muy sensible y puede variar hasta en un factor de diez, mientras que el flujo electromigratorio del Na^+ permanece inalterado. En experiencias más recientes *in vitro* se han ensayado otros estándares internos para la determinación iontoforética reversa de la glucosa: urea, glicerol, manitol y sacarosa. Se han encontrado relaciones de flujo constantes con los cuatro estándares internos ensayados, debido a que para estas especies el mecanismo de electrotransporte es idéntico al de la glucosa.

Las ventajas del estándar interno deben sopesarse frente a la necesidad de validar el uso del estándar interno bajo condiciones fisiológicas y frente a la química analítica necesaria para su cuantificación.

Una cuarta estrategia para la innovación en iontoforesis reversa se dirige hacia el empleo de geles termorreversibles como vehículos recolectores. En iontoforesis reversa se suelen emplear disoluciones acuosas en los comportamientos electródicos, en las cuales se extrae el analito de interés. Mientras esta modalidad facilita la determinación analítica con poca o ninguna preparación de la muestra, en la práctica tales vehículos recolectores no son muy fáciles de adaptar sobre la superficie de la piel. De

hecho, en el proceso de iontoforesis directa para la introducción de fármacos se ha comprobado el efecto favorable del empleo de geles o formulaciones poliméricas en los compartimentos electródicos y, actualmente, se ha generalizado su utilización. En iontoforesis reversa un receptor adecuado para aplicaciones *in vivo*, tiene que poseer una consistencia física suficiente para permitir una fácil adaptación a la piel y retirada del mismo, unas propiedades conductoras apropiadas y facilidad en la etapa del análisis de la especie de interés. Se ha investigado la posibilidad de usar estos geles termorreversibles en la iontoforesis reversa. En experimentos realizados *in vitro* para la extracción simultánea de Li^+ (analito de interés) y Na^+ (estándar interno) se ha empleado el Pluronic F127, un polímero de polioxietileno y polioxipropileno (70/30 p/p, peso molecular 11.500) que forma un gel a la temperatura ambiente que permite la fácil aplicación tópica, así como su retirada. Posteriormente el enfriamiento del gel a 4°C , hace que se vuelva fluido permitiendo la recuperación posterior del analito y del estándar interno para sus correspondientes determinaciones.

ESTUDIO DE CASOS

La iontoforesis reversa se aplicó por vez primera en 1954 por Benjamín *et al*, para la extracción de los iones sodio y potasio. Las experiencias se realizaron *in vivo* en el hombre, con el empleo de una placa

metálica como electrodo. Aplicaron una densidad de corriente de 0,5 mA cm⁻² sobre una superficie de piel de 8,3 cm², durante 5-10 minutos. En un total de casi cien sujetos encontraron que ni la edad, género, ubicación, tiempo de medida y temperatura ambiente afectaban significativamente a las cantidades de los iones extraídos. Sin embargo, en las experiencias realizadas con tiempos de duración largos se producían daños en la piel, debido al hecho de que en la disolución del compartimiento catódico aumentaba el pH desde 6-7 hasta cerca de 11. Esto se debe a que se produce la electrólisis del agua y por tanto es conveniente utilizar en los estudios iontoforéticos, electrodos electroquímicamente reversibles (por ejemplo Ag/AgCl).

Sin embargo, el potencial práctico de la iontoforesis reversa se apreció muy posteriormente, en 1989, cuando se demostró que la cantidad de sustancia extraída de esta forma a través de la piel, estaba relacionada linealmente con la concentración subdérmica del analito y por extrapolación con su concentración sistémica. Esta relación se encontró al efectuar experiencias *in vitro* utilizando piel sin pelo de ratón, con clonidina, teofilina y glucosa, es decir con un catión, un anión y una molécula neutra polar.

Seguidamente, el máximo interés de la iontoforesis reversa se dirigió hacia la determinación de glucosa. Obviamente, la posibilidad de disponer de un método no invasivo para controlar la glucosa en sangre de diabéticos,

aportaría un beneficio médico inmenso. El método convencional del pinchazo en el dedo, aunque es efectivo y preciso, raramente se utiliza con la frecuencia suficiente para evitar episodios hipo e hiperglucémicos, a pesar de la influencia de que dicho control tiene un impacto muy significativo sobre el progreso crónico de la enfermedad. Experimentos *in vitro* de iontoforesis reversa y estudios iniciales *in vivo* en personas no diabéticas establecieron las bases para el desarrollo comercial de un dispositivo, el Gluowatch Biographer (2000) el cual extrae glucosa iontoforéticamente a través de la piel y la determina *in situ*. El mecanismo de transporte de la glucosa es por electroósmosis. Durante cada periodo de muestreo (inicialmente de 20 minutos y un tiempo muy inferior en la nueva versión Gluowatch G2) la cantidad de glucosa disponible para su análisis es muy pequeña, encontrándose en el intervalo de 50 a 200 picomoles, lo que equivale a concentraciones del orden de 100 a 10.000 veces inferiores a las presentes en sangre. Por esta razón, se le exigió a la Química Analítica un nuevo reto: la aportación de un método analítico muy sensible para glucosa que permitiera además su determinación *in situ*. Este reto se resolvió mediante una versión muy optimizada del biosensor enzimático amperométrico de glucosa.

Como es conocido, las distintas modalidades del biosensor amperométrico de glucosa contienen inmovilizado el enzima glucosa oxidasa. La reacción de oxidación de la glucosa por el oxígeno, catalizada por el enzima, produce ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, el cual se detecta amperométricamente. En la versión optimizada del nuevo

GlucoWatch, el biosensor de glucosa alcanza un límite de detección muy bajo gracias a la utilización de un electrodo de trabajo de gran área superficial, compuesto de platino y grafito construido mediante técnicas de impresión, y a su operación bajo la modalidad coulombimétrica. Además, gracias a estas modificaciones el biosensor puede operar a un potencial mucho más bajo del habitual, lo que permite aumentar su selectividad y evitar así la interferencia de tirosina y triptófano.

Se han publicado gran cantidad de datos experimentales para demostrar la eficacia de la técnica de iontoforesis reversa, para controlar los cambios en los niveles de glucosa en sangre de diabéticos en todo el intervalo de glucemia. La cantidad y calidad de las informaciones obtenidas permitieron que el “GlucoWatch” fuese autorizado para su empleo en adultos por el U.S. Food and Drug Administration, en el año 2001. Trabajos posteriores permitieron la aprobación en el año 2002 para su utilización en niños y jóvenes (7-17 años).

La utilidad del GlucoWatch deberá corroborarse a largo plazo, pero no puede ponerse en duda que este primer paso para el control no invasivo de glucosa en sangre ha supuesto un salto paradigmático en este campo. Por ahora, las limitaciones que presenta son sólo aparentes: un tiempo corto de precalentamiento antes de tomar las medidas, para eliminar la reserva de glucosa en la piel, y la necesidad de un pinchazo en el dedo para calibrar el dispositivo. Si bien esta última limitación se ha percibido como una

desventaja, el GlucoWatch proporciona mucha más información al diabético que uno o dos ensayos diarios convencionales con pinchazo. Además, como se comentó anteriormente, esta limitación está en vía de solución con el uso de un estándar interno.

Otras aplicaciones de la iontoforesis reversa pueden dividirse en diagnóstico/control y control terapéutico de fármacos. Un aplicación innovadora de la iontoforesis reversa fue su utilización como herramienta diagnóstica para inflamaciones cutáneas. Se determinó la prostaglandina E₂ (PGE₂) en el compartimiento anódico, como respuesta al suministro iontoforético de fármacos irritantes: clorpromacina, cloroquinona, promacina, tetracaína y metoclopramida y se encontró que los niveles de prostaglandina se encontraban en buena correlación con los procedentes de otras formas de determinación de la irritación más clásicas (por ejemplo el test de Draize).

Otro caso estudiado ha sido la extracción iontoforética reversa de fenilalanina. Como es conocido, en la enfermedad metabólica grave de la fenilcetonuria no existe el enzima que biotransforma la fenilalanina. La detección precoz de la enfermedad y el control posterior de la dieta son esenciales. Los niños que padecen la enfermedad se controlan frecuentemente mediante extracciones de sangre y por ello, la aplicación de una técnica no invasiva sería de gran interés. Al pH fisiológico la fenilalanina es zwitteriónica por lo que se extrae durante la iontoforesis reversa por el mecanismo electroosmótico. Como sucede también con la

glucosa, se ha demostrado que las cantidades encontradas de fenilalanina en el compartimiento catódico son proporcionales a sus concentraciones subdérmicas. Sin embargo, aun en casos de fenilcetonuria, las concentraciones sistémicas de fenilalanina son muchos menores que los niveles típicos de glucosa en diabéticos. De aquí que se le planteen nuevos retos al investigador en Química Analítica para que aporte métodos significativamente sensibles para el análisis de dicha especie. Sin embargo, debe considerarse que en pacientes con fenilcetonuria no es necesario un control continuo tan frecuente como en el caso de la glucosa en diabéticos; bastará un dispositivo que recolecte la muestra una vez al día o a la semana para su envío al laboratorio analítico.

Otro problema clínico interesante es la monitorización de urea. Recientemente se ha aplicado con éxito la extracción iontoforética de urea en pacientes de 21 a 35 años que presentaban disfunción renal. La urea se extrajo en el cátodo por electroósmosis con aplicación de una corriente eléctrica durante cinco minutos. Las cantidades de urea extraídas mostraron una buena correlación con los niveles de urea en sangre. Una aplicación lógica e interesante de esta investigación sería conocer cuándo deberá efectuarse diálisis en pacientes con enfermedad renal, sobre todo pediátricos. Se realizó una prueba práctica de esta investigación con seis pacientes juveniles (9-16 años) que demostró claramente que las cantidades de urea extraídas antes y después de la diálisis eran muy diferentes. Los métodos analíticos utilizados para la determinación de la urea se basan en la

hidrólisis de la urea, catalizada por el enzima ureasa, con detección espectrofotométrica del amoniaco producido, ó potenciométrica basada en el aumento del pH relacionado con la concentración de urea.

Una consideración importante para valorar las posibilidades reales de la iontoforesis reversa en el seguimiento terapéutico de fármacos, es el grado en el que el componente de interés se encuentra enlazado a proteínas. Solamente la especie libre del fármaco es electrotransportada a través de la piel, ya que las proteínas son moléculas demasiado grandes para poder ser extraídas. Este hecho ha sido comprobado con dos agentes anticonvulsivos, el ácido valproico y la fenitoína, el 90% de los cuales se encuentran enlazados a las proteínas del plasma. La extracción iontoforética de ambas especies se estudió en un amplio intervalo de concentración que incluía los niveles libres observados en pacientes sujetos a tratamiento. El valproato se extrae en el ánodo mientras la fenitoína (pK_a 8,3) se recoge en ambos: en el ánodo la fracción ionizada de la especie extraída por electromigración y en el cátodo la forma neutra, por electroósmosis. En experimentos realizados *in vitro* se demostró que cuando se redujo el nivel de proteínas en el comportamiento subdérmico, aumentaba la cantidad de especie extraída de acuerdo con el aumento de especie libre. Igualmente cuando se monitorizó fenitoína a un nivel subdérmico fijo de proteínas, la introducción de valproato produjo una mayor extracción de fenitoína, debido al aumento de la cantidad libre de la misma por el efecto competitivo entre ambos fármacos en su enlace con las proteínas. La sensibilidad del método para responder de esta forma a los cambios en la concentración de fármaco libre,

ofrece una utilidad potencial para monitorizar sustancias con un intervalo terapéutico estrecho.

Se debe resaltar que en el caso de especies lipofílicas, tales como las mencionadas, el ácido valproico y la fenitoína, sus concentraciones sistémicas libres son muy bajas (50-105 μM y 4-8 μM , respectivamente) y en consecuencia las cantidades extraídas por iontoforesis reversa son extremadamente bajas. De aquí que las experiencias que se acaban de describir *in vitro* se llevaran a cabo con especies radioactivas. Una vez más se le presenta otro gran reto a la Química Analítica para la posible determinación de éstas y otras especies lipofílicas *in vivo*.

Otro interesante caso estudiado es el del ión litio, un fármaco muy usado en Psiquiatría en el tratamiento de trastornos bipolares. En este caso el problema de su determinación analítica es menos difícil. En primer lugar debido a que el Li^+ es un catión pequeño y no está enlazado a proteínas, por lo que se extrae por iontoforesis reversa mucho más eficazmente que otros tipos de fármacos. En segundo lugar, debido a que las concentraciones efectivas de Li^+ en el plasma son relativamente altas y en consecuencia las cantidades extraídas pueden determinarse por alguno de los métodos analíticos existentes, como cromatografía iónica, si bien deberían desarrollarse métodos que permitan la determinación *in situ*.

Las primeras experiencias *in vitro* demostraron que se produce una extracción rápida y lineal de Li^+ . Cuando se varió la concentración de Li^+ en el comportamiento subdérmico simulando un perfil farmacocinético, el perfil de extracción obtenido tuvo una buena correlación con el anterior, siguiendo las fases de absorción y eliminación del fármaco. Estudios posteriores efectuados *in vivo* en pacientes tratados con litio, demostraron el potencial de la iontoforesis reversa como herramienta clínica de gran utilidad. Los flujos de extracción iontoforética de Li^+ estaban en buena correlación con las concentraciones de litio en el plasma.

PERSPECTIVAS REALES DE LA IONTOFORESIS REVERSA

Las metodologías de muestreo no invasivas son obviamente beneficiosas para todos los pacientes, al menos por las siguientes razones: se obtiene mayor información ya que el muestreo puede llevarse a cabo más frecuentemente, se disminuye el dolor y el malestar, se disminuye el riesgo de infección y se puede realizar el seguimiento en el propio domicilio. Más aun, hay poblaciones especiales de pacientes para las que un diagnóstico no invasivo y una monitorización tienen un interés especial: pacientes sometidos repetidamente a extracciones sanguíneas, pacientes incapaces de reconocer, comunicar o tolerar problemas relacionados con efectos colaterales inesperados producidos por los fármacos y, aquellos que por cualquier otra razón se encuentran infra o sobredosificados. Entre tales

poblaciones se encuentran enfermos críticos bajo cuidados intensivos, enfermos de cáncer y sida, mujeres embarazadas, pacientes sometidos a tratamiento simultáneo con varios fármacos, tales como personas mayores, y especialmente pacientes pediátricos.

Aun cuando la iontoforesis reversa es mucho más eficiente y reproducible que la extracción por difusión pasiva, las cantidades de analito extraídas en la superficie de la piel son necesariamente pequeñas y al ser recogidas en el compartimiento electródico se producen diluciones del analito muy elevadas. En consecuencia, las demandas que se le piden a la Química Analítica, en especial la sensibilidad del método, son muy exigentes ya que si los periodos de muestreo son muy largos, se pueden producir cambios en la concentración sistémica del analito de interés. Estos cambios no son aceptables, por ejemplo, en el control de la glucosa. Sin embargo, el problema puede ser menos importante en el control de fármacos en la zona de estado estacionario, ya que entonces no es necesario un control continuo. En estos casos resulta razonable un tiempo de muestreo prolongado que proporcione, durante dicho periodo, una concentración media de analito que sea adecuada para su determinación analítica. Entonces puede efectuarse la iontoforesis reversa durante unas pocas horas en el domicilio y enviar la muestra al laboratorio de análisis.

Una limitación importante se produce cuando en la piel se acumula el analito de interés, como ocurre con la glucosa y el Li^+ . En estos casos, la

muestra inicial extraída proporciona principalmente información acerca de la acumulación local. Es necesario entonces esperar durante un periodo de precalentamiento antes de que la lectura sea indicativa de los niveles sistémicos.

También es cierto que el flujo en iontoforesis reversa no alcanza inmediatamente un estado estacionario. El tiempo necesario para alcanzarlo depende de la molécula de interés y del mecanismo dominante de electrotransporte. Sin embargo, no está bien demostrado si esta limitación es significativa. Para ciertos analitos, se ha obtenido incluso una correlación aceptable entre el flujo de extracción anterior al estado estacionario y su concentración subdérmica.

Una limitación adicional y significativa es que la iontoforesis reversa no es factible con moléculas que poseen determinadas propiedades físico-químicas. Por ejemplo, las proteínas son moléculas demasiado grandes para poder ser extraídas en cantidades que puedan ser cuantificables. Asimismo, compuestos muy lipofílicos con solubilidades extremadamente bajas en agua tampoco pueden determinarse; desafortunadamente el colesterol se encuentra dentro de esta categoría.

CONCLUSIÓN

En esta exposición se ha pretendido resaltar la amplia conexión entre la Química Analítica y la Iontoforesis Reversa, así como los nuevos retos que se le presentan a la Química Analítica y que se pueden concretar en: la optimización del proceso de toma de muestra, mediante una selección adecuada de la fase receptora y de las condiciones de corriente, y el desarrollo de nuevos métodos analíticos de gran sensibilidad y selectividad para la determinación, preferiblemente *in situ*, de ciertas especies endógenas y de fármacos.

Algunos de estos retos se afrontan en el proyecto de investigación multidisciplinar anteriormente mencionado. Las investigaciones se han iniciado con: estudios electroquímicos básicos sobre los procesos de transferencia a membranas de iones con actividad farmacológica; el diseño de una célula para iontoforesis reversa; y el desarrollo de sensores potenciométricos, amperométricos y coulombimétricos selectivos para las especies mencionadas, dirigidos a su aplicación en análisis clínico con iontoforesis reversa.

BIBLIOGRAFIA

Leduc, S., **Introduction of medicinal substances into the depth of tissues by electric current**, *Ann. Electrobiol.* 3, 545–560 (1900).

Benjamin F.B., Kempen, R., Mulder, A.G. y Ivy A.C., **Sodium-potassium ratio of human skin as obtained by reverse iontophoresis**, *J. Appl. Physiol.* 6, 401–407 (1954).

Sage, B.H. y Riviere, J.E., **Model systems in iontophoresis—transport efficacy**, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 9, 265–287 (1992).

Phipps, J.B. y Gyory J.R., **Transdermal ion migration**, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 9, 137–176 (1992).

Pikal, M.J., **The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis**, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 9, 201–237 (1992).

Ledger, P.W., **Skin biological issues in electrically enhanced transdermal delivery**, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 9, 289–307 (1992).

Merino, V., Kalia, Y.N. y Guy, R.H., **Transdermal therapy and diagnosis by iontophoresis**, *Trends Biotechnol.* 15, 288–290 (1997).

Delgado-Charro, M.B. y Guy, R.H. **Transdermal iontophoresis for controlled drug delivery and non-invasive monitoring**, *STP Pharm. Sci.* *11*, 403–414 (2001).

Leboulanger, B., Guy, R.H. y Delgado-Charro, M.B., **Reverse iontophoresis for non-invasive transdermal monitoring**, *Physiol. Meas.* *25*, 35-50 (2004).

Mudry, B., Guy, R.H. y Delgado-Charro, M.B., **Prediction of iontophoretic transport across the skin**, *J. Control. Release* *111*, 362-367 (2006).

Numajiri, S., Sugibayashi, K. y Morimoto, Y., **Non-invasive sampling of lactic acid ions by iontophoresis using chloride ion in the body as an internal standard**, *J. Pharm. Biomed. Anal.* *11*, 903–909 (1993).

Delgado-Charro, M.B. y Guy R.H. **Transdermal reverse iontophoresis of valproate: a non-invasive method for therapeutic drug monitoring**, *Pharm. Res.* *20*, 1508–1513 (2003).

Rao, G., Guy, R.H., Glikfeld, P., LaCourse, W.R., Leung, L., Tamada, J., Potts, R.O. y Azimi, N., **Reverse iontophoresis: non invasive glucose monitoring in vivo in humans**, *Pharm. Res.* *12*, 1869–1873 (1995).

Tierney, M.J., Jayalakshmi, Y., Parris N.A., Reidy M.P., Uhegbu, C. y Vijayakumar, P., **Design of a biosensor for continual transdermal glucose monitoring**, *Clin. Chem.* 45, 1681–1683 (1999).

Tierney, M.J., Kim H.L., Burns, M.D., Tamada, J.A. y Potts, R.O., **Electroanalysis of glucose in transcutaneously extracted samples** *Electroanalysis*, 12, 666–671 (2000).

Tierney, M.J., Tamada, J.A., Potts, R.O., Eastman, R.C., Pitzer, K., Ackerman, N.R. y Fermi, S.J., **The GlucoWatch^R biographer: a frequent automatic and noninvasive glucose monitor**, *Ann. Med.* 32, 632–641 (2000).

Tierney, M.J., Tamada, J.A., Potts, R.O., Jovanovic, L., Garg, S., y Cygnus Research Team, **Clinical evaluation of the GlucoWatch^R biographer: a continual, non-invasive glucose monitor for patients with diabetes**, *Biosens. Bioelectron.* 16, 621–629 (2001).

Sieg, A., Guy, R.H. y Delgado-Charro M.B., **Electroosmosis in Transdermal Iontophoresis: Implications for Noninvasive and Calibration-Free Glucose Monitoring**, *Biophys. J.* 87, 3344-3350 (2004).

Tamada, J.A., Comyns, K., **Effect of formulation factors on electroosmotic glucose transport through human skin *in vivo***, *J. Pharm. Sci.* *94*, 1839-1849 (2005).

Mize, N.K., Buttery, M., Daddona, P., Morales, C. y Cormier, M. **Reverse iontophoresis: monitoring prostaglandin E2 associated with cutaneous inflammation *in vivo***, *Exp. Dermatol.* *6*, 298–302 (1997).

Merino, V., Lopez, A., Hochstrasser, D. y Guy, R.H., **Noninvasive sampling of phenylalanine by reverse iontophoresis**, *J. Control Release* *61*, 65–69 (1999).

Degim, I.T., Ilbasmis, S., Dundaroz, R. y Oguz, Y., **Reverse iontophoresis: a non-invasive technique for measuring blood urea level**, *Pediatr. Nephrol.* *18*, 1032-1037 (2003).

Leboulanger, B., Fathi, M., Guy, R.H. y Delgado-Charro, M.B., **Reverse iontophoresis as a noninvasive tool for lithium monitoring and pharmacokinetic profiling**, *Pharm. Res.* *21*, 1214–1222 (2004).

Leboulanger, B., Aubry, J-M., Bondolfi, G., Guy, R.H. y Delgado-Charro, M.B., **Lithium Monitoring by Reverse Iontophoresis in Vivo**, *Clin. Chem.* *50*, 2091-2100 (2004).

Wascotte, V., Leboulanger, B., Guy, R.H. y Delgado-Charro, M.B., **Reverse iontophoresis of lithium: electrode formulation using a thermoreversible polymer**, *Eur. J. Pharm. Sci.* 59, 237-240 (2005).

Valcárcel, M., **Principios de Química Analítica**, Springer-Verlag Ibérica, Barcelona (1999).

Kellner, R., Mermet, J.M., Otto, M., Valcárcel, M. y Widmer, H.M., **Analytical Chemistry**, Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2004).