

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO EN BIOMATERIALES COMPUESTOS

Juan P. Cattalini¹, Javier García¹, Viviana S. Mouriño^{1,2}, Silvia E. Lucangioli^{1,2}

¹Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (FFyB, UBA)

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Corresponsal: Silvia E. Lucangioli. Junín 956, 6^{to} piso, Buenos Aires CP 1113; correo electrónico: slucangi@ffyb.uba.ar

Introducción

El uso de iones metálicos como agentes terapéuticos (IMAT) ha adquirido una importancia relevante en el campo de la medicina regenerativa [1]. Debido a esto, muchos IMAT han sido incorporados en andamios con aplicaciones terapéuticas [1, 2]. Particularmente, muchos de los biomateriales utilizados en Ingeniería Tisular Ósea (ITO) contienen iones calcio (Ca^{2+}) [3], ya que estos iones estimulan la diferenciación de las células óseas, la proliferación de osteoblastos, el metabolismo óseo y su mineralización [1]. Además, distintos reportes indican que los productos iónicos de disolución de un vidrio bioactivo aplicado en ITO, *Bioglass*® 45S5, contienen iones Ca^{2+} entre otros, y promueven la formación de nuevo tejido óseo [4]. Debido a que los iones inorgánicos tienen baja respuesta al UV, o carecen de grupos cromóforos, deben emplearse técnicas sofisticadas para su cuantificación, como la cromatografía de iones [5] y la espectroscopía de absorción o emisión atómica [6]. Pero estas técnicas resultan altamente complejas y costosas. Como alternativa, los métodos por Electroforesis Capilar (EC) ofrecen alta eficiencia en la separación y resolución, versatilidad, bajo consumo de muestra y cortos tiempos de análisis [7]. El objetivo de este trabajo es desarrollar y validar un método simple, sensible y confiable, por UV-indirecto para cuantificar la liberación de Ca^{2+} desde biomateriales compuestos con aplicación en ITO.

Materiales y Métodos

Equipamiento: P/ACE™ MDQ, detector de arreglo de diodos, Karat V.8 software. Capilar de sílica: 40 cm de longitud (30 cm hasta el detector), diámetro interno: 75 μm .

Electrolito utilizado: imidazol (5 mM), ácido α -hidroxiisobutírico (HIBA) (6 mM), 18-CROWN-6 (1 mM) y metanol (20 % v/v), a pH 4.5. Inyección de muestras: 0.5 psi de presión, 5 segundos. La corrida se realizó a polaridad normal y a un voltaje de 6 kV. Longitud de onda del detector: 214 nm. Temperatura del cartucho: 25 °C.

Se prepararon films de alginato, entrecruzado con iones Ca^{2+} , con nanopartículas de vidrio bioactivo incorporadas, de un modo similar al descrito en un trabajo anterior [8]. Para el estudio de liberación de Ca^{2+} desde los films, se probaron diferentes sales de fosfato conteniendo iones como Na^+ , K^+ y NH_4^+ para preparar el buffer a diferentes concentraciones (de 5 a 20 mM). Se emplearon 5 films, y las muestras fueron tomadas a distintos intervalos durante 4 días.

Resultados y Discusión

El imidazol fue utilizado como agente de absorción al UV, a pH 4.5. Un agente complejante, HIBA, fue agregado para mejorar la separación entre los iones. 18-CROWN-6 fue introducido para permitir una mejor resolución entre NH_4^+ y picos cercanos. Metanol al 20 % v/v ofreció las mejores condiciones para obtener picos simétricos.

La optimización de la temperatura del capilar, el voltaje de corrida y la inyección de la muestra fue realizada para obtener las mejores condiciones para la resolución y tiempo de análisis. Las condiciones utilizadas fueron: 25 °C, 6 kV y 0.5 psi durante 5 segundos, respectivamente.

Luego de probar distintos buffers para el estudio de liberación de Ca^{2+} , la mejor resolución entre Ca^{2+} y los picos cercanos fue lograda usando buffer fosfato de amonio a pH 7.4. Una concentración de 10 mM permitió obtener las mejores condiciones de la corrida electroforética junto con una buena capacidad amortiguadora.

La validación del sistema de EC fue realizada según las normas ICH. La especificidad se evaluó comparando los tiempos de migración entre Na^+ y Ca^{2+} , ya que Na^+ puede estar presente en la muestra. El valor de factor de resolución (R_s) obtenido fue 1.5. El R_s entre NH_4^+ (proveniente del buffer) y Ca^{2+} fue mayor que 1.5. El rango de linealidad, LOD y LOQ se informan en la Tabla 1. Los valores de desviación estándar relativa (RSD) para la precisión, y los porcentajes de recuperación (%R) y RSD para la exactitud se muestran en la Tabla 1. La robustez del método fue evaluada realizando una variación de un $\pm 2\%$ en el tiempo de inyección, temperatura del cartucho, voltaje de corrida y pH del electrolito, y no se encontraron cambios significantes en los valores de RSD y tiempos de migración.

El perfil de liberación de Ca^{2+} desde los films arrojó una cinética de liberación de orden cero durante los primeros 4 días.

Tabla 1

Parámetro	Valor
Rango de linealidad ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1.0-50.0 $y = 5503.3x - 1887.9$
r^2	0.998
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.0293
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.0977
Precisión (RSD)	
Mismo día (n=4)	Tiempo de migración 0.25 Área del pico 1.30
Entre días (n=4)	Tiempo de migración 0.34 Área del pico 1.47
Exactitud ^a (n=3)	106.6 (1.48) 106.8 (0.23) 105.7 (1.62)

^a %R obtenidos de tres muestras marcadas a tres tiempos diferentes del estudio de liberación. Valores de RSD en paréntesis.

Conclusión

Se logró el desarrollo de un método por UV-indirecto para la cuantificación de la liberación de Ca^{2+} desde biomateriales para ITO con buena separación entre Ca^{2+} y picos cercanos, y bajos LOD y LOQ para dicho ion. Además, el método propuesto ofrece ventajas por sobre otros métodos para la cuantificación de Ca^{2+} , en cuanto a simplicidad, bajo costo y bajo consumo de muestra, lo cual lo convierte en una alternativa viable para la cuantificación de Ca^{2+} en biomateriales con aplicación en IT.

Referencias

- [1] Mouriño *et al.*, *J R Soc Interface*, **2012**, 9, 401-419.
- [2] Barralet *et al.*, *Tissue Eng Part A*, **2009**, 15, 1601-1609.
- [3] Dorozhkin, *J Funct Biomater*, **2010**, 1, 22-107.
- [4] Hoppe *et al.*, *Biomaterials*, **2011**, 32, 2757-2774.
- [5] Ohta *et al.*, *J Chromatogr A*, **1996**, 731, 179-186.
- [6] Sokolnikova *et al.*, *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc*, **2003**, 58, 387-391.
- [7] de l'Escaille & Falmagne, *Sep Sci Technol*, **2008**, 9, 317-355.
- [8] Mouriño *et al.*, *Soft Matter*, **2011**, 7, 6705-6712.