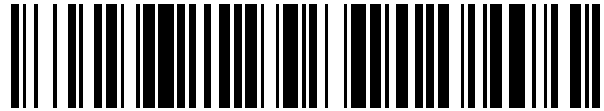


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 691**

51 Int. Cl.:

A61N 1/30

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2002 E 02747396 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **31.03.2004 EP 1401532**

54 Título: **Procedimiento para determinar de forma no invasiva los niveles relativos de dos sustancias biológicas**

30 Prioridad:

22.06.2001 EP 01114750

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.02.2013

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF BATH (100.0%)
Claverton Down, Bath BA2 7AY , GB**

72 Inventor/es:

**GUY, RICHARD, HENRY y
DELGADO-CHARRO, MARIA BEGONA**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 394 691 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para determinar de forma no invasiva los niveles relativos de dos sustancias biológicas.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere de manera general a un procedimiento para determinar de forma no invasiva los niveles relativos de dos sustancias presentes en un sistema biológico.

10 Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar los niveles relativos de dos sustancias presentes en un sistema biológico, utilizando la técnica de iontoforesis inversa.

Descripción de la técnica relacionada

15 La detección y/o cuantificación de sustancias endógenas es un factor clave para establecer un diagnóstico médico.

De manera similar, la detección y/o cuantificación de sustancias exógenas tales como fármacos, metabolitos y marcadores de efecto terapéutico o tóxico es un factor clave para determinar si un tratamiento médico es apropiado.

20 Sin embargo, la detección y/o cuantificación de sustancias endógenas o exógenas requiere de manera general una toma de muestras de sangre invasiva previa con una aguja, con las consecuencias de que el dolor puede acompañar al procedimiento de toma de muestras y puede haber un riesgo de infección bacteriana o vírica tanto para el paciente como para el encargado de tomar muestras.

25 Un ejemplo en el que se necesita la toma de muestras de una sustancia endógena, al menos varias veces al día durante toda la vida, es en el caso de pacientes que presentan diabetes sacarina.

30 Para estos pacientes, la información en tiempo real referente a los niveles de glucosa en el organismo es la información más importante en el tratamiento del paciente y en muchos casos, a menudo una cuestión de vida o muerte.

35 Se ha utilizado un procedimiento no invasivo conocido por el nombre de iontoforesis para conseguir una administración de fármaco aumentada a través de la piel durante muchos años, y más recientemente se ha demostrado que la simetría del procedimiento también permite que se extraigan muestras de moléculas no cargadas e iones biológicamente importantes, en circulación, disueltas en un fluido biológico del espacio subcutáneo hacia la superficie de la piel (una técnica denominada generalmente iontoforesis inversa).

40 La técnica de iontoforesis puede definirse como el transporte potenciado de moléculas cargadas o no cargadas a través de biomembranas, en particular piel, bajo la influencia de un gradiente de potencial eléctrico.

El nivel de corriente necesario para potenciar este transporte es indoloro.

45 Esta técnica evita la necesidad de perforar la piel y por tanto reduce, tremendamente, los riesgos tanto para el paciente como para el encargado de tomar muestras.

La iontoforesis utiliza un dispositivo iontoforético que consiste en una fuente de alimentación y dos compartimentos de electrodo.

50 Estos compartimentos contienen un electrodo y, normalmente, una disolución de electrolito o un hidrogel conductor.

En el caso de toma de muestras iontoforética, los compartimentos de electrodo contienen un medio de recepción apropiado, por ejemplo solución salina tamponada, en el que se recogen los analitos de interés.

55 Los compartimentos de electrodo también pueden contener los medios con los que cuantificar el/los analito(s) de interés *in situ*, o puede retirarse el contenido del compartimento de electrodo a ciertos momentos predeterminados para la determinación del/de los analito(s) en otro aparato.

60 La iontoforesis puede utilizarse con éxito para extraer, a niveles significativamente elevados, tanto moléculas cargadas como no cargadas de dentro y bajo la piel.

El transporte iontoforético a través de la piel implica dos mecanismos principales.

65 Uno, la denominada electromigración, se refiere sólo a moléculas cargadas y el otro, la denominada electroósmosis o flujo por convección, puede implicar el transporte tanto de moléculas tanto cargadas como no cargadas.

El transporte de electromigración es una consecuencia directa de la interacción del campo eléctrico con iones.

Cuando se aplica el campo eléctrico, los cationes contenidos en la cámara anódica se repelen desde el ánodo hacia y a través de la piel y los cationes endógenos o exógenos se atraen al interior de la cámara catódica.

5 Por consiguiente, se recogerá un catión endógeno o exógeno en la cámara catódica.

Por el mismo principio, los aniones se repelen desde la cámara catódica y se impulsan dentro y a través de la piel y los aniones endógenos o exógenos se atraen al interior de la cámara anódica sobre la superficie de la piel.

10 Por consiguiente, se recogerán aniones endógenos o exógenos en la cámara anódica.

El transporte electroosmótico se basa en el hecho de que, a pH neutro, la piel es una membrana cargada negativamente, y por tanto es permeoselectiva a cationes.

15 Se deduce que, con la aplicación de un campo eléctrico, se lleva más carga a través de la piel mediante iones positivos que mediante iones negativos.

20 Esto significa que se transfiere más momento al disolvente (es decir, agua) en el sentido del movimiento de cationes de tal manera que las moléculas no cargadas se desplazan por convección junto con el flujo de disolvente a una velocidad que es, para muchas sustancias, significativamente mayor que la posible mediante difusión pasiva.

Por consiguiente, una molécula no cargada endógena o exógena se recogerá en la cámara catódica.

25 El transporte electroosmótico puede ser particularmente eficaz para sustancias solubles en agua, polares (pero no cargadas), ya que estos compuestos presentan normalmente una permeabilidad muy escasa a través de la barrera de la piel lipófila (hidrófoba).

Además, el flujo electroosmótico ayuda por tanto a la toma de muestras de cationes mientras que disminuye, en

30 Cuando se activa el dispositivo iontoforético, se establece un circuito eléctrico.

35 La parte exterior del circuito implica electrones que se desplazan a lo largo del cable desde el ánodo hasta el cátodo a través de la fuente de alimentación y la parte interior del circuito implica el movimiento de iones desde una cámara de electrodo hasta la otra a través de la piel y del medio fisiológico.

El número de electrones que fluyen en la parte exterior del circuito determina el número de iones que se mueven en la parte interior.

40 Por tanto, el flujo de iones es directamente proporcional a la carga total en culombios que ha pasado entre los electrodos desde la fuente de alimentación.

45 Se conoce que la extracción de una sustancia hasta la superficie de la piel mediante iontoforesis inversa es proporcional al nivel subcutáneo de la sustancia.

La iontoforesis inversa en sí misma no es selectiva de modo que la discriminación viene a nivel de la muestra extraída.

50 Por tanto, puede extraerse una multitud de especies mediante iontoforesis y someterse a ensayo específicamente.

Basándose en estos principios, los documentos US-A-5.279.543, US-A-5.362.307 y US-A-5.730.714, dan a conocer procedimientos para determinar de forma no invasiva el nivel de una sustancia presente en un sistema biológico.

55 Estos procedimientos comprenden, de manera general, poner en contacto una cámara anódica y una cámara catódica de un dispositivo de iontoforesis con un sistema biológico; extraer mediante iontoforesis inversa sustancias cargadas y no cargadas del sistema biológico, y recoger dichas sustancias extraídas en la cámara anódica o catódica; analizar la cantidad recogida de una de las sustancias extraídas; y correlacionar el nivel de la sustancia analizada con un patrón.

60 Basándose en estos procedimientos, los documentos US-A-5.771.890, US-A-5.989.409 y US-A-6.023.629 dan a conocer procedimientos particulares para medir la concentración de una sustancia, en particular glucosa, en un sujeto mamífero.

65 Sin embargo, en estos procedimientos, el nivel de la sustancia analizada se correlaciona con el nivel de la sustancia en la sangre del paciente, de modo que se requiere una toma de muestras de sangre.

Se han dado a conocer varios dispositivos para determinar de forma no invasiva el nivel de una sustancia presente en un sistema biológico basándose en estos procedimientos, proporcionándose la mayoría de ellos para monitorizar glucosa de forma no invasiva, como por ejemplo el dispositivo comercializado por Cygnus, Inc. (Redwood City, California, EE.UU.), con el nombre de GlucoWatch® Biographer.

5 Sin embargo, estos dispositivos tienen que calibrarse cada vez que se encienden, y cada calibración requiere toma de muestras de sangre.

10 A la vista de lo anterior, hay una necesidad de un procedimiento y de un dispositivo que no requieran la comparación del nivel de la sustancia extraída iontoforéticamente con un patrón obtenido a partir de una muestra de sangre y por tanto que permitan la monitorización del nivel de una sustancia en un sistema biológico sin una calibración basada en una toma de muestras de sangre.

15 Se dio a conocer un estudio preliminar para determinar si pueden determinarse electrolitos tisulares mediante iontoforesis inversa por F.B. Benjamin, R. Kempen, A.G. Mulder y A.C. Ivy. en Journal of Applied Physiology, vol. 6, págs. 401-407, 1954 "Sodium-potassium ratio of human skin as obtained by reverse iontophoresis".

Se llevaron a cabo experimentos *in vivo* e *in vitro*.

20 *In vivo*, la situación de mayor interés, se utilizó un cátodo de placa de metal, insertado dentro de una disolución de electrolito de nitrato de litio (28,5 mEq/l) sobre la superficie de la piel.

El área de contacto entre la disolución de cátodo y la piel era de 4,5 cm².

25 Se hizo pasar una corriente de 4 mA durante 5 minutos (y a veces más tiempo) y durante este tiempo, el pH de la disolución de nitrato de litio aumentó desde 6,4 hasta 10,7, indicando hidrólisis de agua en el cátodo.

Se observó daño de la piel en algunos casos.

30 Tras el paso de la corriente, las concentraciones de iones potasio y sodio en la cámara de cátodo eran normalmente de aproximadamente 14 y 35 μEq/l, respectivamente.

El día de la medición, la temperatura ambiental, el sexo y la edad del sujeto y el sitio de medición en el cuerpo, no afectaron significativamente a los resultados obtenidos.

35 La razón del sodio con respecto al potasio en la disolución de extracción era por tanto de aproximadamente 2,5:1.

40 Se comparó esta razón con la composición relativa de los iones en sudor (7,1:1), piel completa (6:1), epidermis (0,6:1), fluido intersticial (29:1) y fluido intracelular (0,03:1) y claramente no concordaba con ninguno de estos entornos.

45 Sin embargo, se observó que la razón extraída disminuía en sujetos que recibían una dieta con bajo contenido en sodio (hasta 2,0:1) y que también podía disminuirse (otra vez hasta 2,0:1) mediante el bloqueo de la secreción de sudor con atropina.

No obstante, la razón no cambió en ninguno de los casos para reflejar la composición relativa de los iones en cualquier tejido de interés. Tampoco se proporcionó ningún procedimiento que permitiera relacionar la razón extraída de iones de forma sistemática, con respecto a su composición relativa en cualquier tejido de interés.

50 *In vitro*, la extracción se llevó a cabo con soluciones salinas hipertónicas, isotónicas e hipotónicas bajo la piel escindida obtenida a partir de un cadáver humano.

El tipo de disolución utilizada influyó en los resultados de extracción de la misma forma que cuando se inyectaron disoluciones similares por vía intradérmica en sujetos humanos normales, *in vivo*.

55 No obstante, de nuevo, los cambios en la razón no reflejaron cuantitativamente la composición relativa de los iones en ningún tejido de interés. Tampoco se proporcionó ningún procedimiento que permitiera relacionar la razón extraída de iones de forma sistemática con su composición relativa en cualquier tejido de interés.

60 En resumen, aunque esta investigación pretendía ser útil para monitorizar alteraciones en el equilibrio de electrolitos en pacientes y especulaba con que los resultados tal vez estuvieran correlacionados con los de concentraciones metabólicas y en sangre, los resultados demostraron de hecho: (a) ninguna concordancia entre la razón del sodio con respecto al potasio extraída, y ello en cualquier compartimento tisular de interés y (b) ninguna sugerencia de que pueda utilizarse o bien un ión, o bien de hecho cualquier otro electrolito o sustancia endógena, como un patrón interno para una biodetección no invasiva, libre de calibración, mediante iontoforesis inversa.

65

Más recientemente, se ha realizado un intento para determinar la concentración de ácido láctico en el lado dérmico de una célula iontoforética empleando la razón de flujos de ácido láctico e iones cloruro (siendo el ión cloruro un ión endógeno de nivel constante), como se publicó por S. Numajiri, K Sugibayashi y Y. Morimoto en Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis Vol. 11, n.º 10; págs. 903-909, (1993) ("Non-invasive sampling of lactic acid ions by iontophoresis using chloride ion in the body as an internal standard").

En este documento, los resultados muestran que el flujo de ión cloruro disminuye con un aumento en concentración láctica y que la razón de flujos de ácido láctico/iones cloruro es constante y es independiente del gradiente de potencial eléctrico lo que significa por tanto que el número de transporte de ácido láctico depende del número de transporte de cloruro.

Puesto que la razón de flujos de ácido láctico/iones cloruro es constante, la razón de flujos de ácido láctico/iones cloruro no proporciona una medida directa de los niveles relativos de estas dos sustancias en el lado de la dermis de la célula y además no proporciona una medida directa del nivel fisiológico de ácido láctico en el lado de la dermis de la célula.

Además, en este documento, dos características del procedimiento experimental utilizado hacen que la viabilidad del procedimiento sea, en el mejor de los casos, cuestionable.

En primer lugar, el nivel de corriente utilizado para extraer los iones de interés a través de la piel era o bien de 2,1 mA/cm² o bien de 3,2 mA/cm², es decir, más de 4 ó 6 veces, respectivamente, la densidad de corriente considerada el límite tolerable máximo (0,5 mA/cm²) para iontoforesis *in vivo*, en seres humanos.

En segundo lugar, se utilizaron electrodos de platino en los experimentos notificados.

Está bien establecido en la bibliografía que la electroquímica en electrodos de platino provoca la hidrólisis de agua, liberando o bien cationes hidronio o bien aniones hidróxido en las disoluciones de electrodo con un riesgo considerable, por tanto, de cambios drásticos en el pH.

Junto con las altas densidades de corriente utilizadas, también es evidente una probabilidad significativa de irritación y/o quemaduras de piel a partir del procedimiento tal como se describe.

Además, los cationes hidronio y los aniones hidróxido son pequeños y muy móviles, y son portadores de carga eficaces en iontoforesis; su presencia creciente en las disoluciones de electrodo competirá eficazmente con los iones de interés para portar carga a través de la piel, y por tanto cambiará adicionalmente los números de transporte de iones cloruro y ácido láctico, haciendo inservible el valor del procedimiento propuesto.

Un objetivo de la presente invención es proponer un procedimiento para determinar los niveles relativos de dos sustancias presentes en un sistema biológico evitando la toma de muestras de sangre cuando sólo es de interés la concentración relativa de dos moléculas.

Un objetivo adicional de la presente invención es proponer un procedimiento en el que los niveles relativos de una primera sustancia extraída presente en un sistema biológico con respecto a una segunda sustancia extraída presente en el sistema biológico es una medida directa del nivel fisiológico de la primera sustancia, evitando por tanto una calibración basada en una toma de muestras de sangre.

Según la presente invención, estos objetivos se han logrado como resultado de los hallazgos inesperados de que cuando dos sustancias extraídas de un sistema biológico mediante iontoforesis inversa presentan números de transporte y/o transferencia respectivos independientes, la razón de las cantidades extraídas respectivas o la razón de sus flujos es una medida directa de los niveles relativos de las dos sustancias en el sistema biológico.

Sumario de la invención

La presente invención es un procedimiento para determinar de forma no invasiva los niveles relativos de dos sustancias presentes en un sistema biológico, comprendiendo dicho procedimiento:

- poner en contacto una cámara anódica y una cámara catódica de un dispositivo iontoforético que comprende electrodos reversibles con un sistema biológico;
- extraer mediante iontoforesis inversa sustancias cargadas y no cargadas de dicho sistema biológico, y recoger dichas sustancias cargadas y no cargadas cada una independientemente en la cámara anódica o la cámara catódica;
- analizar la cantidad recogida de una primera sustancia extraída y una segunda sustancia extraída; en el que dichas sustancias primera y segunda se seleccionan de tal manera que el número de transporte y/o transferencia de la primera sustancia es independiente del número de transporte y/o transferencia de la

segunda sustancia;

- posteriormente, determinar la razón de extracción de la primera sustancia con respecto a la segunda sustancia para determinar sus niveles relativos en el sistema biológico.

5 Según el procedimiento de la presente invención, cuando la primera sustancia y la segunda sustancia son ambas analitos susceptibles de cambios de su concentración en el sistema biológico, la razón de extracción determinada proporciona información sobre las concentraciones relativas de las dos sustancias en el sistema biológico.

10 En este caso, la razón puede utilizarse ventajosamente para establecer un diagnóstico de cualquier estado fisiológico o patológico, en el que la razón de dos analitos endógenos o exógenos es de relevancia, sin requerir una toma de muestras de sangre.

15 Además, según el procedimiento de la presente invención, cuando la primera sustancia es un analito susceptible de cambios en su concentración en el sistema biológico y la segunda sustancia presenta una concentración sustancialmente constante en el sistema biológico, la segunda sustancia actúa como patrón interno y la razón de extracción se convierte en una medición directa del nivel fisiológico de la primera sustancia en el sistema biológico.

20 En este caso, la razón de extracción puede utilizarse ventajosamente para establecer un diagnóstico de cualquier estado fisiológico o patológico, en el que el nivel fisiológico del analito endógeno o exógeno es de relevancia, sin requerir una toma de muestras de sangre.

Otras ventajas de la presente invención aparecerán en la siguiente descripción detallada.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra una vista esquemática de un dispositivo iontoforético conocido para su utilización para la toma de muestras *in vivo* de sustancias cargadas o no cargadas.

30 La figura 2 muestra una vista esquemática de un dispositivo iontoforético conocido para el modelado *in vitro* de toma de muestras iontoforética de sustancias cargadas o no cargadas.

35 La figura 3 representa una célula de iontoforesis diseñada específicamente utilizada para los experimentos *in vitro* presentados en el ejemplo 1.

Las figuras 4a a 4b representan los flujos de extracción de valproato y glutamato a las 5 horas y a las 24 horas tal como se obtienen en los experimentos *in vitro* notificados en el ejemplo 1.

40 Las figuras 5a a 5b representan los números de transporte de valproato y glutamato a las 5 horas y a las 24 horas tal como se obtienen en los experimentos *in vitro* notificados en el ejemplo 1.

45 La figura 6a muestra la correlación lineal obtenida entre la razón de extracción (valproato/glutamato) y la concentración de valproato en la disolución subdérmica tal como se obtiene en los experimentos *in vitro* notificados en el ejemplo 1.

La figura 6b muestra la correlación lineal obtenida entre la razón de extracción (valproato/glutamato) y su razón molar (valproato/glutamato) en la disolución subdérmica tal como se obtiene en los experimentos *in vitro* notificados en el ejemplo 1.

50 La figura 7 representa una célula de iontoforesis diseñada específicamente utilizada para los experimentos *in vitro* notificados en el ejemplo 2.

Las figuras 8a a 8b representan los flujos de extracción de lactato, amonio, potasio, sodio y cloruro a la 3ª hora y 5ª hora de los experimentos notificados en el ejemplo 2.

55 Las figuras 9a a 9b representan los números de transporte de los dos analitos de interés (lactato y amonio) y de los tres patrones internos considerados (K^+ , Na^+ Cl^-) tal como se obtienen a partir de los experimentos notificados en el ejemplo 2.

60 Las figuras 10a a 10b representan la razón de extracción de los pares de sustancias [a] (amonio/sodio), [b] (amonio/potasio), [c] (lactato/cloruro), [d] (lactato/sodio), [e] (lactato/potasio) y [f] (potasio/sodio) tal como se obtiene a partir de los experimentos notificados en el ejemplo 2.

65 La figura 11 representa una célula de iontoforesis diseñada específicamente utilizada para los experimentos *in vitro* notificados en el ejemplo 3.

La figura 12 representa los flujos de manitol y sodio a lo largo de las seis horas de los experimentos notificados en el ejemplo 3, primer experimento.

5 La figura 13 representa la correlación entre la razón de extracción iontoforética de manitol con respecto a sodio y su razón de concentraciones subdérmicas a lo largo de las seis horas de los experimentos notificados en el ejemplo 3, primer experimento.

10 Las figuras 14a a 14b representan los flujos de manitol y sodio y la razón de flujos de extracción (manitol/sodio) a lo largo de las 5 horas de los experimentos notificados en el ejemplo 3, segundo experimento.

Las figuras 15a a 15b muestran la correlación entre la razón de extracción iontoforética de manitol con respecto a sodio y [a] la concentración subdérmica de manitol, y [b] la razón de concentraciones subdérmicas (manitol/sodio) a lo largo del periodo de 5 horas de los experimentos notificados en el ejemplo 3, segundo experimento.

15 La figura 16 representa una célula de iontoforesis diseñada específicamente utilizada para los experimentos *in vitro* notificados en el ejemplo 4.

20 Las figuras 17a a 17b muestran los flujos de manitol y sodio y la razón de flujos de extracción (manitol/sodio) a lo largo de las 6 horas de los experimentos notificados en el ejemplo 4.

La figura 18 muestra la correlación entre la razón de extracción iontoforética de manitol con respecto a sodio y la concentración subdérmica de manitol a lo largo del periodo de 6 horas de los experimentos notificados en el ejemplo 4.

25 La figura 19 muestra los flujos de glucosa y sodio a través de las 6 horas del experimento notificado en el ejemplo 5.

La figura 20 muestra la razón de flujos de extracción (glucosa/sodio) a lo largo de las 6 horas del experimento notificado en el ejemplo 5.

30 Las figuras 21a a 21c muestra los flujos de glucosa, manitol y sodio durante los periodos de 6 horas de los experimentos A, B y C, respectivamente, notificados en el ejemplo 6.

35 La figura 22a muestra la correlación entre (a) la razón de extracción iontoforética de glucosa con respecto a sodio y la concentración subdérmica de glucosa, y (b) la razón de extracción iontoforética de manitol con respecto a sodio y la concentración subdérmica de manitol, tras 6 horas de iontoforesis a $0,5 \text{ mA/cm}^2$, tal como se notifica en el ejemplo 6.

40 La figura 22b muestra la correlación entre (a) la razón de extracción iontoforética de glucosa con respecto a sodio y la razón de concentraciones subdérmicas (glucosa/sodio), y (b) la razón de extracción iontoforética de manitol con respecto a sodio y la razón de concentraciones subdérmicas (manitol/sodio), tras 6 horas de iontoforesis a $0,5 \text{ mA/cm}^2$, tal como se notifica en el ejemplo 6.

45 La figura 22c muestra la correlación entre la razón de extracción iontoforética de glucosa con respecto a manitol y la razón de concentraciones subdérmicas (glucosa/manitol), tras 6 horas de iontoforesis a $0,5 \text{ mA/cm}^2$, tal como se notifica en el ejemplo 6.

La figura 23 representa una célula de iontoforesis diseñada específicamente utilizada para los experimentos *in vitro* notificados en el ejemplo 7

50 Las figuras 24a a 24b muestran (a) los flujos de extracción de litio y sodio y (b) las razones de flujos de extracción (litio/sodio), a lo largo de las 5 horas del experimento notificado en el ejemplo 7, para cada concentración de litio subdérmica considerada.

55 Las figuras 25a a 25b muestran la correlación entre la razón de extracción iontoforética de litio con respecto a sodio y [a] la concentración subdérmica de litio, y [b] la razón de concentraciones subdérmicas (litio/sodio) a lo largo del periodo de 5 horas del experimento notificado en el ejemplo 7.

60 La figura 26 muestra la extracción simultánea de glucosa y sodio *in vivo* en un ser humano, y la correlación con la concentración de glucosa en la sangre.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora de una manera más detallada, haciendo referencia a las figuras 1 y 2.

65 Formalmente, el procedimiento de la presente invención puede dividirse en tres fases distintas que incluyen:

- la extracción de sustancias cargadas y no cargadas de un sistema biológico mediante iontoforesis inversa incluyendo la recogida de estas sustancias;
- la selección de al menos dos sustancias recogidas para analizarlas y el análisis de dichas sustancias seleccionadas utilizando técnicas de química analítica apropiadas, para determinar sus respectivas cantidades extraídas;
- la determinación de la razón de extracción de las dos sustancias analizadas, basándose en los resultados del análisis para evaluar sus niveles relativos en el sistema biológico.

Según el procedimiento de la presente invención la primera fase de extracción y recogida de las sustancias extraídas incluye las etapas de

- poner en contacto una cámara anódica y una cámara catódica de un dispositivo de iontoforesis que comprende electrodos reversibles con un sistema biológico;
- extraer mediante iontoforesis inversa sustancias cargadas y no cargadas de dicho sistema biológico, y recoger dichas sustancias cargadas y no cargadas cada una independientemente en la cámara anódica o la cámara catódica.

Un dispositivo iontoforético que puede utilizarse en el procedimiento de la presente invención puede ser cualquier dispositivo iontoforético convencional que comprende una fuente de alimentación conectada a una cámara anódica y a una cámara catódica, en el que dichas cámaras contienen cada una un medio electroconductor receptor apropiado proporcionado para recoger las sustancias de interés.

Un ejemplo de un dispositivo iontoforético que puede utilizarse para la extracción y la recogida de las sustancias de un sistema biológico según el procedimiento de la presente invención comprende, tal como se representa esquemáticamente en la figura 1, una primera cámara 1 que contiene un primer medio electroconductor receptor 2 y una segunda cámara 3 que contiene un segundo medio electroconductor receptor 4.

Los medios electroconductores receptores 2 y 4 pueden seleccionarse cada uno independientemente de un líquido, un gel, una pasta, una esponja, una cerámica o una combinación de los mismos.

Un electrodo negativo o cátodo 5 se sumerge en el primer medio electroconductor receptor 2 contenido en la cámara 1 de modo que a la cámara 1 se le denomina cámara catódica 1.

Un electrodo positivo o ánodo 6 se sumerge en el segundo medio electroconductor receptor 4 contenido en la cámara 3 de modo que a la cámara 3 se le denomina cámara anódica 3.

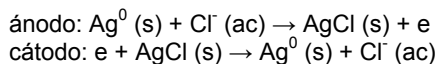
La forma física de los electrodos (cilindro, esfera, disco, malla, serigrafiados, etc.) se elige por conveniencia y cuestiones prácticas.

El cátodo 5 y el ánodo 6 están cada uno conectados a una fuente de alimentación 7 mediante cables.

El dispositivo iontoforético utilizado en el procedimiento de la presente invención comprende electrodos reversibles con el fin de evitar la hidrólisis del agua.

Más preferentemente, el dispositivo iontoforético utilizado en el procedimiento de la presente invención comprende electrodos de Ag/AgCl.

Las reacciones del electrodo del ánodo y del cátodo son, respectivamente:



y son exactamente opuestas la una a la otra.

Por tanto, si resulta ventajoso alternar la polaridad de los electrodos durante un procedimiento de extracción por iontoforesis inversa (como es el caso, por ejemplo, en el instrumento GlucoWatch® Biographer de Cygnus, Inc.), los electrodos de Ag/AgCl son ideales.

La cámara catódica 1 y la cámara anódica 3 están cada una en estrecho contacto con un sistema biológico 8.

El modelado *in vitro* de la extracción y recogida de sustancias de un sistema biológico según el procedimiento de la presente invención puede llevarse a cabo por ejemplo utilizando el dispositivo iontoforético representado esquemáticamente en la figura 2, que comprende, de manera similar al dispositivo iontoforético representado en la

figura 1, una cámara catódica 1' que contiene un primer medio electroconductor receptor 2', una cámara anódica 3' que contiene un segundo medio electroconductor receptor 4', un cátodo 5' sumergido en el medio receptor 2' contenido en la cámara catódica 1', un ánodo 6' sumergido en el medio receptor 4' contenido en la cámara anódica 3', y una fuente de alimentación 7' conectada tanto al cátodo 5' como al ánodo 6'.

Sin embargo, para estimular el sistema biológico, este dispositivo, que se denominará a continuación dispositivo iontoforético *in vitro*, comprenderá, en lugar del sistema biológico, un recipiente 9 que contiene una disolución 10 donadora electroconductora tal como un tampón fisiológico que contiene las sustancias que van a extraerse, estando dicho recipiente cerrado en su parte superior por un trozo de piel 11 de un mamífero.

El recipiente 9 puede comprender además un sistema de circulación 12 de la disolución 10 donadora para mantener constante, o para variar de manera controlada, la concentración de las sustancias contenidas en la disolución 10 donadora.

En este dispositivo iontoforético *in vitro*, la cámara catódica 1' y la cámara anódica 3' están cada una en estrecho contacto con la piel 11 de mamífero.

Tales dispositivos se dan a conocer por ejemplo en los documentos US-A-5.279.543, US-A-5.362.307, US-A-5.730.714, US-A-6.059.736, US-A-5.771.890, US-A-6.023.629.

En el procedimiento de la presente invención, la cámara catódica 1 que contiene el primer medio electroconductor receptor 2 y la cámara anódica 3 que contienen el segundo medio electroconductor receptor 4 del dispositivo iontoforético tal como se representa en la figura 1 se ponen en primer lugar en contacto con el sistema biológico 8.

Preferentemente, el sistema biológico es un cuerpo humano de modo que la cámara catódica 1 y la cámara anódica 3 estarán en contacto con piel o tejidos mucosos.

Entonces se aplica una corriente durante un tiempo determinado por medio de la fuente de alimentación 7 para establecer un circuito eléctrico.

Según la presente invención, la densidad de corriente puede oscilar entre 0,01 y 1,00 mA/cm², dependiendo del sistema biológico.

Preferentemente, la densidad de corriente no debe ser superior a 0,5 mA/cm² cuando el sistema biológico es un cuerpo humano, ya que niveles superiores a 0,5 mA/cm² pueden provocar una sensación desagradable o dolor.

Una densidad de corriente más preferida aplicada cuando el sistema biológico es un cuerpo humano es de aproximadamente 0,3 mA/cm².

La parte exterior del circuito implica electrones que se desplazan a lo largo del cable desde el ánodo 5 hasta el cátodo 6 a través de la fuente de alimentación 7 y la parte interior del circuito implica el movimiento de iones desde una cámara de electrodo hasta la otra a través del sistema biológico 8.

Por tanto, debido a este circuito, los cationes se mueven desde el ánodo 6 hasta el cátodo 5 a través del sistema biológico 8 bajo un mecanismo de transporte por electromigración asistido mediante transporte electroosmótico, los aniones se mueven desde el cátodo 5 hasta el ánodo 6 a través del sistema biológico 8 bajo un mecanismo de transporte por electromigración, y contrario al flujo electroosmótico, y las moléculas no cargadas se mueven en el mismo sentido que los cationes desde el ánodo 6 hasta el cátodo 5 a través del sistema biológico 8 bajo transporte electroosmótico.

Como consecuencia, se extraen cationes del sistema biológico 8 y se recogen en la cámara catódica 1, se extraen aniones del sistema biológico 8 y se recogen en la cámara anódica 3, y se extraen sustancias no cargadas del sistema biológico 8 y se recogen en la cámara catódica 1.

Un efecto ventajoso de extraer las sustancias mediante iontoforesis inversa es que las muestras recogidas están libres de proteínas y de diversos residuos celulares o tisulares porque las proteínas y los diversos residuos se bloquean por la piel y se retienen en el sistema biológico.

De manera similar, puede utilizarse un dispositivo iontoforético *in vitro* tal como se representa mediante la figura 2 para modelar la extracción y la recogida de sustancias según el procedimiento de la presente invención.

En este caso, se extraen cationes de la disolución 10 donadora a través del trozo de piel 11 de mamífero y se recogen en la cámara catódica 1', se extraen aniones de la disolución 10 donadora a través del trozo de piel 11 de mamífero y se recogen en la cámara anódica 3' y se extraen sustancias no cargadas de la disolución 10 donadora a través del trozo de piel 11 de mamífero y se recogen en la cámara catódica 1'.

Como la iontoforesis en sí misma no es selectiva, la extracción iontoforética lleva a la recogida de varias moléculas diferentes incluyendo iones y moléculas no cargadas disueltas en el sistema biológico.

5 Tras la primera fase de extracción de sustancias cargadas y no cargadas del sistema biológico mediante iontoforesis inversa y la recogida de estas sustancias extraídas en las cámaras 1 y 3 de recogida; el procedimiento de la presente invención comprende la segunda fase de selección de dos sustancias extraídas para las que hay que determinar la razón de extracción, y el análisis de estas dos sustancias recogidas utilizando técnicas de química analítica apropiadas incluyendo la utilización de procedimientos de biodetección y biosensores específicos para determinar sus cantidades extraídas respectivas.

10 Puesto que la iontoforesis en sí misma no es selectiva, la discriminación del par de sustancias para las que hay que determinar los niveles relativos en el sistema biológico se consigue a nivel del análisis de las sustancias recogidas.

15 Por consiguiente, la segunda fase del procedimiento de la presente invención comprende la etapa de analizar la cantidad recogida de una primera sustancia extraída y de una segunda sustancia extraída.

20 Según la presente invención, una característica esencial es que las sustancias primera y segunda deben seleccionarse de tal manera que el número de transporte y/o de transferencia de la primera sustancia es independiente del número de transporte y/o de transferencia de la segunda sustancia.

En la presente invención, el par de sustancias cuyos niveles relativos hay que determinar se selecciona dependiendo de los objetivos deseados.

25 Si sólo es de interés la concentración relativa de las dos sustancias en el sistema biológico, la primera sustancia y la segunda sustancia pueden seleccionarse para que sean ambas susceptibles de cambios en su concentración.

En este caso, la razón de extracción sólo proporciona información sobre las concentraciones sistémicas relativas, no sobre las concentraciones "reales" respectivas.

30 Una utilización ventajosa de una selección de este tipo puede ser por ejemplo cuando la razón entre dos moléculas puede dar indicios de un estado patológico o una enfermedad.

35 Sin embargo, en una forma de realización particularmente preferida de la invención, la primera sustancia se selecciona para ser una sustancia de interés susceptible de cambios en su concentración en el sistema biológico y la segunda sustancia se selecciona para presentar una concentración sustancialmente constante en el sistema biológico y por consiguiente un flujo de extracción iontoforética sustancialmente constante de modo que la razón de extracción entre la primera sustancia y la segunda sustancia varía de forma esencialmente lineal con la concentración de la primera sustancia.

40 En este caso, la segunda sustancia actúa como patrón interno fisiológico y la razón de extracción se convierte en una medición directa del nivel fisiológico de la primera sustancia (analito) en el sistema biológico.

Esto puede explicarse tal como sigue.

45 El flujo iontoforético de una sustancia incluida en una disolución iónica tal como el medio fisiológico es proporcional a la concentración de esa sustancia.

Se deduce que el flujo iontoforético del patrón interno permanece prácticamente constante.

50 Por otro lado, la extracción del analito variará según su concentración en el organismo.

Se deduce que la razón de las sustancias extraídas debe ser proporcional a sus concentraciones internas relativas.

55 Esta forma de realización ventajosa permite la determinación de la concentración real del analito en el sistema biológico mientras que evita la toma de muestras de sangre, tal como se ilustra a continuación.

En una forma de realización preferida, la primera sustancia y la segunda sustancia se recogen en la misma cámara de recogida.

60 Esta forma de realización preferida se logra cuando la primera sustancia y la segunda sustancia son o bien dos aniones, o bien dos cationes, o bien una molécula neutra y un catión, o bien dos moléculas neutras.

65 Por ejemplo, según esta forma de realización preferida, la monitorización de la concentración de glucosa, una molécula neutra, como analito puede llevarse a cabo mediante la utilización de sodio, un catión, como patrón fisiológico, evitando por tanto la toma de muestras de sangre varias veces al día para pacientes que presentan diabetes sacarina.

Sin embargo, en el caso en el que la primera sustancia es un analito y la segunda sustancia es un patrón interno, y que el analito y el patrón interno son un anión y un catión, o una molécula no cargada y un anión, esta forma de realización preferida puede lograrse invirtiendo la polaridad de la corriente aplicada.

Sin embargo, debe observarse que también puede utilizarse inversión de la polaridad cuando el analito y el patrón interno son o bien dos aniones, o bien dos cationes o bien una molécula neutra y un catión.

Como un ejemplo de una extracción iontoforética en la que la polaridad se invierte durante el procedimiento de extracción, en primer lugar se aplica corriente tal como se dio a conocer anteriormente durante un primer tiempo determinado por medio de la fuente de alimentación 7 para establecer el circuito eléctrico.

Como consecuencia, se recogen cationes en la cámara catódica 1, se recogen aniones en la cámara anódica 3 y se recogen sustancias no cargadas en la cámara catódica 1.

Entonces, se invierte la polaridad y se aplica corriente durante un segundo tiempo determinado para establecer un circuito eléctrico invertido, en el que el electrodo 5 se convierte en un ánodo y el electrodo 6 se convierte en un cátodo.

Por tanto, debido a este circuito invertido, los cationes se mueven desde el electrodo 5 hasta el electrodo 6 a través del sistema biológico 8, los aniones se mueven desde el electrodo 6 hasta el electrodo 5 a través del sistema biológico 8 y las moléculas no cargadas se mueven en el mismo sentido que los cationes desde el electrodo 5 hasta el electrodo 6 a través del sistema biológico 8.

Esto significa que debido a esta inversión de polaridad, se recogen cationes en la cámara de recogida 3, se recogen aniones en la cámara de recogida 1 y se recogen sustancias no cargadas en la cámara de recogida 3.

Como consecuencia, se recogen secuencialmente cationes y moléculas no cargadas y después aniones en la cámara 1, se recogen secuencialmente aniones y después cationes y moléculas no cargadas en la cámara 3.

Las ventajas de recoger el analito y el patrón interno en la misma cámara de electrodo son garantizar que la extracción de las dos sustancias (analito y patrón interno) se produce a través de exactamente la misma superficie de la piel y evitar cualquier problema asociado con diferencias entre sitios en las propiedades de la piel; y permitir que todos los elementos de electroquímica y química analítica necesarios estén contenidos dentro de la una cámara.

Además, si se utiliza inversión de la polaridad entre cada ciclo de iontoforesis/análisis, entonces ambas formulaciones de electrodo pueden ser idénticas, facilitando el procedimiento de fabricación/montaje; y de manera similar, con inversión de la polaridad y electrodos de Ag/AgCl, no hay preocupación sobre acumulación o agotamiento de AgCl en el ánodo y el cátodo durante el transcurso del procedimiento.

Además, si no se requiere monitorización continua y el análisis se lleva a cabo "fuera de línea", tener ambas sustancias recogidas en el mismo receptor simplifica el procesamiento posterior.

El análisis de ambas sustancias seleccionadas se lleva a cabo utilizando técnicas analíticas apropiadas incluyendo técnicas de biodetección para determinar la cantidad de cada sustancia seleccionada extraída.

Por ejemplo, los medios de análisis de ambas sustancias seleccionadas pueden implicar enzimas específicas, química selectiva de iones, medición de conductividad y todas las demás técnicas de química analítica conocidas de especificidad, sensibilidad y precisión suficientes.

La tercera fase del procedimiento según la presente invención es determinar los niveles relativos de las dos sustancias analizadas seleccionadas, basándose en los resultados del análisis.

La determinación de la razón de extracción de la primera sustancia con respecto a la segunda sustancia puede realizarse o bien calculando la razón de la cantidad recogida de la primera sustancia extraída en un periodo de tiempo predeterminado con respecto a la cantidad recogida de la segunda sustancia extraída en el mismo periodo de tiempo predeterminado, en particular cuando la primera sustancia y la segunda sustancia se extraen simultáneamente, o bien en cualquier caso, calculando en primer lugar el flujo de la primera sustancia extraída y de la segunda sustancia, basándose en las cantidades extraídas de la primera sustancia y de la segunda sustancia, respectivamente, y entonces calculando la razón del flujo de la primera sustancia extraída con respecto al flujo de la segunda sustancia extraída.

Ha de observarse que, en la presente invención, puesto que se extraen varias sustancias debido a la falta de selectividad de la extracción iontoforética, pueden analizarse más de dos sustancias para determinar su cantidad extraída; por tanto, una extracción iontoforética permite la determinación de la razón de extracción de dos sustancias para más de un par de sustancias extraídas.

Por tanto, según la presente invención, si se analizan más de dos sustancias, pueden determinarse múltiples razones de extracción.

5 En una forma de realización, la razón de las cantidades extraídas o la razón de los flujos extraídos de la primera sustancia A (Qa) y la segunda sustancia B (Qb) refleja directamente sus concentraciones relativas en el sistema biológico ($[A]/[B]$), es decir,

$$Qa/Qb = K \cdot \{[A]/[B]\} \quad (\text{ecuación 1})$$

10 en la que K es una constante.

Esta forma de realización es ventajosa cuando la razón de A con respecto a B en el sistema biológico es indicativa, por ejemplo, del desarrollo de un estado patológico particular.

15 Se deduce que un cambio en Qa/Qb refleja directamente el mismo cambio relativo en la razón de $[A]/[B]$ en el sistema biológico.

20 En una segunda forma de realización, cuando la sustancia B se selecciona de modo que, en una población, [B] es invariable, un cambio en Qa/Qb refleja directamente el cambio correspondiente en [A].

En otras palabras,

$$Qa/Qb = K' \cdot [A] \quad (\text{ecuación 2})$$

25 en la que K' (= K/[B]) es una constante.

30 Esta forma de realización es ventajosa cuando se conoce que un cambio en el valor de [A] en un porcentaje determinado, por aumento o por disminución, plantea un riesgo médico (por ejemplo, un nivel de fármaco demasiado bajo para lograr un efecto o demasiado alto y potencialmente tóxico) o indica una necesidad de intervención terapéutica alternativa.

35 En otra forma de realización, las ecuaciones (1) y (2) son particularmente útiles cuando la sustancia B se selecciona de modo que, en una población, [B] es invariable y puede considerarse constante, y se conoce K (y por lo tanto K').

En este caso, la razón Qa/Qb medida puede convertirse directamente en la concentración de A ([A]) en el sistema biológico, sin la necesidad de calibrar con una muestra de sangre.

40 Ejemplos de pares de analito/patrón interno que pueden aplicarse en la presente invención son litio/potasio, litio/sodio, lactato/cloruro, lactato/sodio, lactato/potasio, glucosa/sodio, glucosa/potasio, amonio/sodio, amonio/potasio, potasio/sodio, etanol/sodio, etanol/potasio, valproato/cloruro, valproato/potasio, valproato/sodio, no limitándose evidentemente estos ejemplos a estos pares.

45 Algunos ejemplos a continuación mostrarán cómo puede seleccionarse la sustancia B y cómo puede determinarse K (y por tanto K') con el fin de que esta forma de realización sea práctica.

50 Se ha diseñado un dispositivo de toma de muestras iontoforético para monitorizar de forma no invasiva los niveles relativos de dos sustancias presentes en un sistema biológico para proporcionar información sobre los niveles relativos de dos sustancias o preferentemente información sobre el nivel fisiológico de una sustancia a un paciente que llevará el dispositivo en una ubicación adecuada, tal como la cintura.

55 Dicho dispositivo de toma de muestras iontoforético aplica el procedimiento según la presente invención de modo que la descripción anterior en relación con el procedimiento puede considerarse de manera general para el dispositivo.

60 Dicho dispositivo de toma de muestras iontoforético comprende, en lo que respecta al dispositivo iontoforético representado esquemáticamente en la figura 1, una fuente de alimentación eléctrica, un montaje de recogida que comprende una primera cámara de recogida que contiene un primer medio electroconductor en contacto con un primer electrodo y una segunda cámara de recogida que contiene un segundo medio electroconductor en contacto con un segundo electrodo, siendo dichos electrodos electrodos reversibles, preferentemente electrodos de plata/cloruro de plata, y estando cada uno en contacto con la fuente de alimentación eléctrica cuando el montaje de recogida se inserta en el dispositivo iontoforético.

65 Además, dicho dispositivo comprende unos medios para analizar automáticamente dos o más sustancias cargadas y/o no cargadas seleccionadas o bien en una o bien en ambas de las cámaras de recogida con el fin de determinar sus cantidades extraídas.

Por ejemplo, los medios de analizar ambas de las sustancias seleccionadas pueden implicar enzimas específicas, química selectiva de iones, medición de conductividad y todas las demás técnicas de química analítica conocidas de especificidad, sensibilidad y precisión suficientes.

Además, dicho dispositivo comprende unos medios para convertir las cantidades extraídas de una primera sustancia y una segunda sustancia en la razón de extracción de la primera sustancia con respecto a la segunda sustancia, en el que dichas sustancias primera y segunda se seleccionan de tal forma que el número de transporte y/o de transferencia de la primera sustancia es independiente del número de transporte y/o de transferencia de la segunda sustancia.

Según una forma de realización, los medios para convertir las cantidades extraídas de una primera sustancia y una segunda sustancia en la razón de extracción de la primera sustancia con respecto a la segunda sustancia son unos medios programables que pueden calcular la razón de la cantidad recogida de la primera sustancia extraída con respecto a la cantidad recogida de la segunda sustancia extraída.

En otra forma de realización, los medios para convertir las cantidades extraídas de una primera sustancia y una segunda sustancia en la razón de extracción de la primera sustancia con respecto a la segunda sustancia son unos medios programables que pueden calcular en primer lugar los flujos de la primera sustancia extraída y de la segunda sustancia, basándose en las cantidades extraídas de la primera sustancia y de la segunda sustancia, respectivamente, y entonces calcular la razón del flujo de la primera sustancia extraída con respecto al flujo de la segunda sustancia extraída.

Dicho dispositivo de toma de muestras iontoforético puede diseñarse para proporcionar información sobre los niveles relativos de la primera sustancia con respecto a la segunda sustancia cuando las sustancias primera y segunda para las que va a determinarse la razón de extracción son susceptibles de cambios en su concentración en el sistema biológico.

Además, dicho dispositivo de toma de muestras iontoforético puede diseñarse para proporcionar información sobre la concentración fisiológica de la primera sustancia cuando la primera sustancia es susceptible de cambios en su concentración en el sistema biológico y la segunda sustancia presenta una concentración sustancialmente constante en el sistema biológico, determinándose la concentración fisiológica de la primera sustancia basándose en la concentración fisiológica constante de la segunda sustancia.

Dicho dispositivo iontoforético puede comprender además unos medios para invertir la polaridad de electrodos tras cada ciclo de extracción/análisis.

En una forma de realización particularmente preferida, se miniaturiza dicho dispositivo de toma de muestras iontoforético para llevarse en el cuerpo de una persona.

Tal forma miniaturizada puede diseñarse, por ejemplo, para llevarse en la cintura por un paciente.

Tal dispositivo miniaturizado puede utilizarse por ejemplo para monitorizar el nivel fisiológico de glucosa presente en un paciente diabético, sin una calibración basada en una toma de muestras de sangre, puesto que la concentración fisiológica de la glucosa se determinará basándose en la concentración fisiológica constante de una segunda sustancia, por ejemplo ión sodio, que actúa como patrón interno.

La invención se explicará ahora adicionalmente en más detalle con los siguientes ejemplos haciendo referencia a las figuras 3 a 25.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Se realizó una serie de experimentos *in vitro* en células de difusión por iontoforesis diseñadas específicamente (Laboratory Glass Apparatus, Berkeley, California, EE.UU.) tal como se representa en la figura 3.

La disolución subdérmica (donadora) fue un tampón de pH 7,4 (Hepes 25 mM + NaCl 133 mM) al que se le añadió glutamato 60 μ M como patrón interno.

El analito de interés fue el fármaco antiepiléptico valproato, que se incluyó a 4 concentraciones diferentes: 21 μ M, 35 μ M, 70 μ M y 104,5 μ M.

Para facilitar la química analítica, se añadieron a la disolución donadora cantidades conocidas de valproato tritiado y glutamato marcado con 14 C.

ES 2 394 691 T3

Las cámaras anódica y catódica estaban en contacto con la superficie exterior de la piel y contenían los medios receptores (de recogida), respectivamente, NaCl 75 mM + Hepes 25 mM y NaCl 133 mM + Hepes 25 mM (ambos tamponados a pH 7,4).

- 5 Se sujetó piel de oreja de cerdo de grosor completo entre las dos mitades de la célula de iontoforesis y se llenó cada cámara con la disolución apropiada.

En la figura 3 se muestra un esquema del experimento.

- 10 Se hizo pasar una corriente de 0,4 mA (0,5 mA/cm²) entre electrodos de plata-cloruro de plata, (Ag/AgCl), insertados en las cámaras anódica y catódica, durante un total de 5 horas.

Cada hora, se retiró el contenido completo de la disolución de ánodo y volvió a llenarse la cámara con tampón reciente.

- 15 Sólo se tomaron muestras de la cámara catódica al final de las 5 horas de paso de corriente.

Tras este primer periodo de 5 horas a 0,4 mA, se hizo pasar una corriente reducida de 0,1 mA durante las siguientes 19 horas, al final de las cuales se tomaron muestras tanto de la cámara anódica como de la catódica.

- 20 Por tanto el experimento total duró 24 horas.

Se analizaron todas las muestras para detectar glutamato y valproato mediante recuento por centelleo líquido.

- 25 Se llevaron a cabo al menos 6 repeticiones para cada concentración de valproato.

Los resultados mostraron, tal como se esperaba, que tanto el valproato como el glutamato (que están cargados negativamente) se extrajeron en el ánodo.

- 30 La tabla I muestra el flujo de extracción de ambos aniones para cada momento de toma de muestras y para cada concentración de valproato.

Las figuras 4a a 4b presentan los resultados medidos a las 5 y 24 horas.

- 35 Los flujos de extracción de valproato aumentaron con la concentración, mientras que el flujo de glutamato permaneció igual para todos los experimentos y era independiente de la concentración de valproato.

Tabla I: flujos de extracción (pmoles.h⁻¹.cm⁻²) de valproato y glutamato para cada periodo de toma de muestras La concentración de glutamato siempre fue de 60 μM. La corriente fue de 0,4 mA durante las primeras 5 horas y de 0,1 mA durante las siguientes 19 horas. Los valores se dan como media (± desviación estándar).

40

Tiempo (h)	[Valproato] = 21 μM		[Valproato] = 35 μM		[Valproato] = 70 μM		[Valproato] = 104,5 μM	
	Flujo de valproato	Flujo de glutamato	Flujo de valproato	Flujo de glutamato	Flujo de valproato	Flujo de glutamato	Flujo de valproato	Flujo de glutamato
0-1	18 (±12)	118 (±67)	42 (±19)	155 (±82)	53 (±29)	88 (±45)	120 (±65)	148 (±63)
1-2	50 (±17)	308 (±118)	113 (±32)	367 (±87)	185 (±83)	267 (±103)	313 (±100)	361 (±71)
2-3	79 (±22)	440 (±110)	161 (±40)	484 (±85)	268 (±99)	388 (±94)	440 (±108)	490 (±54)
3-4	92 (31)	479 (±86)	202 (±50)	571 (±42)	342 (±114)	494 (±102)	531 (±128)	566 (±74)
4-5	112 (±30)	570 (±77)	220 (±47)	588 (±49)	369 (±106)	524 (±82)	600 (±108)	599 (±77)
5-24	41 (±4)	142 (±23)	82 (±17)	143 (±16)	160 (±25)	146 (±24)	228 (±33)	157 (±23)

La tabla II y las figuras 5a a 5b muestran los números de transporte de valproato y glutamato calculados a las 4-5^a horas del paso de corriente (0,4 mA) y a las 5-24^a horas (0,1 mA).

- 45 A partir de cada célula individual, y en cada punto de toma de muestras, se obtuvo la razón de [valproato extraído/glutamato extraído].

Las medias y las desviaciones estándar de estas razones se recogen en la tabla III.

La figura 6a muestra la correlación lineal entre la razón de extracción (valproato/glutamato) y la concentración de valproato en la disolución subdérmica.

- 5 La figura 6b muestra la correlación lineal entre la razón extraída de los aniones y su razón molar (valproato/glutamato) en la disolución subdérmica.

Tabla II: números de transporte ($\times 10^6$) de valproato y glutamato determinados en cada periodo de toma de muestras.

Tiempo (h)	[Valproato] = 21 μ M		[Valproato] = 35 μ M		[Valproato] = 70 μ M		[Valproato] = 104,5 μ M	
	Valproato	Glutamato	Valproato	Glutamato	Valproato	Glutamato	Valproato	Glutamato
0-1	1,20 \pm 0,79	7,89 \pm 4,51	2,23 \pm 5,47	10,4 \pm 5,47	3,56 \pm 1,96	5,92 \pm 3,03	8,04 \pm 4,37	9,92 \pm 4,20
1-2	3,38 \pm 1,13	20,6 \pm 7,92	7,60 \pm 2,14	24,6 \pm 5,83	12,4 \pm 5,57	17,9 \pm 6,88	21,0 \pm 6,68	24,2 \pm 4,79
2-3	5,26 \pm 1,48	29,5 \pm 7,38	10,8 \pm 2,70	32,4 \pm 5,71	18,0 \pm 6,65	26,0 \pm 6,32	29,5 \pm 7,21	32,8 \pm 3,60
3-4	6,15 \pm 2,11	32,1 \pm 5,77	13,5 \pm 3,38	38,2 \pm 2,84	22,9 \pm 7,61	33,1 \pm 6,80	35,6 \pm 8,56	37,9 \pm 4,98
4-5	7,48 \pm 2,01	38,2 \pm 5,19	14,8 \pm 3,13	39,4 \pm 3,28	24,7 \pm 7,09	35,1 \pm 5,52	40,2 \pm 7,22	40,1 \pm 5,16
5-24	10,9 \pm 1,20	38,1 \pm 6,24	22,0 \pm 4,66	38,3 \pm 4,24	42,9 \pm 6,74	39,2 \pm 6,45	61,0 \pm 8,81	42,2 \pm 6,22

- 10 Tabla III: razón de flujos de extracción de [valproato/glutamato] como función del tiempo de toma de muestras y como función de la concentración de valproato subdérmica. La concentración de glutamato subdérmica siempre fue de 60 μ M. La corriente fue de 0,4 mA durante las primeras 5 horas y de 0,1 mA durante las siguientes 19 horas. V/G subdérmico es la razón de concentraciones de valproato con respecto a glutamato en la disolución subdérmica donadora. Los valores son media \pm desviación estándar.

- 15

Tiempo (h)	[Valproato] = 20,98 μ M V/G subdérmico = 0,35	[Valproato] = 34,96 μ M V/G subdérmico = 0,58	[Valproato] = 69,93 μ M V/G subdérmico = 1,16	[Valproato] = 104,5 μ M V/G subdérmico = 1,74
0-1	0,17 \pm 0,05	0,29 \pm 0,08	0,59 \pm 0,11	0,83 \pm 0,25
1-2	0,17 \pm 0,03	0,32 \pm 0,09	0,68 \pm 0,15	0,88 \pm 0,25
2-3	0,18 \pm 0,03	0,34 \pm 0,09	0,68 \pm 0,17	0,91 \pm 0,23
3-4	0,19 \pm 0,04	0,35 \pm 0,09	0,68 \pm 0,17	0,94 \pm 0,21
4-5	0,20 \pm 0,06	0,37 \pm 0,08	0,70 \pm 0,17	1,01 \pm 0,19
5-24	0,29 \pm 0,04	0,58 \pm 0,15	1,10 \pm 0,12	1,46 \pm 0,22

Para ilustrar cómo funcionará esta técnica en la práctica, se consideran algunas situaciones prácticas utilizando la información y las relaciones obtenidas a partir de los experimentos descritos anteriormente.

- 20 Se considera un paciente que toma ácido valproico, cuya concentración de glutamato en plasma es de 60 μ M, y en el que se realiza un procedimiento iontoforético inverso.

- 25 Se supone que el análisis de las muestras extraídas indica que se extraen 741 pmoles de glutamato y 724 pmoles de valproato en 1 hora (4-5ª horas de extracción).

La razón extraída (valproato/glutamato) es de 0,977.

Ahora puede utilizarse esta información de diferentes maneras:

- 30 [a] Se supone un intervalo terapéutico para valproato de 3 - 10 mg/l (o de 21 a 69 μ M) del fármaco libre.

Tales valores corresponden a razones molares (valproato/glutamato) de 0,35 y 1,15 en los fluidos subdérmicos.

- 35 Según los resultados *in vitro* (mediante sustitución en la ecuación de regresión obtenida a las 5 horas, figuras 6a a 6b), una razón de extracción de 0,977 indica que la concentración de valproato es sistémicamente de 100 μ M (figura 6a), es decir, la razón de [valproato]/[glutamato] subdérmica es de 1,67 (figura 6b).

- 40 Por tanto, se concluirá que los niveles en plasma de valproato de este paciente eran demasiado altos y estaban fuera del intervalo terapéutico.

De hecho, los valores supuestos para este paciente hipotético corresponden a uno de los experimentos *in vitro* con una concentración de valproato subdérmica de 104,5 μ M y una razón de [valproato]/[glutamato] de 1,74.

- 45 En otras palabras, hay un buen valor predictivo de las ecuaciones desarrolladas.

[b] Para las razones subdérmicas molares de 0,35 y 1,15 (límites inferior y superior del intervalo terapéutico), pueden

deducirse razones de extracción por iontoforesis de 0,21 y 0,68, respectivamente.

Éstos son exactamente los valores predichos mediante la ecuación de regresión en la figura 6b y por tanto pueden traducirse valores en plasma "reales", que delimitan el intervalo terapéutico, en razones iontoforéticas extraídas.

5 Ahora puede concluirse que los niveles en plasma de valproato obtenidos de este paciente están fuera del intervalo terapéutico: la razón de extracción de 0,977, se encuentra más allá de los límites de 0,21 y 0,68.

10 Este segundo enfoque también puede utilizarse para cualquier situación en la que la concentración relativa de dos marcadores (de efecto clínico, terapéutico, tóxico, etc.) es de relevancia y de interés.

Es importante observar que los datos del ejemplo anterior corresponden a una de las repeticiones *in vitro* en las que la concentración de valproato donadora se mantuvo a 104,5 μM .

15 Por otro lado, las ecuaciones de regresión utilizadas para el cálculo se derivaron de muchos experimentos realizados con piel de oreja de cerdo obtenida de varios donantes diferentes.

20 Esto apoya la hipótesis de que la variabilidad entre individuos y en un mismo individuo afecta a la extracción de glutamato y de valproato de la misma forma.

Es importante además reiterar que las figuras 6a a 6b demuestran la determinación de las constantes K y K' necesarias para calcular una concentración absoluta de un analito en el sistema biológico a partir de la razón extraída del analito con respecto al patrón interno elegido.

25 En este ejemplo, el analito elegido (A) es valproato, mientras que el patrón interno (B) es glutamato.

Por tanto, según la ecuación 1,

$$Q_{\text{val}}/Q_{\text{glu}} = K \cdot [\text{val}]/[\text{glu}]$$

30 K es la pendiente de la gráfica en la figura 6b; es decir, tras un periodo corto (de 5 horas) de iontoforesis a 0,5 mA/cm², K = 0,57.

35 Por otro lado, tras un periodo más largo (de 19 horas) de iontoforesis a 0,1 mA/cm², K = 0,83.

De manera similar, según la ecuación 2,

$$Q_{\text{val}}/Q_{\text{glu}} = K' \cdot [\text{val}]$$

40 K' es la pendiente de la gráfica en la figura 6a y es igual a K dividida entre la concentración de glutamato fija (60 μM) en el sistema biológico.

Tras un periodo corto (de 5 horas) de iontoforesis a 0,5 mA/cm², K' = 0,0096.

45 Por otro lado, tras un periodo más largo (de 19 horas) de iontoforesis a 0,1 mA/cm², K' = 0,0138.

50 Se deduce que, una vez se ha establecido el valor de K' para un par de sustancias particular, y dado que la concentración del patrón interno ([B]) en el sistema biológico es constante, entonces puede utilizarse la ecuación 2 para determinar la concentración del analito de interés ([A]) directamente a partir de la razón de extracción iontoforética Q_a/Q_b.

Ejemplo 2

55 Se realizaron experimentos en células de difusión por iontoforesis diseñadas especialmente (Laboratory Glass Apparatus, Berkeley, California, EE.UU.) tal como se representa en la figura 7.

La disolución subdérmica (donadora) fue un tampón de pH 7,4 (Tris 25 mM + Mops 34 mM + NaCl 130 mM + KCl 4 mM), en el que los iones potasio, sodio y cloruro actuaban como patrones internos.

60 Los dos analitos de interés fueron lactato (cargado negativamente) y amonio (cargado positivamente).

En un primer experimento las concentraciones subdérmicas de lactato y amonio fueron de 1,74 mM y 1,56 mM.

En un segundo experimento las concentraciones de lactato y amonio fueron de 0,73 mM y 0,78 mM.

65 Las cámaras anódica y catódica estaban en contacto con la superficie externa de la piel y contenían los medios

receptores (de recogida), respectivamente, Tris/TrisHCl 80 mM y Tris 25 mM + Mops 34 mM (ambos tamponados a pH 7,4).

5 Se sujetó piel de oreja de cerdo cortada con dermatomo entre las dos mitades de la célula de iontoforesis y se llenó cada cámara con la disolución apropiada.

En la figura 7, se muestra un esquema del experimento.

10 Se llenó la cámara subdérmica con la disolución “donadora” que se perfundió continuamente a 2-3 ml/hora por medio de una bomba peristáltica.

Se hizo pasar una corriente de 0,4 mA ($0,5 \text{ mA/cm}^2$) durante un total de 5 horas entre los electrodos de Ag/AgCl, que se insertaron en las cámaras anódica y catódica.

15 Cada hora, se retiraron las disoluciones completas de ánodo y cátodo y volvieron a llenarse las cámaras con tampón reciente.

Se analizaron todas las muestras para detectar lactato, amonio, potasio, sodio y cloruro.

20 Tal como se esperaba, se recogieron los cationes amonio, potasio y sodio cargados positivamente en el electrodo catódico (negativo), mientras que se recogieron los aniones lactato y cloruro cargados negativamente en el electrodo positivo (ánodo).

25 La tabla IV y las figuras 8a a 8b muestran los flujos de extracción para estas 5 especies a la 3ª y 5ª horas del experimento.

Los flujos de lactato y amonio cambiaron en proporción a sus concentraciones subdérmicas, mientras que los flujos de potasio, cloruro y sodio se mantuvieron esencialmente constantes.

30 Tabla IV: flujos de extracción para Na^+ , K^+ y amonio⁺ en el cátodo y para lactato⁻ y cloruro⁻ en el ánodo. Los valores son media \pm desviación estándar.

Concentraciones de analito ^a	Tiempo (h)	Amonio (nmoles.h ⁻¹ . cm ⁻²)	Lactato (nmoles.h ⁻¹ . cm ⁻²)	K ⁺ (nmoles.h ⁻¹ . cm ⁻²)	Na ⁺ (nmoles.h ⁻¹ . cm ⁻²)	Cl ⁻ (nmoles.h ⁻¹ . cm ⁻²)
[lactato] = 1,74 mM	3	260 \pm 17	113 \pm 15	760 \pm 90	12960 \pm 1530	9430 \pm 0
[amonio] = 1,56 mM	5	275 \pm 5	107 \pm 13	780 \pm 10	13790 \pm 210	7850 \pm 830
[lactato] = 0,73 mM	3	145 \pm 18	45 \pm 8	900 \pm 27	13620 \pm 218	5510 \pm 1150
[amonio] = 0,78 mM	5	140 \pm 11	43 \pm 10	820 \pm 21	12460 \pm 1540	7670 \pm 1480

^a Las concentraciones subdérmicas de K⁺, Na⁺ y Cl⁻ siempre fueron de 4 mM, 133 mM y 137 mM respectivamente

35 La tabla V y las figuras 9a a 9b presenta los números de transporte de los dos analitos de interés (lactato y amonio) y de los tres patrones internos (K⁺, Na⁺ y Cl⁻) considerados.

40 Para cada célula individual y en cada momento de toma de muestras se determinaron las siguientes razones de iones extraídos: [a] (amonio/sodio), [b] (amonio/ potasio), [c] (lactato/cloruro), [d] (lactato/sodio), [e] (lactato/potasio) y [f] (potasio/sodio).

En la tabla VI y las figuras 10a a 10b se muestran las medias y desviaciones estándar de estas razones.

45 Estos valores pueden utilizarse a su vez para determinar K y K' para cada par de analito/patrón interno, tal como se describió en el ejemplo anterior.

Los valores de K están en la tabla VII a continuación.

50 Pueden obtenerse los valores de K' simplemente dividiendo K entre la concentración apropiada en el sistema biológico del patrón interno aplicable.

Tabla V: números de transporte del analito y patrón interno deducidos (x100). Los valores son media ± desviación estándar.

Concentraciones de analito	Tiempo (h)	Amonio	Lactato	K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻
[lactato] = 1,74 mM	3	1,36 ± 0,09	0,59 ± 0,08	3,99 ± 0,45	67,72 ± 7,98	57,68 ± 0,00
[amonio] = 1,56 mM	5	1,44 ± 0,03	0,56 ± 0,07	4,06 ± 0,05	72,07 ± 1,07	50,69 ± 5,36
[lactato] = 0,73 mM	3	0,76 ± 0,09	0,24 ± 0,04	4,72 ± 1,40	71,17 ± 11,40	38,40 ± 8,04
[amonio] = 0,78 mM	5	0,73 ± 0,06	0,23 ± 0,05	4,26 ± 1,08	65,14 ± 8,07	52,47 ± 10,12

5 Tabla VI: razones de flujos extraídos (x10³) de analitos y patrones internos. Los valores son media ± desviación estándar

Concentraciones de analito	Tiempo (h)	NH ₄ ⁺ /Na ⁺	NH ₄ ⁺ /K ⁺	Lactato ⁻ /Na ⁺	Lactato ⁻ /K ⁺	Lactato ⁻ /Cl ⁻	K ⁺ /Na ⁺	
[lactato] = 1,74 mM [amonio] = 1,56 mM		Razón sub-dérmica (•10³)	11,7	390	13,1	435	12,6	30
	3		20 ± 1,1	342 ± 16	8,7 ± 0,1	149 ± 3,3	12 ± 1,6	59 ± 0,3
	5		20 ± 0,1	354 ± 11	7,8 ± 1,1	138 ± 15	14 ± 3,2	56 ± 1,6
[lactato] = 0,73 mM [amonio] = 0,78 mM		Razón sub-dérmica (•10³)	5,8	195	5,4	181	5,2	30
	3		11 ± 1,0	166 ± 24	3,3 ± 0,6	52 ± 16	7,8 ± 1,0	66 ± 9,5
	5		11 ± 0,8	178 ± 29	3,5 ± 0,9	55 ± 19	6,0 ± 2,8	65 ± 8,7

10 Tabla VII: valores de K determinados para cada par de analito/patrón interno a partir de los datos de la tabla VI

Concentraciones de analito	Tiempo (h)	NH ₄ ⁺ /Na ⁺	NH ₄ ⁺ /K ⁺	Lactato ⁻ /Na ⁺	Lactato ⁻ /K ⁺	Lactato ⁻ /Cl ⁻	K ⁺ /Na ⁺	
[lactato] = 1,74 mM [amonio] = 1,56 mM		Razón sub-dérmica (•10³)	11,7	390	13,1	435	12,6	30
	3		1,71 ± 0,09	0,88 ± 0,04	0,66 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,95 ± 0,13	1,97 ± 0,01
	5		1,71 ± 0,01	0,91 ± 0,03	0,60 ± 0,08	0,32 ± 0,03	1,11 ± 0,25	1,87 ± 0,05
[lactato] = 0,73 mM [amonio] = 0,78 mM		Razón sub-dérmica (•10³)	5,8	195	5,4	181	5,2	30
	3		1,90 ± 0,09	0,85 ± 0,12	0,61 ± 0,11	0,29 ± 0,09	1,50 ± 0,19	2,20 ± 0,32
	5		1,90 ± 0,14	0,91 ± 0,15	0,65 ± 0,17	0,30 ± 0,10	1,15 ± 0,54	2,17 ± 0,29

Queda claro que los datos obtenidos en estos experimentos pueden utilizarse tal como se describió en el primer ejemplo para estimar si la concentración subdérmica del analito de interés se encuentra dentro o fuera de un límite aceptable.

15 La utilización de más de un patrón interno demuestra la generalidad del enfoque y ofrece un medio para mejorar la precisión, seguridad y exactitud del procedimiento.

20 La consistencia de la razón de extracción de patrones internos actúa como una comprobación de seguridad adicional, porque permite verificar sencillamente la constancia de sus niveles subdérmicos (que es un requisito supuesto).

También se observa que, a pesar del hecho de que el lactato y Na⁺ se recogen en electrodos opuestos, su razón de flujos de extracción también es un reflejo de, y proporcional a, la razón de sus concentraciones subdérmicas.

25 Esto indica que no siempre es necesario utilizar, como patrón interno, una especie que se extraiga en el mismo electrodo que el analito de interés.

Esto puede ser importante cuando los procedimientos de ensayo interfieren uno con otro, por ejemplo.

30 Por último, los datos en este ejemplo demuestran que pueden extraerse múltiples analitos y detectarse en un único procedimiento de iontoforesis inversa y que puede referenciarse el transporte de cada uno a un "patrón interno" apropiado.

35 Ejemplo 3

Se sujetó piel de oreja de cerdo cortada con dermatomo entre las dos mitades de células de difusión adyacentes

(área = 0,78 cm²) tal como se representa en la figura 11.

Se colocó el ánodo en la cámara subdérmica, “donadora”, que contenía un tampón fisiológico de pH 7,4 (Tris/TrisHCl 25 mM + NaCl 133 mM) al que se le añadió el analito manitol.

5 El manitol es un azúcar no metabolizable con propiedades (incluyendo peso molecular y lipofilia) muy similares a la glucosa.

10 En un primer experimento la concentración de manitol fue de 5 mM durante las tres primeras horas del experimento y entonces se aumentó hasta 10 mM durante un periodo posterior de tres horas.

Para facilitar la química analítica se añadieron a las disoluciones donadoras cantidades conocidas de manitol marcado con ¹⁴C.

15 El ión sodio fue el patrón interno elegido.

La cámara catódica (de recogida), que estaba en contacto con la superficie externa de la piel, contenía un tampón de Tris/TrisHCl 25 mM a pH 7,4.

20 En la figura 11 se muestra un esquema del experimento.

Se hizo pasar una corriente de 0,4 mA (0,5 mA/cm²) entre los electrodos de Ag/AgCl durante un total de 6 horas.

25 Durante el primer periodo de 3 horas, se retiró el contenido completo de la disolución de cátodo cada 60 minutos y volvió a llenarse la cámara con tampón reciente.

Durante el segundo periodo de 3 horas, se sustituyó la disolución donadora de manitol 5 mM por manitol 10 mM, y entonces se tomaron muestras de la cámara catódica cada 30 minutos.

30 Se cuantificaron el manitol e iones sodio en cada muestra mediante recuento por centelleo líquido y mediante un electrodo específico de iones, respectivamente.

La figura 12 y la tabla VIII muestran los flujos de manitol y sodio a lo largo de las seis horas de experimento.

35 Los datos muestran que el flujo de manitol cambió abruptamente cuando su concentración en la disolución subdérmica se aumentó desde 5 hasta 10 mM.

Por otra parte, el flujo de sodio alcanzó un valor constante que permaneció invariable a lo largo de todo el transcurso del experimento.

40 La figura 13 y la tabla VIII muestran la correlación entre la razón de extracción iontoforética de manitol con respecto a sodio y su razón de concentraciones subdérmicas a lo largo del periodo de seis horas del experimento.

45 Tabla VIII: flujos de extracción y razones de flujos extraídos (x10³) para manitol y Na⁺. Los valores son media ± desviación estándar

Tiempo (min)	[Manitol] (mM)	Razón de [manitol/Na ⁺] subdérmica (x10 ³)	Flujo de manitol (nmol.h ⁻¹ .cm ⁻²)	Flujo de sodio ⁺ (μmol.h ⁻¹ .cm ⁻²)	Razón de flujos extraídos (manitol/Na ⁺) (x10 ³)
60	5	37,6	13,3 ± 7,6	7,9 ± 0,5	1,7 ± 0,8
120			21,0 ± 4,7	9,7 ± 0,6	2,2 ± 0,3
180			25,2 ± 4,3	10,1 ± 0,4	2,5 ± 0,3
210	10	75,2	52,2 ± 4,4	10,3 ± 0,5	5,0 ± 0,2
240			53,2 ± 7,7	10,4 ± 0,6	5,1 ± 0,5
270			54,1 ± 6,8	10,3 ± 0,4	5,2 ± 0,5
300			58,1 ± 4,5	10,6 ± 0,3	5,5 ± 0,3
330			60,9 ± 6,8	10,7 ± 0,3	5,7 ± 0,4
360			63,2 ± 6,2	10,5 ± 0,6	6,0 ± 0,3

50 En un segundo experimento, realizado en condiciones idénticas a las del primero (véase la figura 11), la concentración de manitol fue de 5 mM durante las tres primeras horas del experimento, entonces se redujo hasta 3 mM durante un periodo posterior de una hora y entonces se aumentó hasta 10 mM durante un periodo posterior de una hora.

El ión sodio fue de nuevo el patrón interno elegido.

Se hizo pasar una corriente de 0,4 mA (0,5 mA/cm²) entre los electrodos de Ag/AgCl durante un total de 5 horas.

5 Durante el primer periodo de 3 horas, se retiró el contenido completo de la disolución de cátodo cada 60 minutos y volvió a llenarse la cámara con tampón reciente.

Durante el segundo periodo de 1 hora, se sustituyó la disolución donadora de manitol 5 mM por manitol 3 mM y entonces se tomaron muestras de la cámara catódica cada 30 minutos.

10 Durante el tercer periodo de 1 hora, se sustituyó la disolución donadora de manitol 3 mM por manitol 10 mM y entonces se tomaron muestras de la cámara catódica cada 30 minutos.

De nuevo se cuantificaron el manitol e iones sodio en cada muestra mediante recuento por centelleo líquido y mediante un electrodo específico de ión, respectivamente.

15 La figuras 14a a 14b y la tabla IX muestran los flujos de manitol y sodio y también la razón de flujos de extracción (manitol/sodio) a lo largo de las 5 horas de experimento.

20 Tabla IX: flujos de extracción y razones de flujos extraídos (x10³) para manitol y Na⁺. Los valores son media ± desviación estándar

Tiempo (min)	[Manitol] (mM)	Razón de [manitol/Na ⁺] sub-dérmica (x10 ³)	Flujo de manitol (nmol.h ⁻¹ .cm ⁻²)	Flujo de sodio ⁺ (μmol.h ⁻¹ .cm ⁻²)	Razón de flujos extraídos (manitol/Na ⁺) (x10 ³)
60	5	37,6	13,5 ± 4,1	8,8 ± 0,7	1,52 ± 0,4
120			25,8 ± 4,8	10,2 ± 0,7	2,5 ± 0,3
180			27,8 ± 4,4	10,4 ± 0,7	2,7 ± 0,3
210	3	22,5	16,6 ± 3,2	10,9 ± 0,7	1,5 ± 0,2
240			14,1 ± 2,8	9,7 ± 0,5	1,5 ± 0,5
270	10	75,2	49,6 ± 8,4	9,4 ± 0,6	5,2 ± 0,5
300			48,1 ± 8,7	9,3 ± 0,4	5,2 ± 0,7

25 Los datos muestran que el flujo de manitol se redujo casi a la mitad cuando se redujo su concentración en la disolución subdérmica desde 5 hasta 3 mM y entonces aumentó abruptamente cuando se aumentó la disolución subdérmica desde 3 hasta 10 mM.

Por otra parte, el flujo de sodio alcanzó un valor constante que permaneció invariable a lo largo de todo el transcurso del experimento.

30 La figuras 15a a 15b muestran la correlación entre la razón de extracción iontoforética de manitol con respecto a sodio y [a] la concentración subdérmica de manitol y [b] la razón de concentraciones subdérmicas (manitol/sodio) a lo largo del periodo de 5 horas del experimento.

35 Los dos experimentos en este ejemplo muestran claramente que la extracción iontoforética inversa de una molécula neutra (manitol) mediante electroósmosis puede "calibrarse" mediante la utilización de un patrón interno iónico (Na⁺) que se mueve a través de la piel mediante electromigración.

40 La similitud molecular entre el manitol y la glucosa implica que puede utilizarse el mismo enfoque para la monitorización de la glucosa, tal como se demostrará en un ejemplo posterior.

Para ilustrar cómo funcionará esta técnica en la práctica, se consideran algunas situaciones prácticas utilizando la información y relaciones obtenidas a partir de los experimentos descritos anteriormente.

45 Se considera un paciente hipotético, cuya concentración de NaCl en plasma es de 133 mM, en el que se realiza un procedimiento iontoforético inverso.

Se supone que el análisis de las muestras extraídas indica que se extraen 14,26 nmoles de manitol y 10,14 μmoles de sodio a través de 1 cm² de piel en 1 hora.

50 La razón extraída (manitol/sodio) es de 1,4 x 10⁻³.

Ahora puede utilizarse esta información de diferentes maneras:

55 [a] Se supone, en este paciente hipotético, que el intervalo de concentración "normal" de manitol es de 80-100 mg/dl (o de 4,4 a 5,5 mM).

Tales valores corresponden a razones molares (manitol/sodio) de 33×10^{-3} y 41×10^{-3} en los fluidos subdérmicos, suponiendo una concentración de sodio constante de 133 mM.

5 Según los resultados *in vitro* (mediante sustitución en la ecuación de regresión de la figura 15a), una razón de extracción de $1,4 \times 10^{-3}$ indica que la concentración de manitol es sistémicamente de 2,8 mM, es decir, la razón de [manitol]/[sodio] subdérmica es de $20,7 \times 10^{-3}$ (figura 15b).

Por tanto, se concluirá que los niveles en plasma de manitol de este paciente eran demasiado bajos.

10 De hecho, los valores supuestos para este paciente hipotético corresponden a uno de los experimentos *in vitro* con una concentración de manitol subdérmica de 3 mM y una razón de [manitol]/[sodio] de $22,5 \times 10^{-3}$.

En otras palabras, hay un buen valor predictivo de las ecuaciones desarrolladas.

15 [b] Para las razones subdérmicas molares de 33×10^{-3} y 41×10^{-3} (límites inferior y superior del intervalo normal "hipotético" de manitol), pueden deducirse las razones de extracción por iontoforesis de $2,26 \times 10^{-3}$ y $2,82 \times 10^{-3}$, respectivamente.

20 Estos son exactamente los valores predichos mediante la ecuación de regresión en la figura 15b y por tanto pueden traducirse valores en plasma "reales", que delimitan el intervalo aceptable, en razones iontoforéticas extraídas.

Ahora puede concluirse que los niveles en plasma de manitol obtenidos de este paciente están fuera del intervalo normal: la razón de extracción de $1,4 \times 10^{-3}$, se encuentra más allá de los límites de $2,26 \times 10^{-3}$ y $2,82 \times 10^{-3}$.

25 Es importante además reiterar que las figuras 15a a 15b demuestran la determinación de las constantes K y K' necesarias para calcular una concentración absoluta de un analito en el sistema biológico a partir de la razón extraída del analito con respecto al patrón interno elegido.

30 En este ejemplo, el analito elegido (A) es manitol, mientras que el patrón interno (B) es Na^+ .

Por tanto, según la ecuación 1,

$$Q_{\text{man}}/Q_{\text{Na}^+} = K \cdot [\text{man}]/[\text{Na}^+]$$

35 K puede leerse a partir de la pendiente de la gráfica en la figura 15b; es decir, tras periodos de iontoforesis de entre 3 y 5 horas a $0,5 \text{ mA/cm}^2$, $K = 0,07$.

De manera similar, según la ecuación 2,

$$40 \quad Q_{\text{man}}/Q_{\text{Na}^+} = K' \cdot [\text{man}]$$

K' puede leerse a partir de la pendiente de la gráfica en la figura 15a y es igual a K dividida entre la concentración de Na^+ fija (133 mM) en el sistema biológico.

45 Tras periodos de iontoforesis de entre 3 y 5 horas a $0,5 \text{ mA/cm}^2$, $K' = 0,525 \times 10^{-3}$.

Se deduce que, una vez que se ha establecido el valor de K' para un par de sustancias particular, y dado que la concentración del patrón interno ([B]) en el sistema biológico es constante, entonces puede utilizarse la ecuación 2 para determinar la concentración del analito de interés ([A]) directamente a partir de la razón de extracción iontoforética Q_a/Q_b .

Ejemplo 4

55 Se sujetó piel de oreja de cerdo cortada con dermatomo entre las dos mitades de células de difusión adyacentes (área = $0,78 \text{ cm}^2$).

Se colocó el ánodo en la cámara subdérmica, "donadora", que contenía un tampón fisiológico de pH 7,4 (Tris/TrisHCl 25 mM + KCl 4 mM).

60 El analito de interés fue manitol e ión sodio fue el patrón interno elegido.

Durante el experimento se modificaron la concentración tanto del analito de interés como del patrón interno.

65 Las concentraciones de sodio y manitol fueron de 133 y 5 mM, respectivamente, durante las tres primeras horas.

Entonces, se cambiaron las concentraciones de sodio y manitol a 125 y 10 mM, respectivamente, durante un periodo posterior de una hora.

5 Entonces, se cambiaron las concentraciones de sodio y manitol a 145 y 3 mM, respectivamente, durante un periodo posterior de una hora.

Finalmente, se cambiaron las concentraciones de sodio y manitol a 133 y 5 mM, respectivamente, durante la última hora del experimento.

10 El intervalo de concentraciones de sodio elegido corresponde al que se produce normalmente en sujetos humanos.

En otras palabras, casi siempre habrá alguna ligera variación en la concentración de un patrón interno en el sistema biológico.

15 Por tanto, el objetivo de este experimento era someter a prueba si tal variabilidad típica tendría un impacto significativo sobre los resultados deducidos a partir de un procedimiento de iontoforesis inversa basándose en la invención dada a conocer.

20 Para facilitar la química analítica, se añadieron a las disoluciones donadoras cantidades conocidas de manitol marcado con ¹⁴C.

La cámara catódica (de recogida), que estaba en contacto con la superficie externa de la piel, contenía un tampón de Tris/TrisHCl 25 mM a pH 7,4.

25 En la figura 16 se muestra un esquema del experimento.

Se hizo pasar una corriente de 0,4 mA (0,5 mA/cm²) entre los electrodos de Ag/AgCl durante un total de 6 horas.

30 Durante el primer periodo de 3 horas, se retiró el contenido completo de la disolución de cátodo cada 60 minutos y volvió a llenarse la cámara con tampón reciente.

Durante el segundo periodo de 1 hora, se sustituyó la disolución donadora de manitol 5 mM/NaCl 133 mM por manitol 10 mM/NaCl 125 mM, y entonces se tomaron muestras de la cámara catódica cada 30 minutos.

35 Durante el tercer periodo de 1 hora, se sustituyó la disolución donadora por manitol 3 mM/NaCl 145 mM, y entonces se tomaron muestras de la cámara catódica cada 30 minutos.

Durante el periodo final de 1 hora, se sustituyó la disolución donadora por manitol 5 mM/NaCl 133 mM, y entonces se tomaron muestras de la cámara catódica cada 30 minutos.

40 Se cuantificaron el manitol y los iones sodio en cada muestra mediante recuento por centelleo líquido y mediante un electrodo específico de iones, respectivamente.

45 Las figuras 17a a 17b y la tabla X muestran los flujos de extracción y también la razón de flujos de extracción (manitol/sodio) a lo largo de las 6 horas de experimento.

Tabla X: flujos de extracción y razones de flujos extraídos (x10³) para manitol y Na⁺. Los valores son media ± desviación estándar.

Tiempo (min)	[Manitol]/[Na ⁺] (mM)	Razón de [manitol]/[Na ⁺] subdérmica (x10 ³)	Flujo de manitol (nmol.h ⁻¹ .cm ⁻²)	Flujo de sodio ⁺ (μmol.h ⁻¹ .cm ⁻²)	Razón de flujos extraídos (manitol/Na ⁺) (x10 ³)
60			9,7 ± 1,5	8,4 ± 0,8	1,2 ± 0,2
120	5/133	37,6	22,0 ± 1,6	10,7 ± 0,4	2,1 ± 0,1
180			28,8 ± 1,3	11,0 ± 0,3	2,6 ± 0,1
240			57,7 ± 4,2	11,7 ± 0,3	5,0 ± 0,4
240	10/125	80	52,2 ± 3,3	10,9 ± 0,8	4,9 ± 0,5
270			15,9 ± 0,7	10,4 ± 0,5	1,6 ± 0,1
300	3/145	20,7	15,3 ± 0,7	10,7 ± 0,4	1,4 ± 0,1
330			29,0 ± 0,8	11,2 ± 1,2	2,7 ± 0,1
360	5/133	37,6	29,3 ± 0,6	11,4 ± 0,3	2,6 ± 0,1

50 La figura 18 muestra la correlación entre la razón de extracción iontoforética de manitol con respecto a sodio y la concentración subdérmica de manitol a lo largo del periodo de 6 horas del experimento.

Este ejemplo muestra claramente que la extracción iontoforética inversa de una molécula neutra (manitol) mediante electroósmosis puede “calibrarse” mediante la utilización de un patrón interno iónico (Na^+) que se mueve a través de la piel mediante electromigración.

5 La similitud molecular entre el manitol y la glucosa implica que las mismas observaciones realizadas en este caso serán igualmente aplicables para la monitorización de la glucosa, tal como se demostrará en un ejemplo posterior.

Además, este ejemplo muestra que el procedimiento no se ve perjudicado por variaciones típicas en la concentración (en el sistema biológico) del patrón interno, en este caso iones sodio.

10 Para ilustrar cómo funcionará esta técnica en la práctica, se consideran algunas situaciones prácticas utilizando la información y las relaciones obtenidas de los experimentos descritos anteriormente.

15 Se considera un paciente hipotético en el que se realiza un procedimiento iontoforético inverso.

Se supone que el análisis de las muestras extraídas indica que se extraen 58 nmoles de manitol y 11,7 nmoles de sodio a través de 1 cm^2 de piel en 1 hora. La razón extraída (manitol/sodio) es de $4,97 \times 10^{-3}$.

Ahora puede utilizarse esta información de la siguiente manera:

20 [a] Se supone, en este paciente hipotético, que el intervalo “normal” para manitol es de 80-100 mg/dl (o de 4,4 a 5,5 mM) y que la concentración de sodio del paciente puede variar en el intervalo de 125-145 mM.

Por tanto, en este caso, no se suponen niveles constantes del patrón interno.

25 Según los resultados *in vitro* (mediante sustitución en la ecuación de regresión de la figura 18a) una razón de extracción de $4,97 \times 10^{-3}$ indica que la concentración de manitol es sistémicamente de 10 mM, es decir, se concluirá, por tanto, que los niveles en plasma de manitol de este paciente eran demasiado altos.

30 De hecho, los valores supuestos para este paciente hipotético corresponden a uno de los experimentos *in vitro* con una concentración de manitol subdérmica de 10 mM y una razón de $[\text{manitol}]/[\text{sodio}]$ de 80×10^{-3} .

En otras palabras, hay un buen valor predictivo de las ecuaciones desarrolladas.

35 [b] Para los límites inferior y superior (de 4,4 a 5,5 mM) del intervalo normal “hipotético” de manitol, pueden deducirse razones de extracción por iontoforesis de $2,2 \times 10^{-3}$ y $2,8 \times 10^{-3}$, respectivamente.

Estos son exactamente los valores predichos mediante la ecuación de regresión en la figura 18 y por tanto pueden traducirse valores en plasma “reales”, que delimitan el intervalo aceptable, en razones iontoforéticas extraídas.

40 Ahora puede concluirse que los niveles en plasma de manitol obtenidos de este paciente están fuera del intervalo normal: la razón de extracción de $4,97 \times 10^{-3}$ se encuentra más allá de los límites de $2,2 \times 10^{-3}$ y $2,8 \times 10^{-3}$.

45 Debe recordarse que puede utilizarse la figura 18 para demostrar la determinación de la constante K' necesaria para calcular una concentración absoluta de un analito en el sistema biológico a partir de la razón extraída del analito con respecto al patrón interno elegido.

Este procedimiento se describió utilizando los datos en el ejemplo anterior y las regresiones en las figuras 15a.

50 De manera interesante, la pendiente de regresión en la figura 18 está muy próxima a las de la figura 15a.

A partir de la figura 15a, se deduce que K' es de $0,525 \times 10^{-3}$; a partir de la figura 18, $K' = 0,487 \times 10^{-3}$.

55 En otras palabras, se deriva esencialmente el mismo parámetro de calibración a partir de los experimentos en este ejemplo en el que se permitió que la concentración del patrón interno variara a lo largo de un intervalo que puede observarse en un sistema biológico típico.

Por tanto, se concluye que el enfoque es robusto.

60 Ejemplo 5

Se sujetó piel de oreja de cerdo cortada con dermatomo entre las dos mitades de células de difusión adyacentes (área = $0,78 \text{ cm}^2$).

65 Se colocó el ánodo en la cámara subdérmica, “donadora”, que contenía un tampón fisiológico de pH 7,4 (Tris/TrisHCl 25 mM + NaCl 133 mM) a la que se le añadió el analito glucosa a una concentración de 10 mM.

Para facilitar la química analítica, se añadieron a las disoluciones donadoras cantidades conocidas de glucosa tritiada.

5 El ión sodio fue el patrón interno elegido.

La cámara catódica (de recogida), que estaba en contacto con la superficie externa de la piel, contenía un tampón de Tris/ TrisHCl 25 mM a pH 7,4.

10 El diseño experimental fue idéntico al de la figura 11, con la excepción de que glucosa con adición de cantidades conocidas de glucosa tritiada sustituyó a manitol con adición de cantidades conocidas de manitol marcado con ¹⁴C.

Se hizo pasar una corriente de 0,4 mA (0,5 mA/cm²) entre los electrodos de Ag/AgCl durante un total de 6 horas.

15 Durante este periodo, se retiró el contenido completo de la disolución de cátodo cada 60 minutos y volvió a llenarse la cámara con tampón reciente.

Se cuantificaron glucosa e iones sodio en cada muestra mediante recuento por centelleo líquido y mediante un electrodo específico de iones, respectivamente.

20 Las figuras 19 y 20 y la tabla XI muestran los flujos de glucosa y sodio y también la razón de flujos de extracción (glucosa/sodio) a lo largo de las 6 horas de experimento.

25 Tabla XI: flujos de extracción y razones de flujos extraídos (x10³) para glucosa y Na⁺. Los valores son media ± desviación estándar.

Tiempo (min)	[Glucosa] (mM)	Razón de [glucosa]/[Na ⁺] subdérmica (x10 ³)	Flujo de glucosa (nmol.h ⁻¹ .cm ⁻²)	Flujo de sodio ⁺ (μmol.h ⁻¹ .cm ⁻²)	Razón de flujos extraídos (glucosa/Na ⁺) (x10 ³)
60	10	75,2	24,1 ± 9,8	8,7 ± 0,6	2,7 ± 0,9
120			43,0 ± 12,6	9,8 ± 0,4	4,4 ± 1,1
180			50,1 ± 11,4	10,1 ± 0,3	4,9 ± 1,0
240			51,5 ± 10,4	10,0 ± 0,3	5,1 ± 0,9
300			57,3 ± 10,6	10,2 ± 0,3	5,6 ± 0,9
360			60,5 ± 10,8	10,2 ± 0,3	5,9 ± 0,9

30 Los datos son notablemente similares a los obtenidos en el experimento esencialmente idéntico descrito en el ejemplo 3 en el que se utilizó manitol en lugar de glucosa.

La comparación se realiza con los datos en la mitad inferior de la tabla VIII, y con los resultados gráficos en las figuras 12 y 13 en momentos tras 180 minutos.

35 Este ejemplo muestra claramente que la extracción iontoforética inversa de una molécula neutra (glucosa) mediante electroósmosis puede "calibrarse" mediante la utilización de un patrón interno iónico (Na⁺) que se mueve a través de la piel mediante electromigración.

Además, los resultados confirman que el manitol es un buen modelo para la glucosa y que el procedimiento puede aplicarse, por tanto, a aplicaciones de monitorización de la glucosa no invasivas.

40 **Ejemplo 6**

Se sujetó piel de oreja de cerdo cortada con dermatomo entre las dos mitades de células de difusión adyacentes (área = 0,78 cm²).

45 Se colocó el ánodo en la cámara subdérmica, "donadora", que contenía un tampón fisiológico de pH 7,4 (Tris/TrisHCl 25 mM + NaCl 133 mM) a la que se le añadieron los analitos tanto glucosa como manitol, en experimentos separados, cada uno de 6 horas de duración, a las siguientes concentraciones:

- 50 Glucosa, 3 mM; manitol, 7 mM - experimento A
- Glucosa, 5 mM; manitol, 5 mM - experimento B
- Glucosa, 7 mM, manitol, 3 mM - experimento C

55 Para facilitar la química analítica, se añadieron a las disoluciones donadoras cantidades conocidas de glucosa tritiada y manitol marcado con ¹⁴C.

El ión sodio fue el patrón interno elegido.

La cámara catódica (de recogida), que estaba en contacto con la superficie externa de la piel, contenía un tampón de Tris/ TrisHCl 25 mM a pH 7,4.

5 El diseño experimental fue idéntico al de la figura 11, con la excepción de que estaban presentes tanto glucosa tritiada como manitol marcado con ¹⁴C en la cámara de ánodo “donadora”.

Se hizo pasar una corriente de 0,4 mA (0,5 mA/cm²) entre los electrodos de Ag/AgCl durante un total de 6 horas.

10 Durante este periodo, se retiró el contenido completo de la disolución de cátodo cada 60 minutos y volvió a llenarse la cámara con tampón reciente.

Se cuantificaron glucosa y manitol en cada muestra mediante recuento por centelleo líquido; se cuantificó el sodio utilizando un electrodo específico de iones.

15 Las figuras 21a a 21c muestran los flujos de glucosa, manitol y sodio durante los periodos de 6 horas de los experimentos A, B y C, respectivamente.

20 Los datos muestran que los flujos de glucosa y manitol respondieron proporcionalmente a sus concentraciones subdérmicas.

El flujo de sodio fue constante, y presentaba el mismo valor absoluto, en cada uno de los experimentos A, B y C.

25 Las tablas XII, XIII y XIV muestran las razones de flujos extraídos (glucosa/sodio), (manitol/sodio) y (glucosa/manitol), en los experimentos A, B y C, respectivamente, a lo largo del periodo de 6 horas de esas mediciones.

Tabla XII: razones de flujos extraídos cuando las concentraciones subdérmicas de glucosa (G) y manitol (M) fueron de 3 mM y 7 mM, respectivamente (experimento A, ejemplo 6). Los valores son media ± desviación estándar.

30

Tiempo (minutos)	Razones de concentraciones subdérmicas			Razones de flujos extraídos		
	(10 ³ x) [G]/[Na ⁺]	(10 ³ x) [M]/[Na ⁺]	[glucosa]/[manitol]	(10 ³ x) G/Na ⁺	(10 ³ x) M/Na ⁺	G/M
60				0,85 ± 0,13	2,01 ± 0,33	0,42 ± 0,01
120				1,32 ± 0,09	3,21 ± 0,21	0,41 ± 0,01
180	22,5	52,6	0,43	1,50 ± 0,10	3,64 ± 0,31	0,41 ± 0,01
240				1,65 ± 0,09	3,98 ± 0,24	0,41 ± 0,00
300				1,79 ± 0,15	4,29 ± 0,40	0,42 ± 0,01
360				1,92 ± 0,10	4,65 ± 0,26	0,41 ± 0,00

Tabla XIII: razones de flujos extraídos cuando las concentraciones subdérmicas de glucosa (G) y manitol (M) fueron de 5 mM y 5 mM, respectivamente (experimento B, ejemplo 6). Los valores son media ± desviación estándar.

Tiempo (minutos)	Razones de concentraciones subdérmicas			Razones de flujos extraídos		
	(10 ³ x) [G]/[Na ⁺]	(10 ³ x) [M]/[Na ⁺]	[glucosa]/[manitol]	(10 ³ x) G/Na ⁺	(10 ³ x) M/Na ⁺	G/M
60				1,18 ± 0,54	1,29 ± 0,58	0,91 ± 0,02
120				1,97 ± 0,46	2,13 ± 0,47	0,92 ± 0,02
180	37,6	37,6	1,00	2,31 ± 0,39	2,53 ± 0,41	0,91 ± 0,03
240				2,50 ± 0,34	2,73 ± 0,38	0,92 ± 0,04
300				2,71 ± 0,36	2,98 ± 0,41	0,91 ± 0,02
360				2,91 ± 0,26	3,15 ± 0,30	0,92 ± 0,01

35 Tabla XIV: razones de flujos extraídos cuando las concentraciones subdérmicas de glucosa (G) y manitol (M) fueron de 7 mM y 3 mM, respectivamente (experimento C, ejemplo 6). Los valores son media ± desviación estándar.

Tiempo (minutos)	Razones de concentraciones subdérmicas			Razones de flujos extraídos		
	(10 ³ x) [G]/[Na ⁺]	(10 ³ x) [M]/[Na ⁺]	[glucosa]/[manitol]	(10 ³ x) G/Na ⁺	(10 ³ x) M/Na ⁺	G/M
60				1,79 ± 0,90	0,86 ± 0,45	2,09 ± 0,07
120				2,86 ± 0,87	1,38 ± 0,46	2,09 ± 0,06
180	52,6	22,5	2,33	3,35 ± 0,83	1,62 ± 0,44	2,08 ± 0,07
240				3,57 ± 0,71	1,71 ± 0,39	2,11 ± 0,08
300				3,77 ± 0,64	1,83 ± 0,40	2,08 ± 0,10
360				3,99 ± 0,59	1,94 ± 0,36	2,07 ± 0,08

40 La figura 22a muestra las correlaciones entre (a) la razón de extracción iontoforética de glucosa con respecto a

sodio y la concentración subdérmica de glucosa, y (b) la razón de extracción iontoforética de manitol con respecto a sodio y la concentración subdérmica de manitol, tras 6 horas de iontoforesis a $0,5 \text{ mA/cm}^2$.

5 La figura 22b muestra las correlaciones entre (a) la razón de extracción iontoforética de glucosa con respecto a sodio y la razón de concentraciones subdérmicas (glucosa/sodio), y (b) la razón de extracción iontoforética de manitol con respecto a sodio y la razón de concentraciones subdérmicas (manitol/sodio), tras 6 horas de iontoforesis a $0,5 \text{ mA/cm}^2$.

10 El solapamiento entre los resultados para glucosa y manitol, presentados en las figuras 22a a 22b, confirma el hecho de que el manitol puede actuar como modelo para el comportamiento de la glucosa en iontoforesis inversa.

15 Este punto se enfatiza en la figura 22c, que muestra la correlación casi perfecta entre la razón de extracción iontoforética de glucosa con respecto a manitol (tras 6 horas de iontoforesis a $0,5 \text{ mA/cm}^2$) y la razón de concentraciones subdérmicas (glucosa/manitol).

La pendiente de la línea de regresión está cerca de la unidad.

20 Por tanto, es probable que las conclusiones deducidas anteriormente basándose en datos de manitol también sean válidas para la glucosa.

Este ejemplo muestra claramente que la extracción iontoforética inversa de una molécula neutra (glucosa) mediante electroósmosis puede "calibrarse" mediante la utilización de un patrón interno iónico (Na^+) que se mueve a través de la piel mediante electromigración.

25 Además, los resultados confirman que el manitol es un buen modelo para la glucosa y que el procedimiento puede aplicarse, por tanto, a aplicaciones de monitorización de la glucosa no invasivas.

30 Para ilustrar cómo funcionará esta técnica en la práctica, se consideran algunas situaciones prácticas utilizando la información y las relaciones obtenidas de los experimentos descritos anteriormente.

Se considera un paciente hipotético, cuya concentración de NaCl en el plasma es de 133 mM , en el que se realiza un procedimiento iontoforético inverso.

35 Se supone que el análisis de muestras extraídas indica que se extraen 20 nmoles de glucosa y $10 \text{ } \mu\text{moles}$ de sodio a través de 1 cm^2 de piel en 1 hora.

La razón extraída (glucosa/sodio) es de 2×10^{-3} .

40 Ahora puede utilizarse esta información de la siguiente manera:

Se supone, en este paciente hipotético, que el nivel de glucosa por debajo del cual la hipoglucemia es una preocupación es de 80 mg/dl (es decir, $4,4 \text{ mM}$).

45 Este valor corresponde a una razón molar (glucosa/sodio) de 33×10^{-3} en los fluidos subdérmicos suponiendo una concentración de sodio constante de 133 mM .

50 Según los resultados *in vitro* (mediante sustitución en la ecuación de regresión de la figura 22a), una razón de extracción de 2×10^{-3} indica que la concentración de glucosa es sistémicamente de aproximadamente $3,3 \text{ mM}$, es decir, la razón de $[\text{glucosa}]/[\text{sodio}]$ subdérmica es de $24,8 \times 10^{-3}$ (figura 22b).

Se concluirá, por tanto, que los niveles de glucosa en plasma de este paciente eran demasiado bajos.

55 De hecho, los valores supuestos para este paciente hipotético corresponden estrechamente a uno de los experimentos *in vitro* con una concentración de glucosa subdérmica de 3 mM y una razón de $[\text{manitol}]/[\text{sodio}]$ de $22,5 \times 10^{-3}$.

En otras palabras, hay un buen valor predictivo de las ecuaciones desarrolladas.

60 Puede realizarse un ejercicio similar, evidentemente, para un paciente que experimenta hiperglucemia (es decir, niveles de glucosa en plasma por encima de un determinado límite superior).

65 Es importante además reiterar que las figuras 22a a 22b demuestran la determinación de las constantes K y K' necesarias para calcular una concentración absoluta de un analito en el sistema biológico a partir de la razón extraída del analito con respecto al patrón interno elegido.

En este ejemplo, el analito elegido (A) es glucosa, mientras que el patrón interno (B) es Na^+ .

Por tanto, según la ecuación 1,

$$Q_{\text{glu}}/Q_{\text{Na}^+} = K \cdot [\text{glu}]/[\text{Na}^+]$$

5 K puede leerse a partir de la pendiente de la gráfica en la figura 22b; es decir, tras un periodo de iontoforesis de 6 horas a $0,5 \text{ mA/cm}^2$, $K = 0,076$.

Merece la pena destacar que el valor correspondiente para manitol, en este ejemplo, es de 0,078.

10 De manera similar, según la ecuación 2,

$$Q_{\text{glu}}/Q_{\text{Na}^+} = K' \cdot [\text{glu}]$$

15 K' puede leerse a partir de la pendiente de la gráfica en la figura 22a y es igual a K dividida entre la concentración de Na^+ fija (133 mM) en el sistema biológico.

Tras un periodo de iontoforesis de 6 horas a $0,5 \text{ mA/cm}^2$, $K' = 0,572 \times 10^{-3}$.

20 Obsérvese que el valor correspondiente para manitol, en este ejemplo, es de $0,586 \times 10^{-3}$.

Se deduce que, una vez que se ha establecido el valor de K' para un par de sustancias particular, y dado que la concentración del patrón interno ($[B]$) en el sistema biológico es constante, entonces puede utilizarse la ecuación 2 para determinar la concentración del analito de interés ($[A]$) directamente a partir de la razón de extracción iontoforética Q_a/Q_b .

Finalmente, la linealidad de la relación establecida mediante los datos en la figura 22c indica la posibilidad de utilizar una molécula no cargada como patrón interno para un analito que tampoco está cargado.

30 Ejemplo 7

Se realizó una serie de experimentos *in vitro* en células de difusión por iontoforesis diseñadas específicamente (Laboratory Glass Apparatus, Berkeley, California, EE.UU.) tal como se representa en la figura 23.

35 La disolución subdérmica (donadora) fue un tampón de pH 7,4 (Hepes 25 mM + NaCl 133 mM) al que se le añadió el analito de interés, el fármaco antimaniaco litio (como la sal de cloruro) a una de 3 concentraciones diferentes: 1,37 mM, 0,86 mM, 0,45 mM.

El ión sodio fue el patrón interno elegido.

40 Las cámaras anódica y catódica estaban en contacto con la superficie externa de la piel y contenían los medios receptores (de recogida), respectivamente, NaCl 133 mM + Hepes 25 mM y KCl 10 mM + Hepes 25 mM (ambos tamponados a pH 7,4).

45 Se sujetó piel de oreja de cerdo de grosor completo entre las dos mitades de la célula de iontoforesis y se llenó cada cámara con la disolución apropiada.

En la figura 23 se muestra un esquema del experimento.

50 Se hizo pasar una corriente de 0,4 mA ($0,5 \text{ mA/cm}^2$) entre electrodos de plata-cloruro de plata, (Ag/AgCl), insertados en las cámaras anódica y catódica, durante un total de 5 horas.

Cada hora, se retiró el contenido completo de la disolución de cátodo y volvió a llenarse la cámara con tampón reciente.

55 Se analizaron todas las muestras para detectar litio mediante espectroscopía de absorción atómica y para detectar sodio utilizando un electrodo selectivo de iones.

Se realizaron tres repeticiones para cada concentración de litio.

60 Las figuras 24a a 24b muestran (a) los flujos de extracción de litio y sodio, y (b) las razones de flujos de extracción (litio/sodio), a lo largo de las 5 horas de experimento, para cada concentración de litio subdérmica considerada.

65 La tabla XV también presenta las razones de flujos extraídos (litio/sodio), como función del tiempo, para cada una de las diferentes razones de concentraciones subdérmicas (litio/sodio) consideradas.

Las figuras 25a a 25b muestran la correlación entre la razón de extracción iontoforética de litio con respecto a sodio y [a] la concentración subdérmica de litio, y [b] la razón de concentraciones subdérmicas (litio/sodio) a lo largo del periodo de 5 horas del experimento.

5 Tabla XV: razones de flujos extraídos ($\times 10^3$) para iones litio y sodio. Los valores son media \pm desviación estándar.

Tiempo (min)	$(10^3 \times)$ Razón de flujos extraídos (litio/ Na^+)		
	$(10^3 \times)$ Razón de $[\text{litio}]/[\text{Na}^+]$ subdérmica		
	3,4	6,5	10,3
60	$0,71 \pm 0,28$	$1,48 \pm 0,41$	$2,28 \pm 0,43$
120	$1,38 \pm 0,19$	$2,65 \pm 0,55$	$4,45 \pm 0,64$
180	$1,54 \pm 0,20$	$3,13 \pm 0,78$	$5,25 \pm 0,48$
240	$1,80 \pm 0,03$	$2,79 \pm 0,35$	$5,64 \pm 0,52$
300	$1,62 \pm 0,03$	$3,13 \pm 0,51$	$5,45 \pm 0,36$

Para ilustrar cómo funcionará esta técnica en la práctica, se consideran algunas situaciones prácticas utilizando la información y las relaciones obtenidas a partir de los experimentos descritos anteriormente.

10 Se considera un paciente que toma litio, cuya concentración de sodio en plasma es de 133 mM, y en el que se realiza un procedimiento iontoforético inverso.

15 Se supone que el análisis de muestras extraídas indica que la razón extraída (litio/sodio) es de 1×10^{-3} .

Ahora puede utilizarse esta información de la siguiente manera:

Se supone un intervalo terapéutico para el litio de 0,5-1,4 mM.

20 Tales valores corresponden a razones molares (litio/sodio) de $3,76 \times 10^{-3}$ y $10,5 \times 10^{-3}$ en los fluidos subdérmicos.

Según los resultados *in vitro* (mediante sustitución en la ecuación de regresión obtenida a las 5 horas, figura 25b), una razón de extracción de 1×10^{-3} indica que la razón de $[\text{litio}]/[\text{sodio}]$ subdérmica es inferior a 3×10^{-3} , es decir, que la concentración de litio subdérmica es inferior a 0,4 mM.

25 Se concluirá, por tanto, que los niveles de litio en plasma de este paciente eran demasiado bajos y estaban fuera del intervalo terapéutico.

30 Es importante además reiterar que las figuras 25a a 25b demuestran la determinación de las constantes K y K' necesarias para calcular una concentración absoluta de un analito en el sistema biológico a partir de la razón extraída del analito con respecto al patrón interno elegido.

En este ejemplo, el analito elegido (A) es litio, mientras que el patrón interno (B) es sodio.

35 Por tanto, según la ecuación 1,

$$Q_{\text{Li}}/Q_{\text{Na}^+} = K \cdot [\text{Li}]/[\text{Na}^+]$$

40 K es la pendiente de la gráfica en la figura 25b; es decir, tras un periodo corto (5 horas) de iontoforesis a $0,5 \text{ mA/cm}^2$, $K = 0,56$.

De manera similar, según la ecuación 2,

$$Q_{\text{Li}}/Q_{\text{Na}} = K' \cdot [\text{Li}]$$

45 K' es la pendiente de la gráfica en la figura 25a y es igual a K dividida entre la concentración de sodio fija (133 mM) en el sistema biológico.

Tras un periodo corto (5 horas) de iontoforesis a $0,5 \text{ mA/cm}^2$, $K' = 4,18 \times 10^{-3}$.

50 Se deduce que, una vez que se ha establecido el valor de K' para un par de sustancias particular, y dado que la concentración del patrón interno ([B]) en el sistema biológico es constante, entonces puede utilizarse la ecuación 2 para determinar la concentración del analito de interés ([A]) directamente a partir de la razón de extracción iontoforética Q_a/Q_b .

55 Ejemplo 8

Se fijaron dos células de vidrio cilíndricas (área = 2 cm^2) a la superficie ventral del antebrazo de un voluntario sano.

La distancia entre las cámaras fue de aproximadamente 8 cm.

Se colocó el ánodo en una de las células, que se llenó con una disolución que contenía un tampón de Tris 10 mM pH 8,5 + NaCl 100 mM.

5 La otra cámara (de recogida) contenía el cátodo sumergido en un tampón de Tris 10 mM a pH 8,5.

Se conectaron los dos electrodos a una fuente de alimentación (Phoresor II Auto, Iomed, EE.UU.) y se hizo pasar una corriente de 0,6 mA (0,3 mA/cm²) entre ellas durante un total de 5,5 horas.

10 Se retiró el contenido completo de la disolución de cátodo cada 15 minutos y entonces volvió a llenarse la cámara con tampón reciente.

15 A partir del séptimo periodo de recogida, se midió la concentración de azúcar en sangre del voluntario al comienzo de cada intervalo iontoforético. Se extrajo una gotita de sangre capilar de la punta del dedo y se analizó para detectar glucosa con el monitor Glucotrend 2 (Roche Diagnostics, Suiza).

20 Se analizó la glucosa en cada muestra iontoforética mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperimétrica pulsada. Se analizaron iones sodio mediante un ensayo enzimático de β-galactosidasa.

25 La figura 26 muestra los resultados obtenidos. Las concentraciones de glucosa en sangre mostradas corresponden al promedio de los valores medidos al comienzo y al final de cada periodo de extracción iontoforética. El flujo de glucosa extraído iontoforéticamente imitaba muy estrechamente los cambios de azúcar en sangre, aumentando y después disminuyendo posteriormente tras la ingestión de comida. Por otro lado, el flujo de extracción de Na⁺ permaneció eficazmente constante a lo largo de todo el periodo del experimento, reflejando el hecho de que la concentración sistémica de Na⁺ es bastante invariable en un ser humano vivo.

30 A partir de los datos en la figura 26, puede deducirse que la razón del flujo extraído de glucosa dividido entre el de Na⁺ dependía linealmente tanto de la concentración en sangre de glucosa (C_{glu}):

$$J_{glu}/J_{Na^+} = 0,001 * C_{glu} - (1,6 \times 10^{-4}); r = 0,87$$

35 como de la razón de las concentraciones en sangre de glucosa y Na⁺ (C_{glu}/C_{Na+}):

$$J_{glu}/J_{Na^+} = 0,13 * (C_{glu}/C_{Na+}) + (7,2 \times 10^{-5}); r = 0,87$$

Por tanto, los datos ilustran *in vivo*, en el ser humano, las principales características de la invención dada a conocer.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para determinar de forma no invasiva los niveles relativos de dos sustancias presentes en un sistema biológico, comprendiendo dicho procedimiento:
- poner en contacto una cámara anódica (1) y una cámara catódica (3) de un dispositivo iontoforético que comprende unos electrodos reversibles (5, 6) con un sistema biológico (8);
 - 10 - extraer mediante iontoforesis inversa sustancias cargadas y no cargadas de dicho sistema biológico, y recoger dichas sustancias cargadas y no cargadas cada una independientemente en el interior de la cámara anódica (1) o la cámara catódica (3);
 - 15 - analizar la cantidad recogida de una primera sustancia extraída y una segunda sustancia extraída; en el que dicha primera y segunda sustancias se seleccionan, de tal manera que el número de transporte y/o transferencia de la primera sustancia sea independiente del número de transporte y/o transferencia de la segunda sustancia;
 - 20 - posteriormente, determinar la razón de extracción de la primera sustancia con respecto a la segunda sustancia para determinar sus niveles relativos en el sistema biológico.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los electrodos (5, 6) del dispositivo iontoforético son electrodos de plata/cloruro de plata.
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la primera sustancia analizada y la segunda sustancia analizada están contenidas en la misma cámara.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el sistema biológico es un cuerpo humano.
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la densidad de corriente aplicada mediante el dispositivo iontoforético durante la extracción iontoforética no es superior a $0,5 \text{ mA/cm}^2$.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la determinación de la razón de extracción de la primera sustancia con respecto a la segunda sustancia se realiza calculando la razón de la cantidad recogida de la primera sustancia extraída con respecto a la cantidad recogida de la segunda sustancia extraída.
- 35 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la determinación de la razón de extracción de la primera sustancia con respecto a la segunda sustancia se realiza calculando, en primer lugar, el flujo de la primera sustancia extraída y el flujo de la segunda sustancia, basándose en la cantidad extraída de la primera sustancia y la cantidad extraída de la segunda sustancia, respectivamente, y a continuación, calculando la razón del flujo de la primera sustancia extraída con respecto al flujo de la segunda sustancia extraída.
- 40 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el análisis de las dos sustancias seleccionadas se realiza mediante técnicas que implican enzimas o biosensores, química selectiva de iones o medición de conductividad.
- 45 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la primera y segunda sustancias analizadas son susceptibles de cambios en su concentración en el sistema biológico.
- 50 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la primera sustancia analizada es susceptible de cambios en su concentración en el sistema biológico y la segunda sustancia analizada presenta una concentración sustancialmente constante en el sistema biológico.
- 55 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la primera sustancia es glucosa.
12. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la primera sustancia es litio.
13. Procedimiento según la reivindicación 11 ó 12, en el que la segunda sustancia es sodio.
- 60 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la polaridad del electrodo se invierte tras cada ciclo de extracción/análisis.

Figura 1

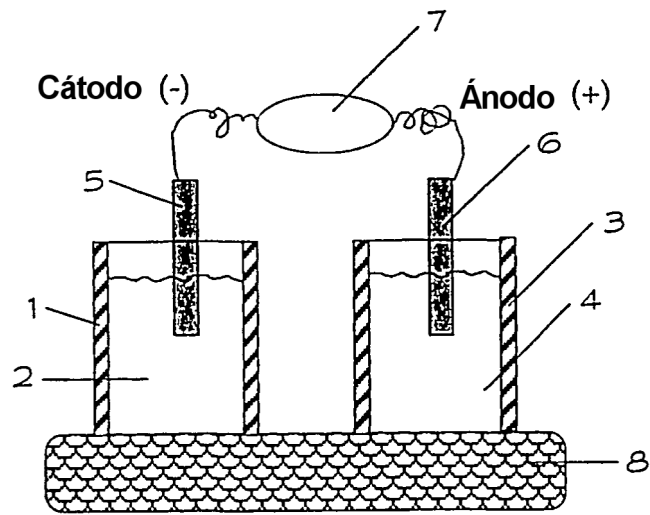


Figura 2

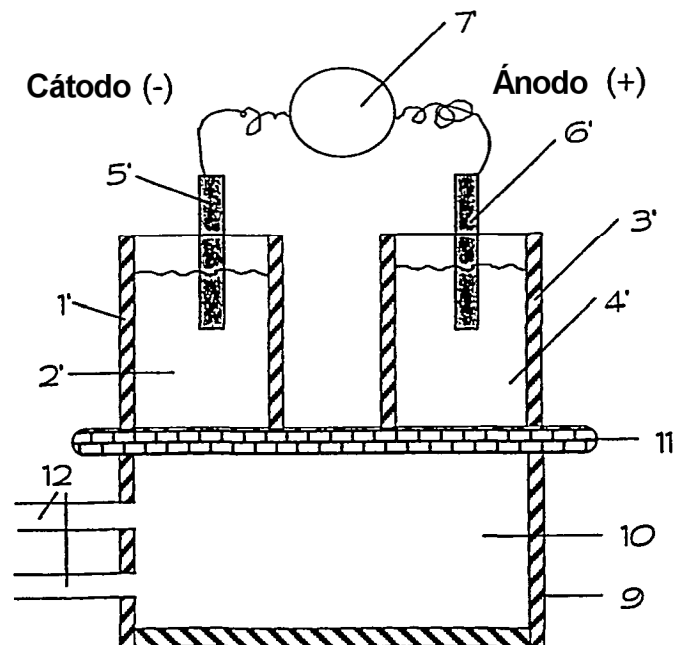
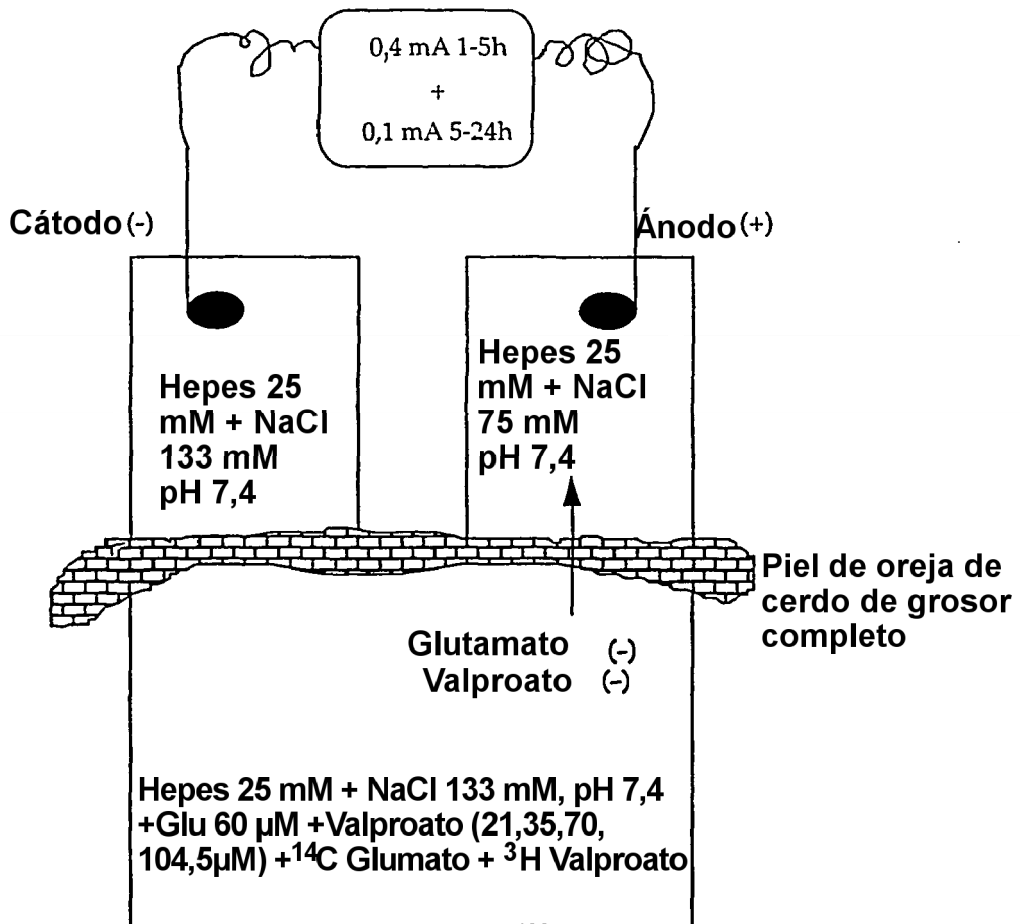


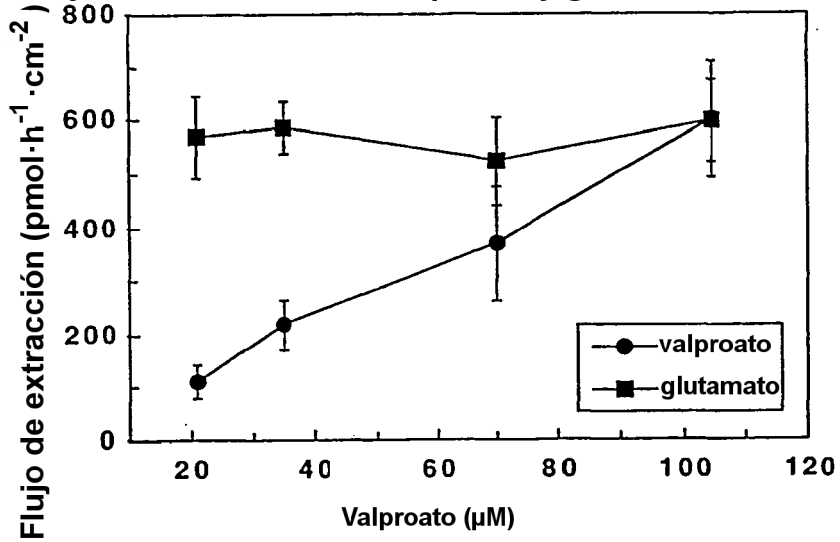
Figura 3

Toma de muestras iontoforética
combinada de glutamato y valproato
[Valproato] = de 21 μ M a 104,5 μ M



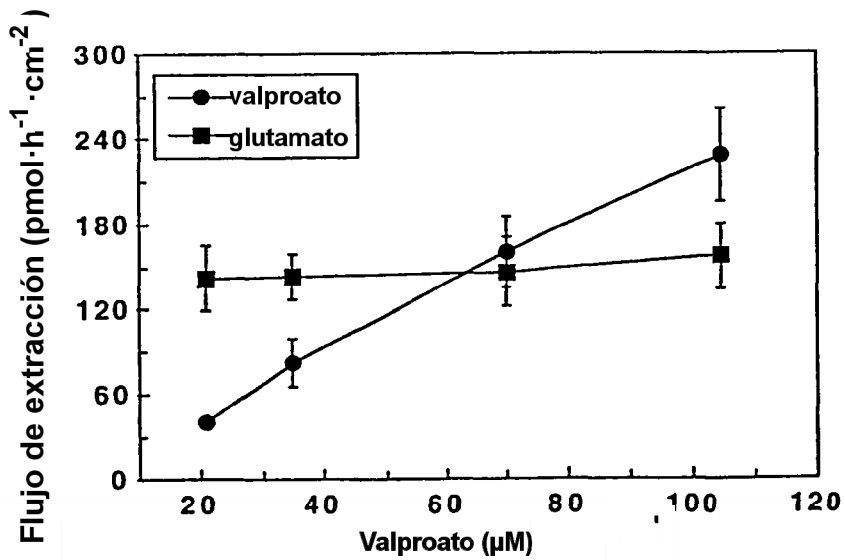
Figuras 4a-b

Flujos de extracción de valproato y glutamato a las 5 horas



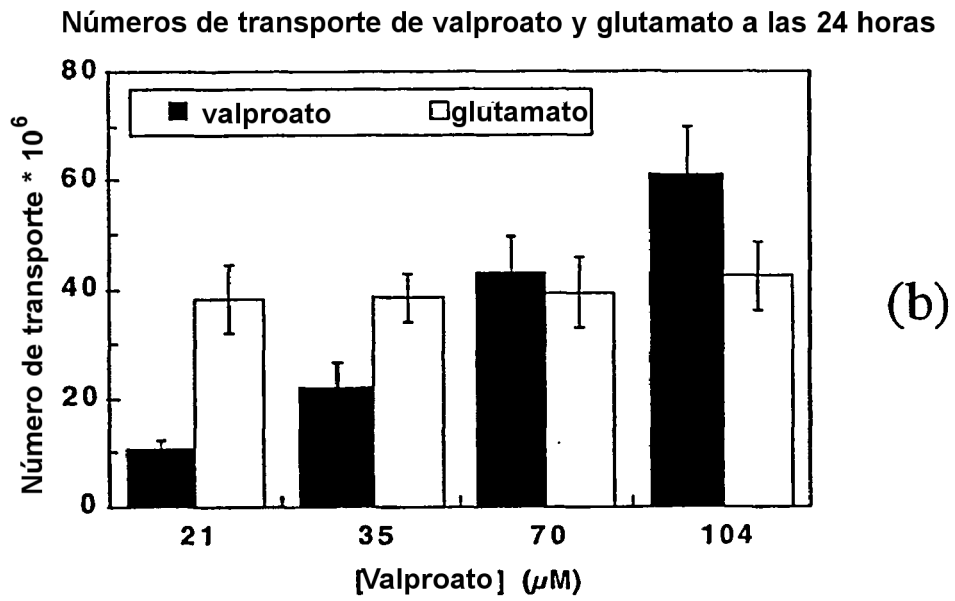
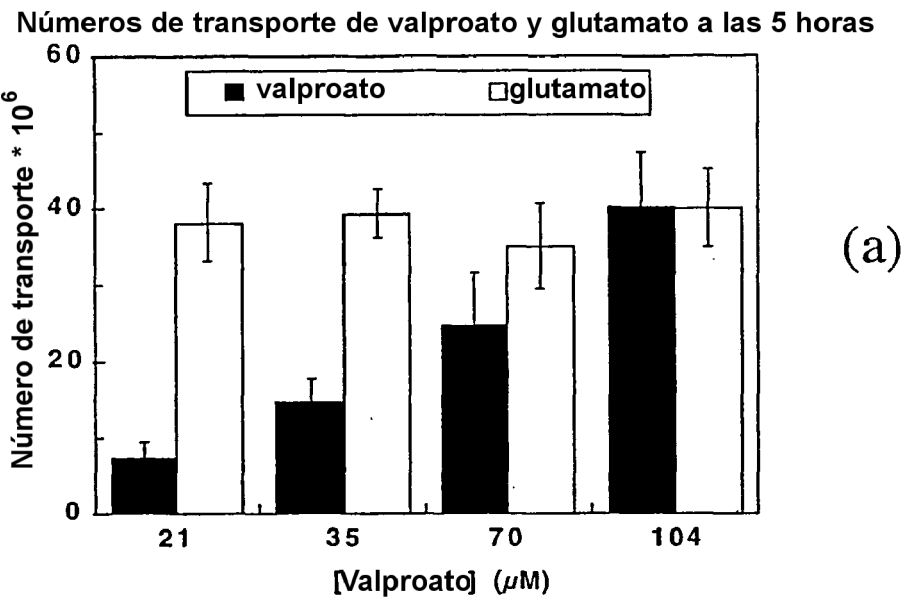
(a)

Flujos de extracción de valproato y glutamato a las 24 horas

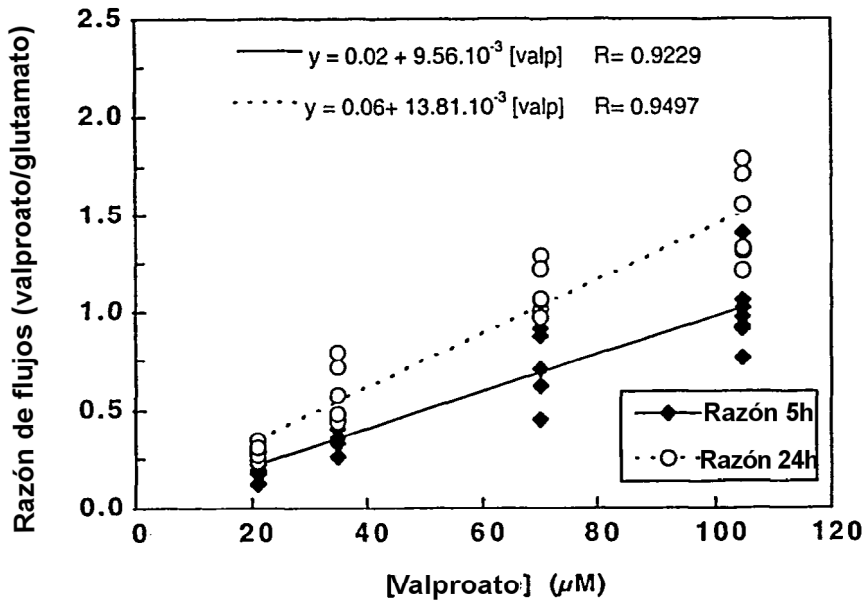


(b)

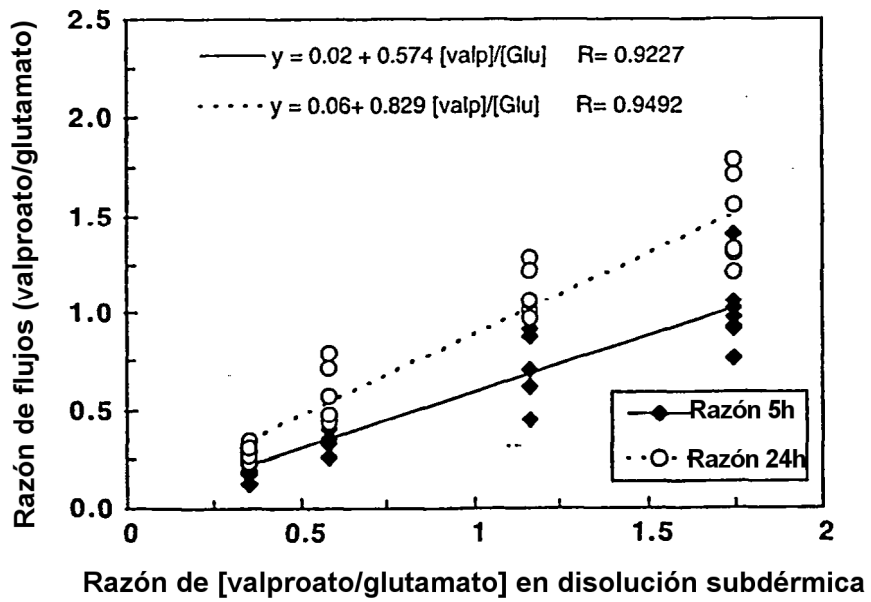
Figuras 5a-b



Figuras 6a-b



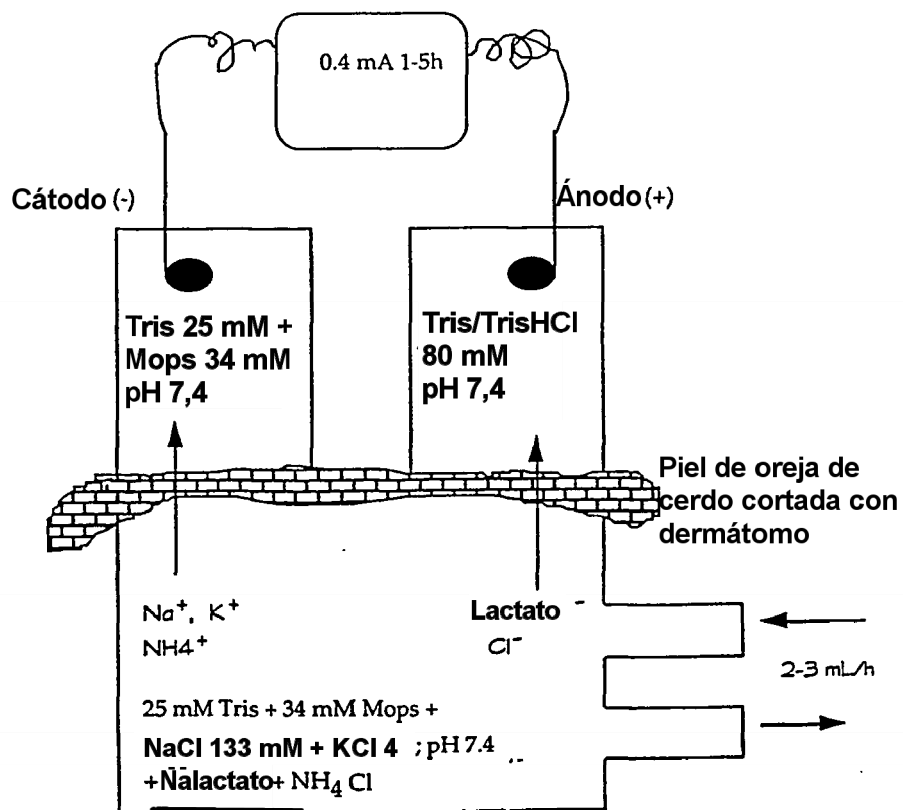
(a)



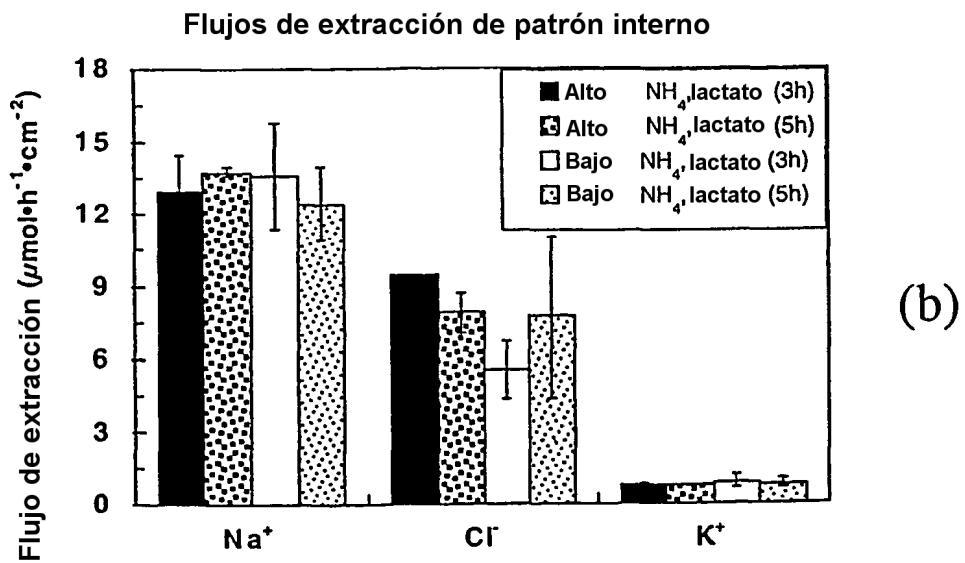
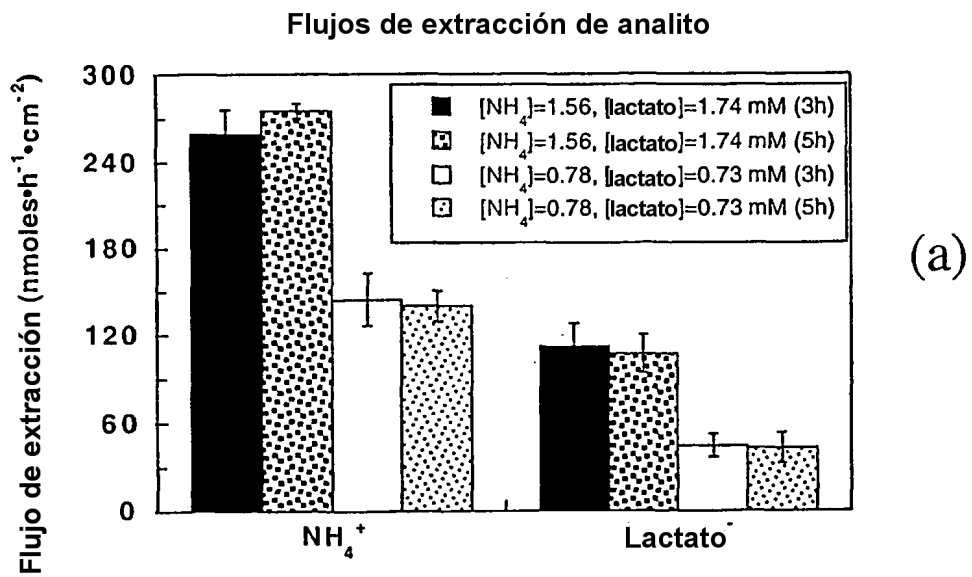
(b)

Figura 7

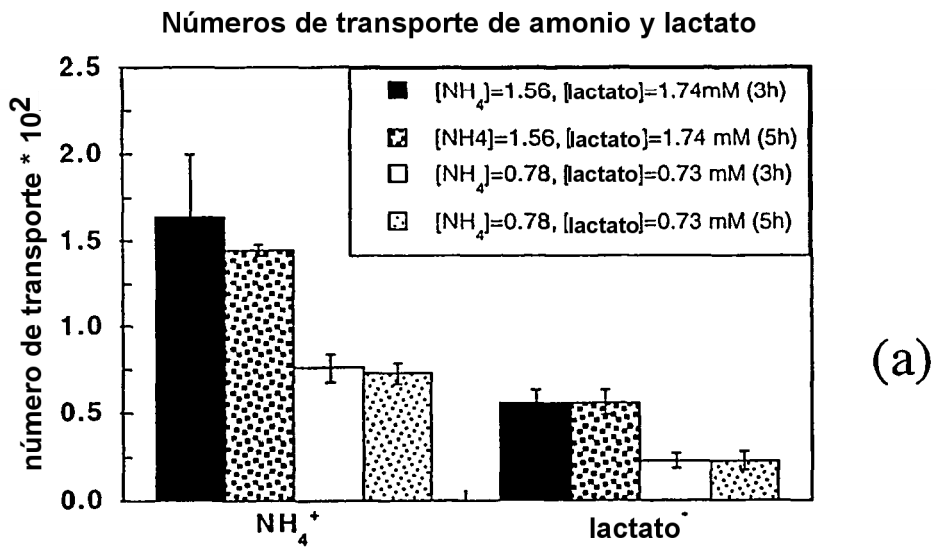
Toma de muestras iontoforética combinada de lactato, amonio, K^+ , Na^+ y Cl^-



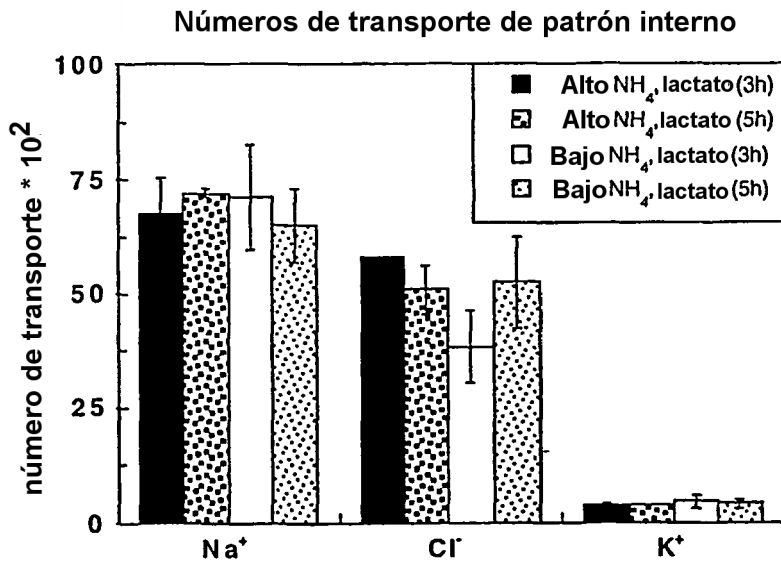
Figuras 8a-b



Figuras 9a-b

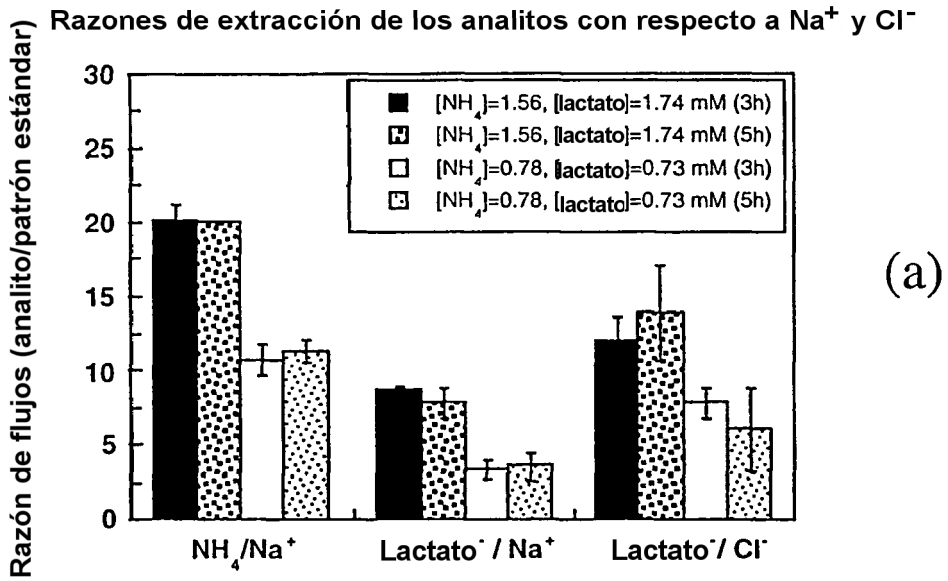


(a)

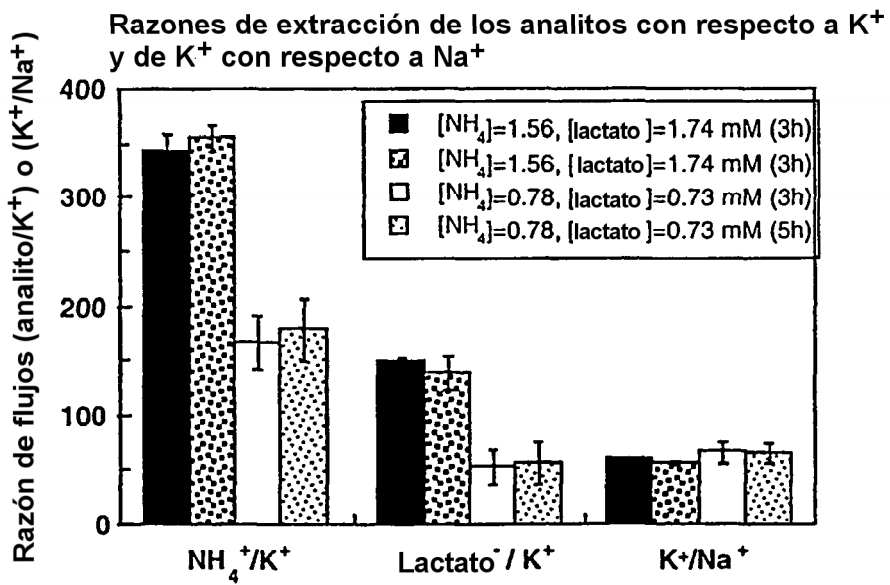


(b)

Figuras 10a-b



(a)



(b)

Figura 11

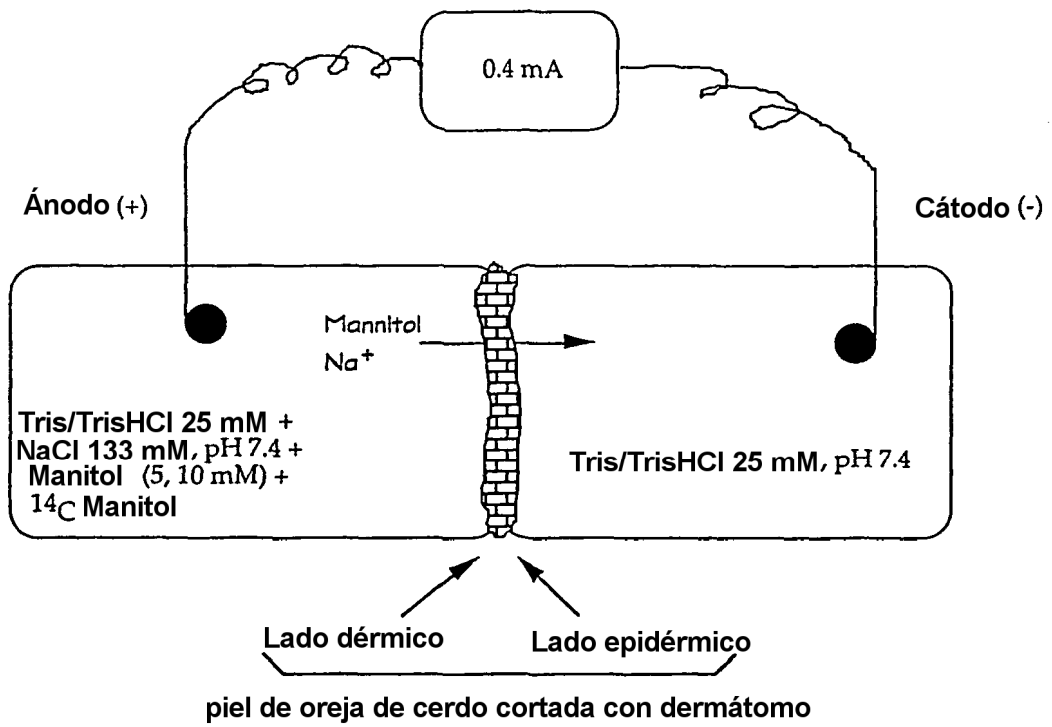


Figura 12

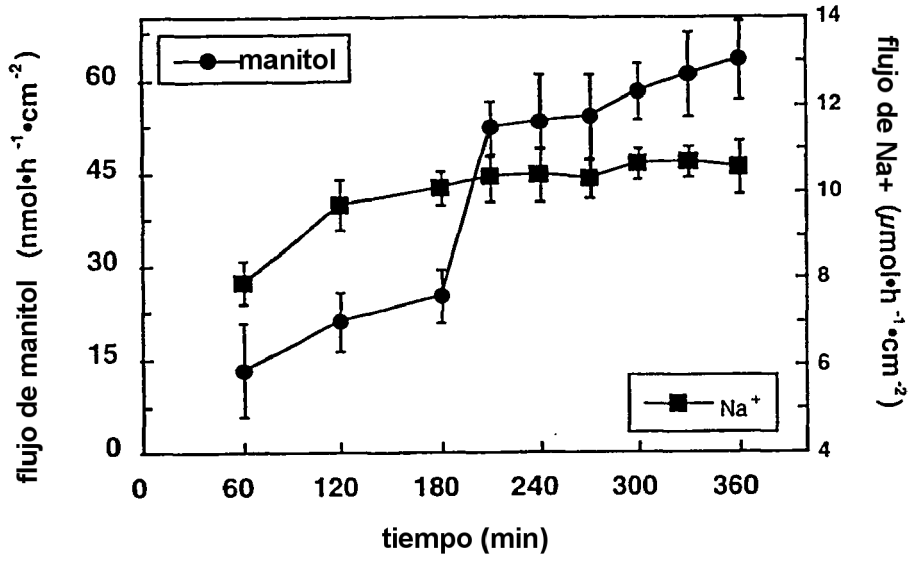
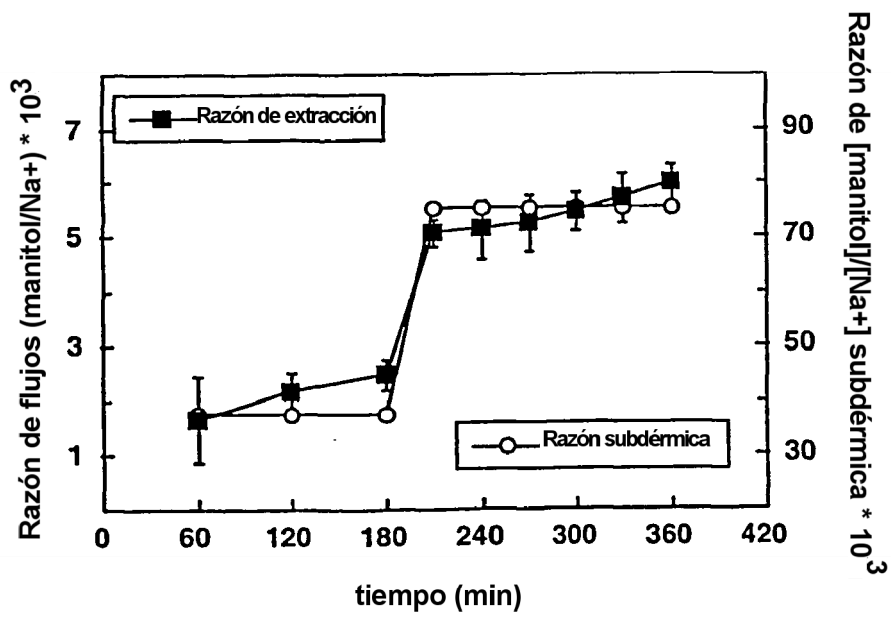
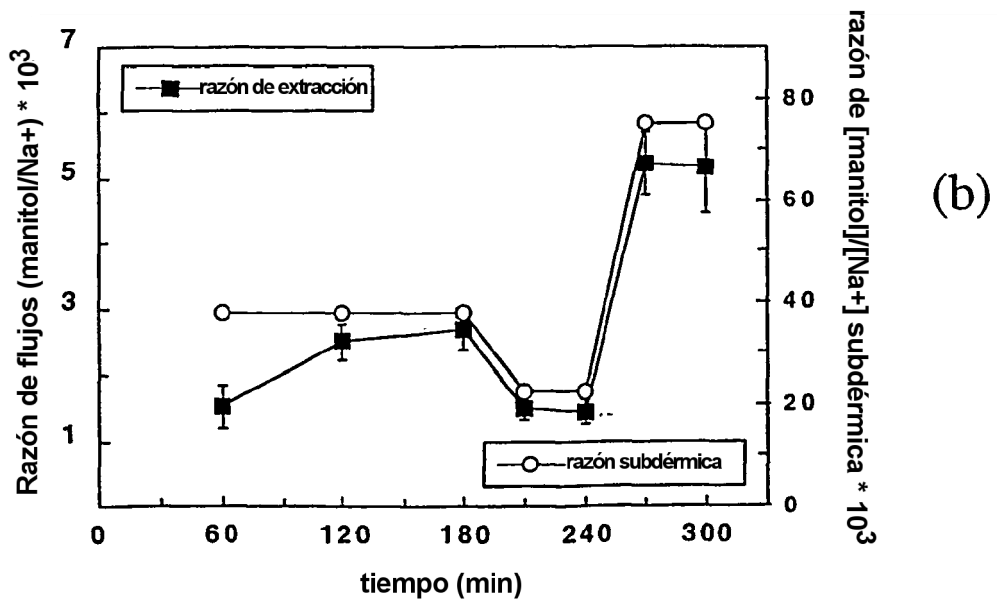
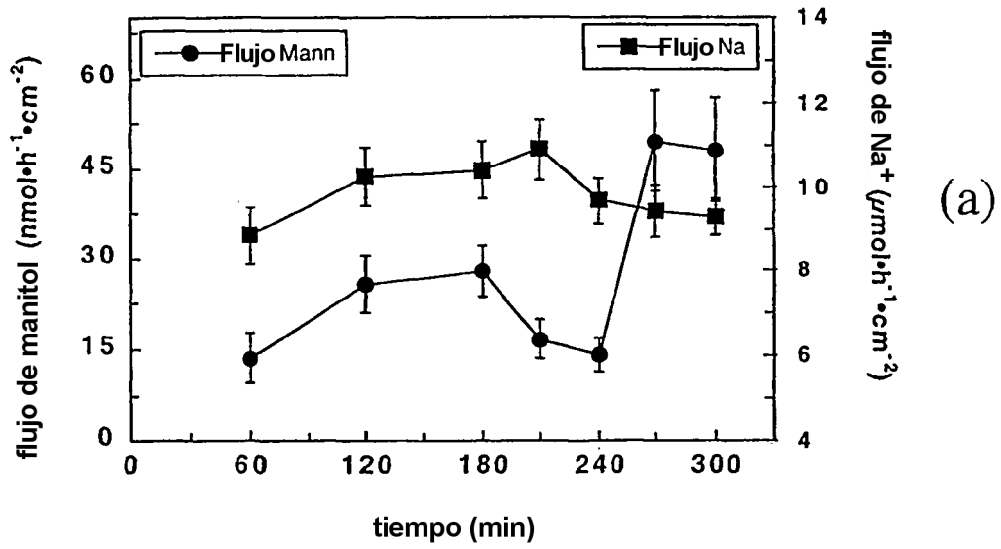


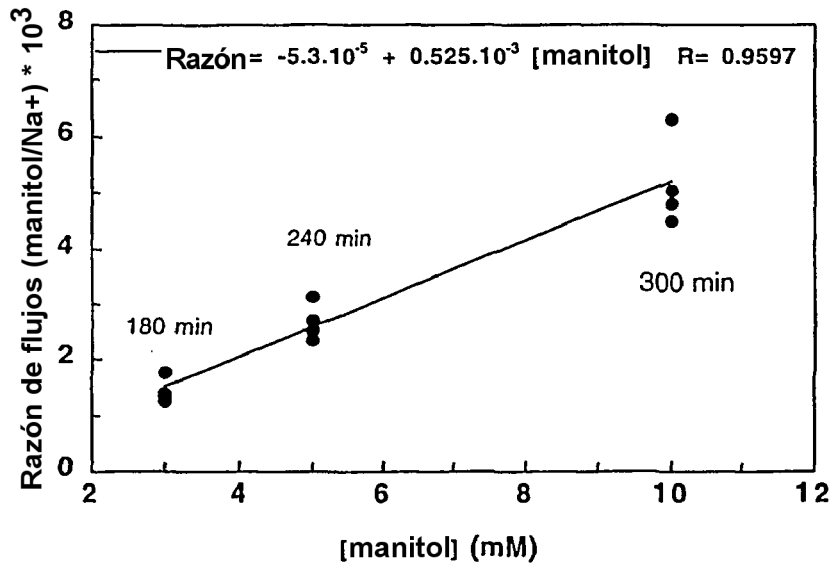
Figura 13



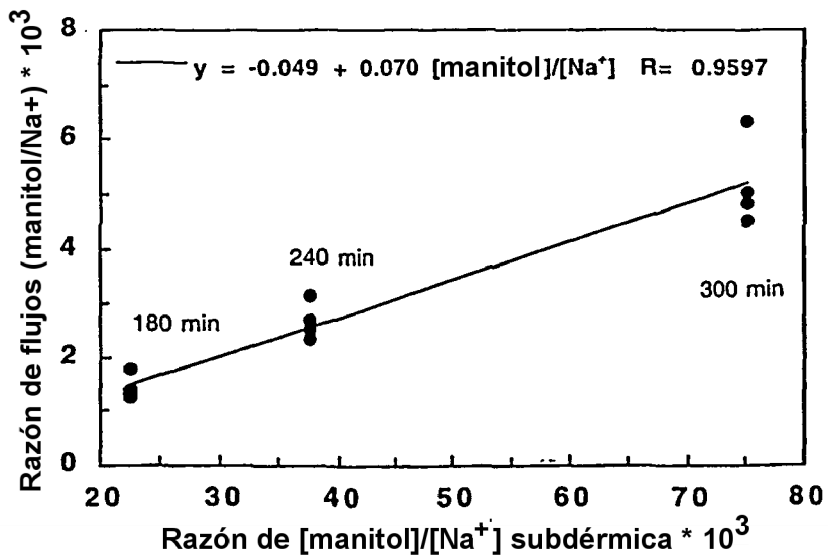
Figuras 14a-b



Figuras 15a-b



(a)



(b)

Figura 16

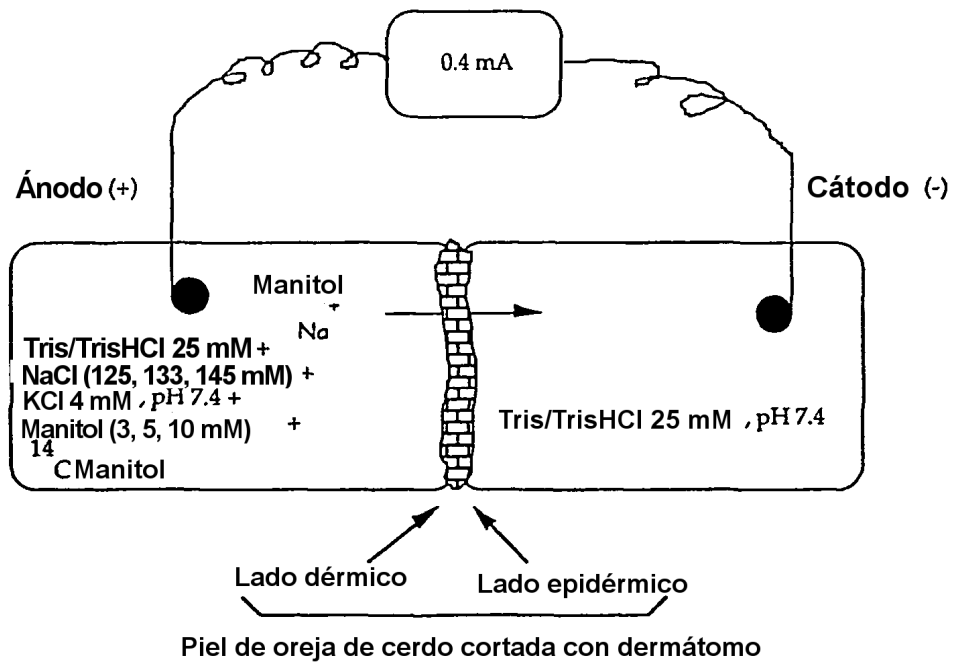


Figura 17a-b

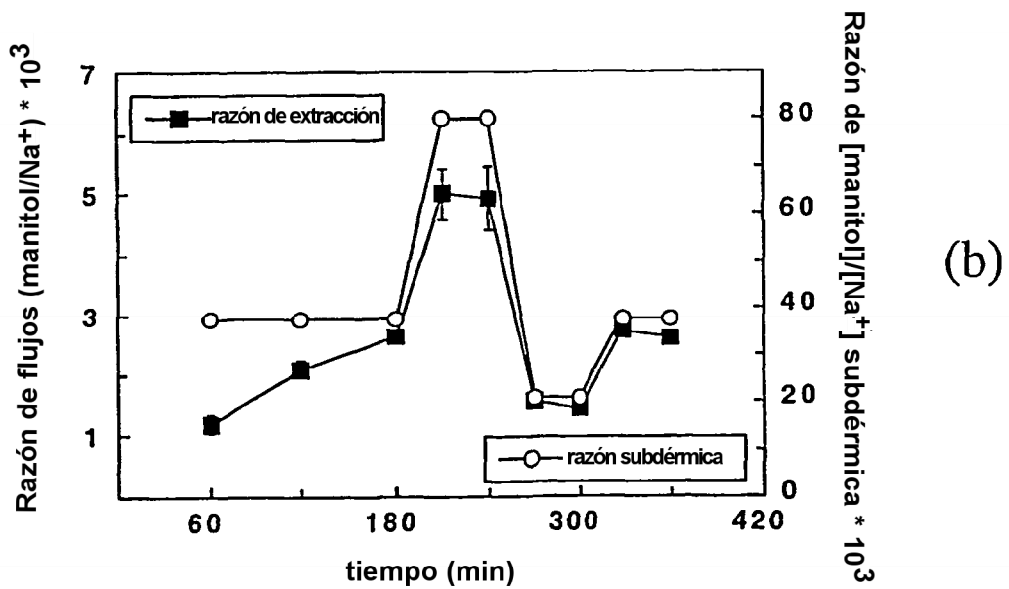
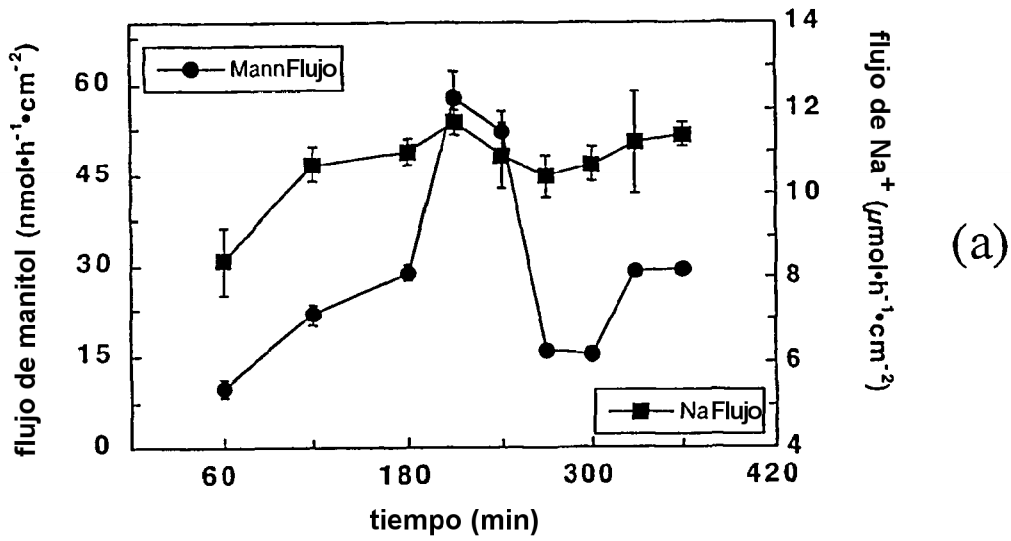


Figura 18

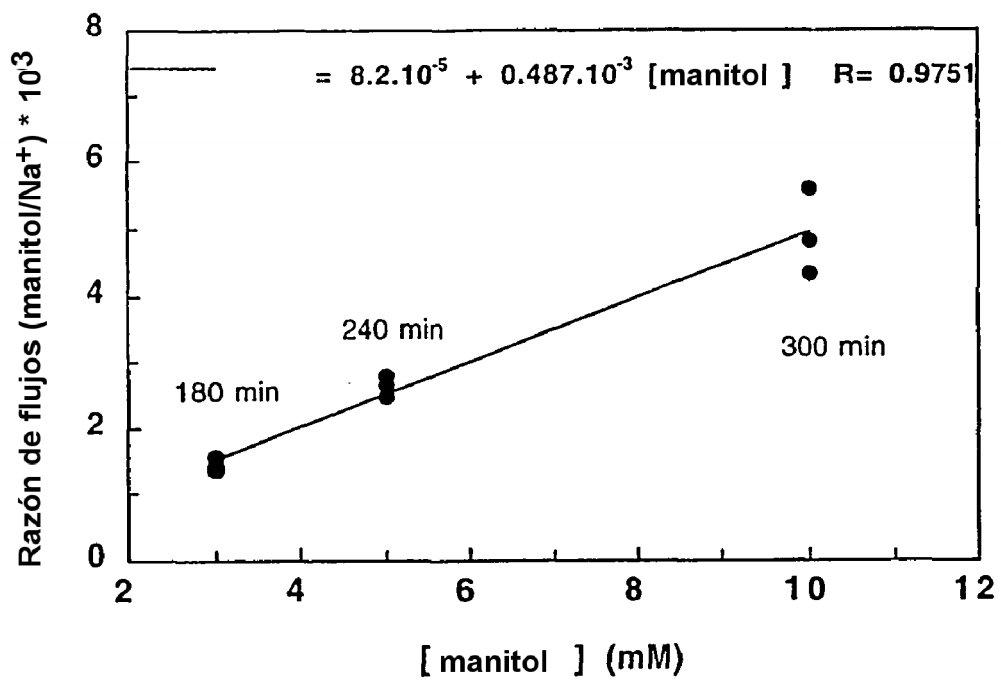


Figura 19

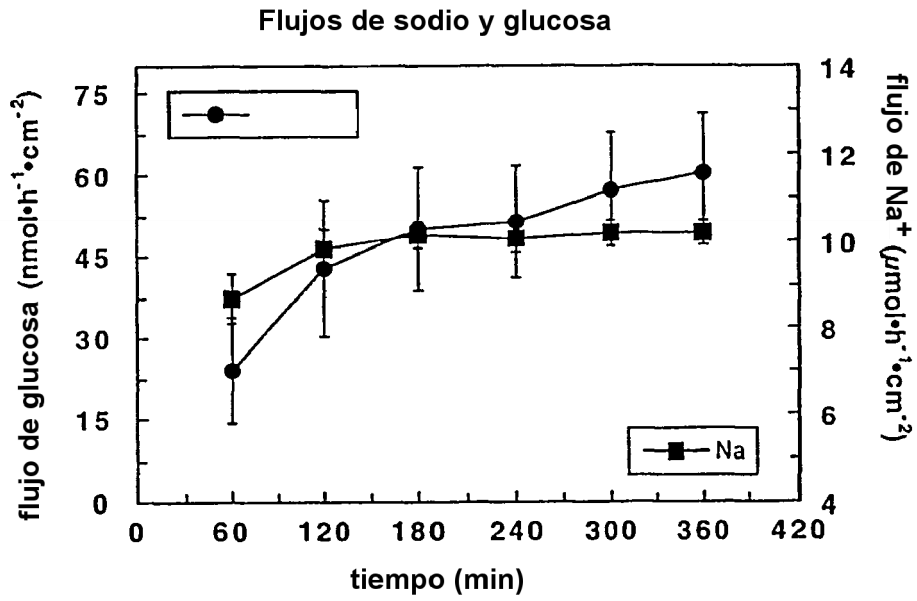


Figura 20

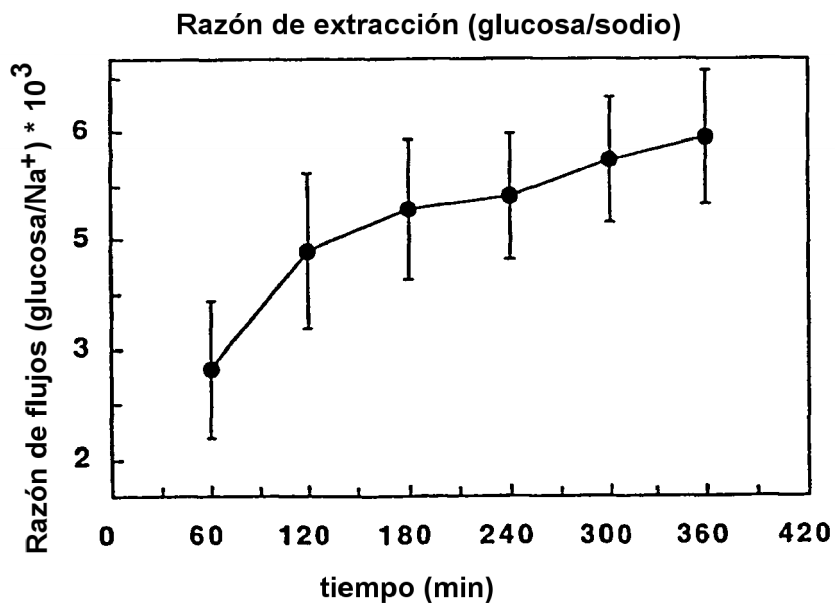


Figura 21a-c

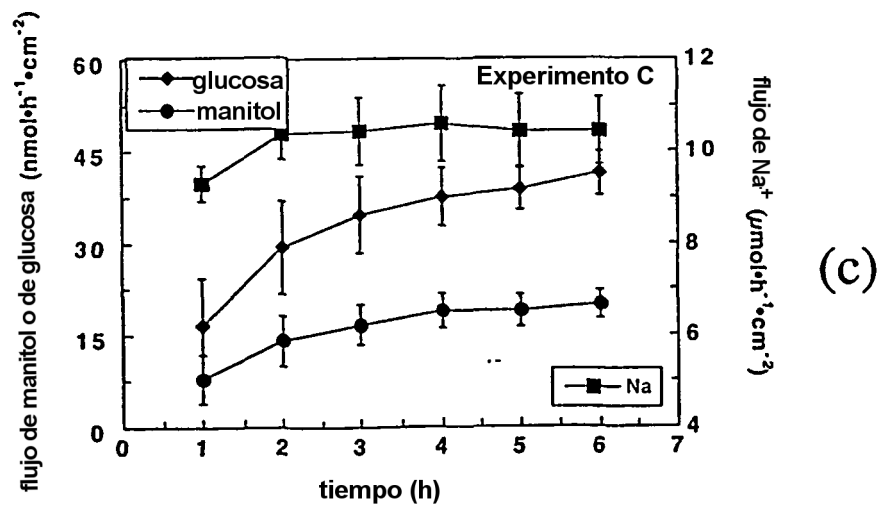
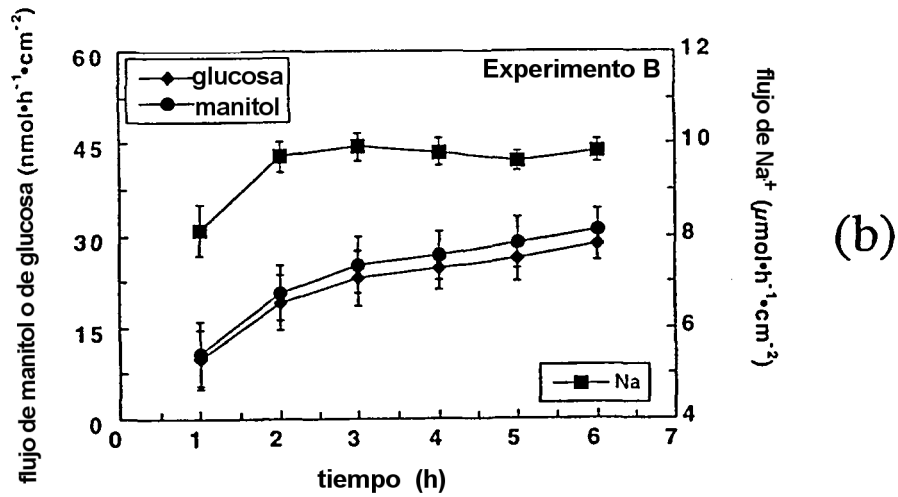
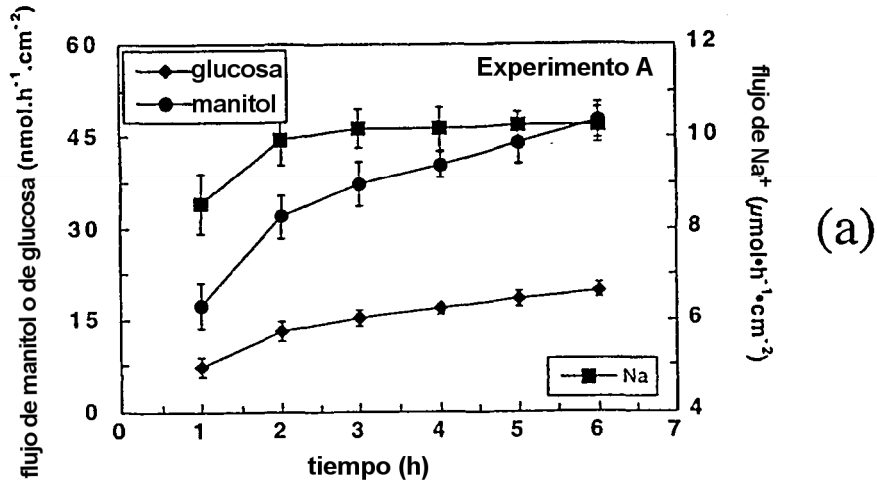
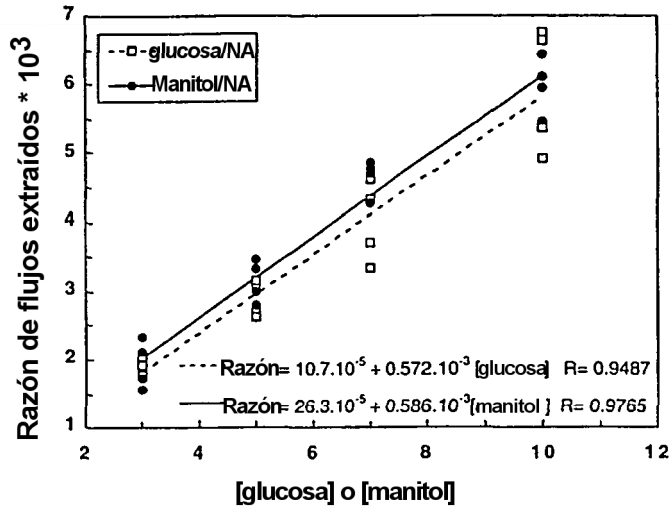
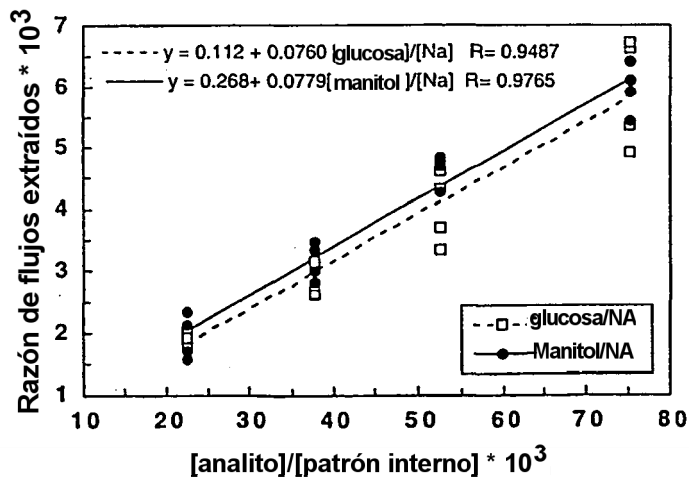


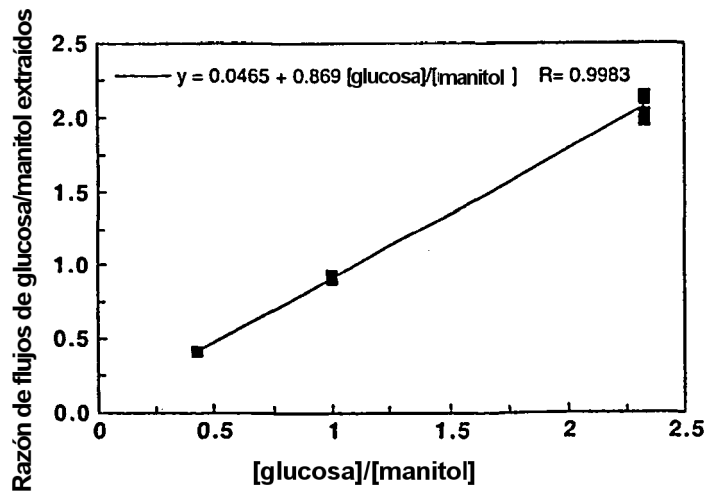
Figura 22a-c



(a)



(b)



(c)

Figura 23

**Toma de muestras iontoforética
combinada de litio y sodio**

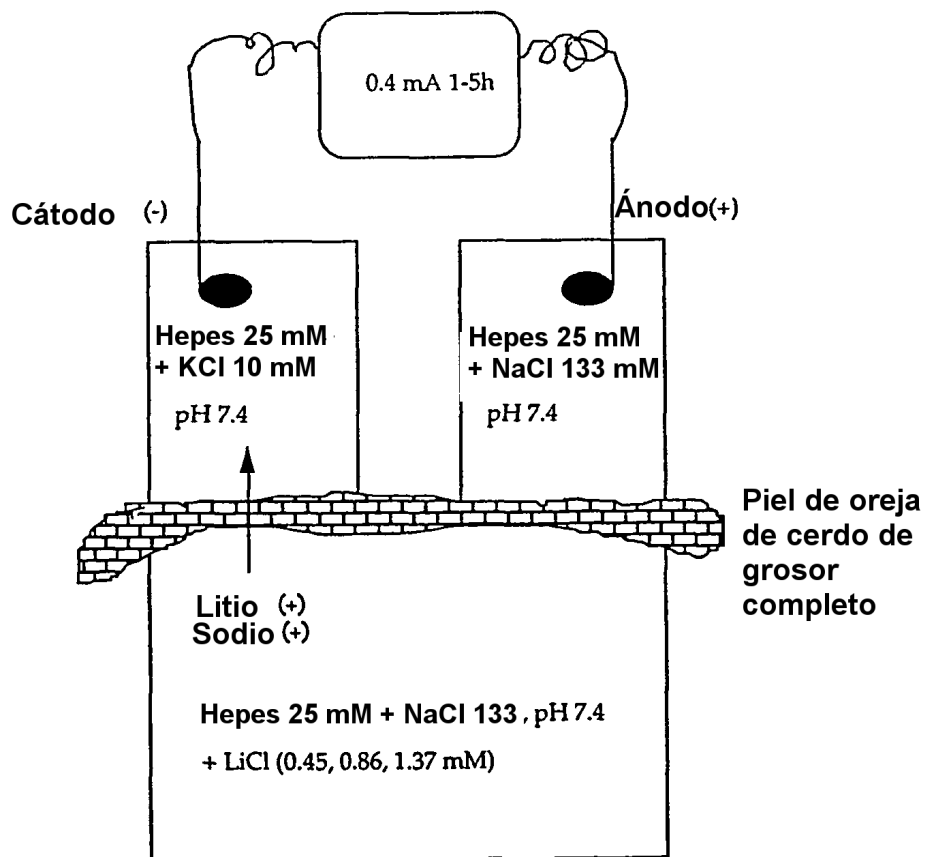


Figura 24a-b

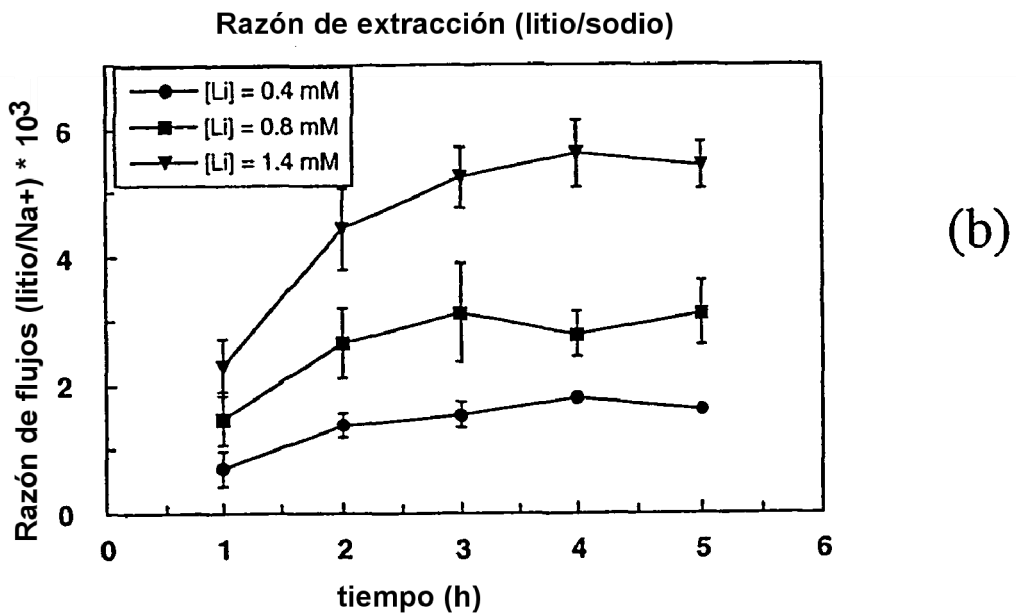
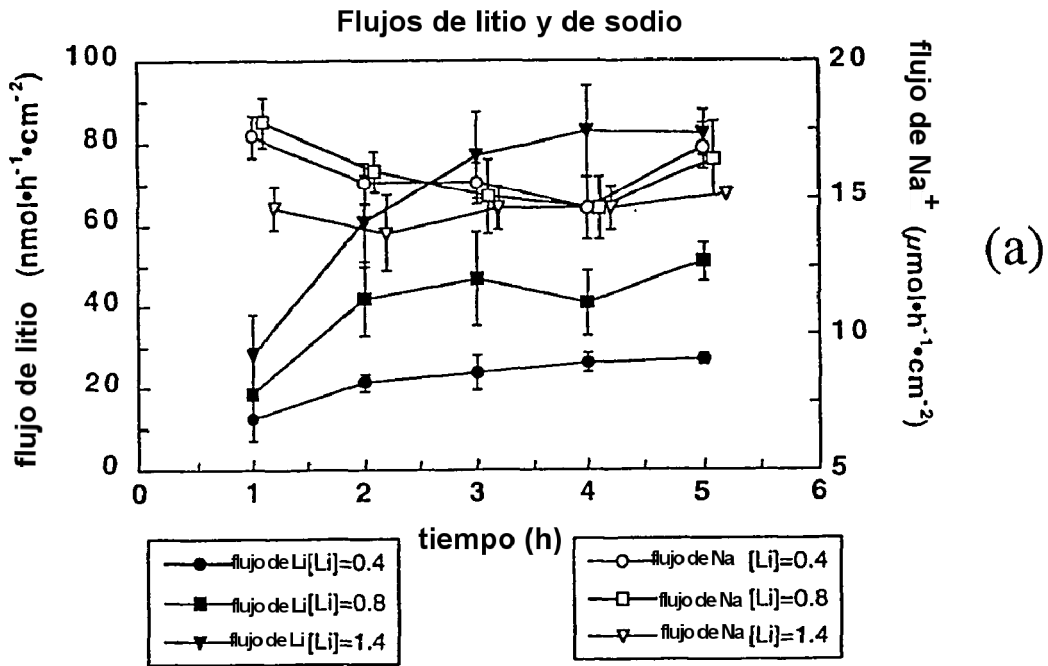
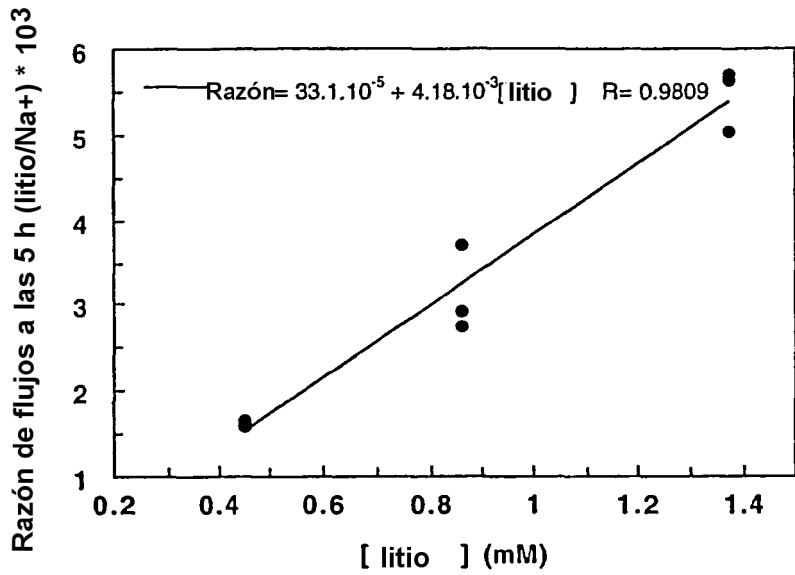
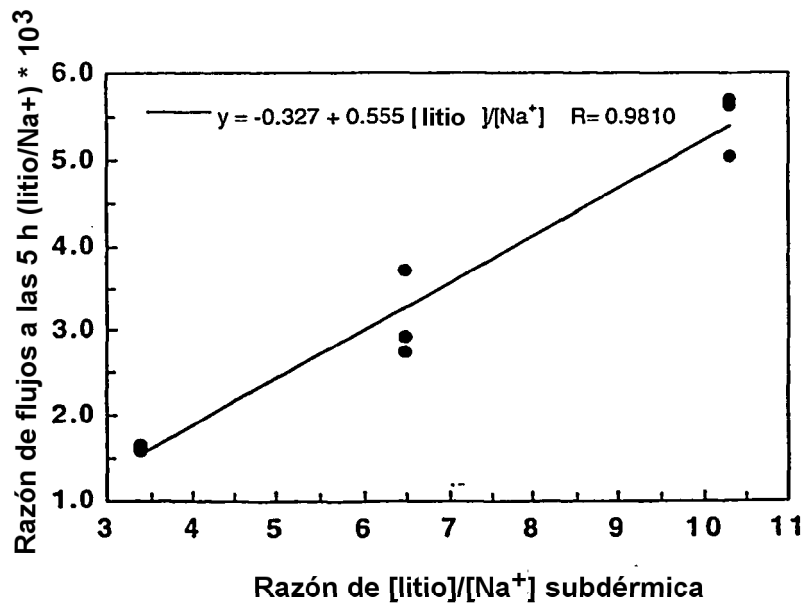


Figura 25a-b



(a)



(b)

Figura 26

