

## NUEVAS ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA LA MONITORIZACIÓN DE QUIMIOTERÁPICOS EN MUESTRAS DE INTERÉS CLÍNICO

Sergio Fernández-Trujillo, Gregorio Castañeda-Peñalvo, Juana Rodríguez-Flores

Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas,  
Universidad de Castilla-La Mancha, 13005, Ciudad Real, España

Sergio.Fernandez@uclm.es – Analytical-Nano-Group – <http://saman.uclm.es>

### 1. Introducción

El tratamiento contra el cáncer produce diversos efectos secundarios que pueden ir relacionados con la dosis de los quimioterápicos utilizados y pueden variar de una persona a otra, incluso recibiendo la misma dosis en el tratamiento. Por ello, la seguridad sigue siendo un motivo de preocupación a la hora de usar este tipo de fármacos ya que se requiere una vigilancia del paciente oncológico en caso de que se produzca una toxicidad inaceptable y sea necesaria una reducción de la dosis o una interrupción temporal o definitiva del tratamiento en cuestión. Sería de gran utilidad poder realizar un tratamiento personalizado a cada paciente, con el fin de poder mitigar este tipo de efectos adversos. Desde la Química Analítica y con ayuda de la Nanociencia y Nanotecnología existe la posibilidad de desarrollar estrategias innovadoras basadas en el empleo de técnicas híbridas (electroforéticas, cromatográficas y electroquímicas) que proporcionen información sobre la monitorización de agentes anticancerígenos en muestras clínicas de pacientes de una manera sencilla y rentable en laboratorios de rutina y/o clínicos para que la dosificación pueda ajustarse de forma rápida y segura a cada uno de ellos [1-3]. En este sentido, estas metodologías analíticas podrían servir como herramientas en el ámbito médico para controlar la disponibilidad de estos fármacos en el organismo realizando así una medicina personalizada a pacientes oncológicos, siendo éste, uno de los objetivos principales de la línea de investigación “*Contribuciones analíticas en el ámbito clínico y/o biomédico*”. A continuación, se presentarán diferentes artículos publicados en los últimos años correspondientes a cada uno de estos bloques o métodos analíticos.

### 2. Métodos electroforéticos

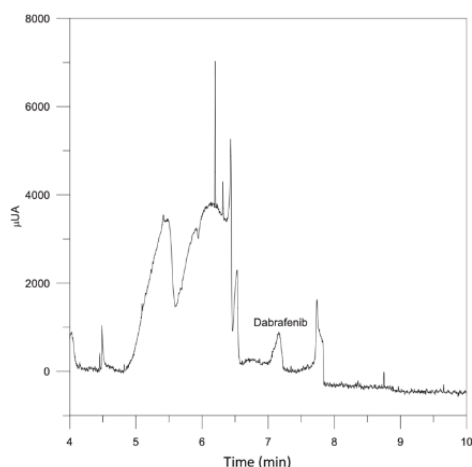
La electroforesis capilar es una técnica de separación de compuestos basada en las diferentes velocidades de migración que se observan en estos cuando se encuentran en un medio acuoso dentro de un capilar y se someten a la acción de un campo eléctrico. Esta velocidad va a depender de su carga eléctrica, tamaño, y de la presencia y magnitud del flujo electro-osmótico. Este último aparece al aplicar un voltaje a un sistema líquido que está en contacto con una

superficie cargada. Puede ir acoplada a diferentes sistemas de detección, tales como fluorescencia directa/indirecta/inducida por láser, amperométrico, espectrometría de masas, quimioluminiscencia, conductimétrico o ultravioleta-visible, siendo este último uno de los más utilizados. Su elección dependerá de las propiedades de los analitos a determinar. Sin embargo, en los detectores espectrofotométricos, el hecho de que la longitud del paso óptico de la celda sea aproximadamente el diámetro interno del capilar, limita mucho la sensibilidad de la técnica. Esta técnica dispone de una amplia variedad de modalidades de separación, tales como la electroforesis capilar de zona, la cromatografía electrocinética micelar, la electroforesis capilar en gel, la isotacoforesis capilar y la electrocromatografía capilar.

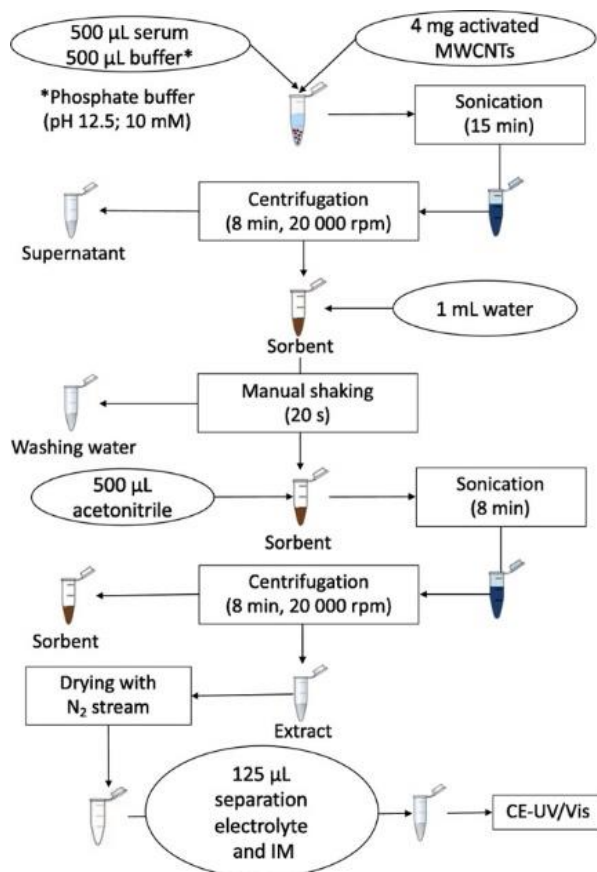
En cuanto a trabajos utilizando este tipo de técnica, dos nuevas metodologías analíticas para la monitorización de dabrafenib (DB, potente inhibidor de la tirosina quinasa disponible por vía oral) en muestras clínicas complejas como son la orina y suero humano fueron desarrolladas empleando cromatografía electrocinética micelar con detección UV-vis a niveles de  $\mu\text{g mL}^{-1}$  [4]. Hay que destacar que ambas estrategias no necesitan un tratamiento previo de la muestra. El método fue aplicado a la determinación de dabrafenib en muestras de suero de pacientes con cáncer de piel metastásico que recibían dosis diarias de este compuesto (Fig. 1). Estos métodos simples, sensibles, precisos y rentables pueden ser empleados en la práctica clínica habitual para controlar las concentraciones de dabrafenib en fluidos biológicos de pacientes con este tipo de cáncer.

Recientemente, la extracción en fase sólida dispersiva (DSPE) previa al análisis por electroforesis capilar con detección UV-vis se ha utilizado, por primera vez, para la determinación de DB y trametinib (TT) en suero humano de pacientes con cáncer de piel metastásico [5]. El uso de DSPE simplifica la preparación de muestras y evita el riesgo de formación de emulsiones u obstrucciones. Se evaluaron seis nanomateriales magnéticos y no magnéticos como sorbentes para la extracción y preconcentración de los analitos. Los mejores resultados se obtuvieron con 4 mg de nanotubos de carbono de pared múltiple. El factor de preconcentración alcanzado fue de 4

y los límites de detección fueron 0,012 y 0,008  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para DB y TT en suero, respectivamente. La Fig. 2 muestra un esquema representativo de este proceso.



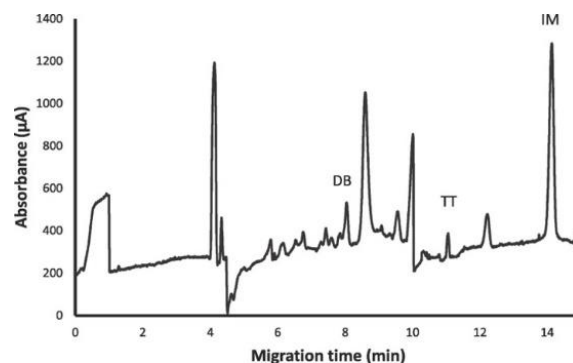
**Fig. 1.** Electroferograma correspondiente al suero de un paciente bajo tratamiento con dabrafenib.



**Fig. 2.** Esquema representativo del proceso de tratamiento de muestra.

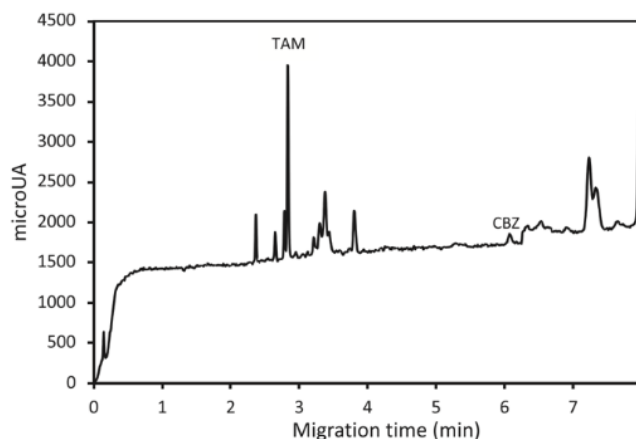
Esta nueva estrategia se aplicó al análisis de sueros de seis pacientes en tratamiento con ambos fármacos (**Fig. 3**), utilizando imipramina (IM) como patrón interno, proporcionando una alta selectividad y recuperaciones cuantitativas con unos límites de detección y

cuantificación adecuados para detectar y cuantificar los niveles típicos de ambos agentes en suero de pacientes oncológicos. Además, requiere de una instrumentación menos sofisticada y un menor volumen de disolventes orgánicos que los métodos publicados hasta el momento utilizando otro tipo de técnicas analíticas.



**Fig. 3.** Electroferograma correspondiente al suero de un paciente bajo tratamiento con DB y TT. IM fue utilizado como patrón interno.

En el año 2022, el uso de la extracción en fase sólida como operación previa al análisis por electroforesis capilar en medio no acuoso con detección UV-vis, se utilizó por primera vez para la determinación de cabozantinib (fármaco empleado para el tratamiento de cáncer renal metastásico) en orina de pacientes bajo este tratamiento. Gracias al pretratamiento de la muestra por medio de la extracción en fase sólida, el factor de preconcentración alcanzado fue de 5,3, y los límites de detección y cuantificación fueron de 3,7 y 12  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Una vez optimizado el método analítico, se aplicó a muestras de orina de un paciente bajo tratamiento con cabozantinib (**Fig. 4**). Este nuevo enfoque proporciona una alternativa rápida sin necesidad de utilizar otro tipo de técnicas más costosas.



**Fig. 4.** Electroferograma correspondiente a la orina de un paciente bajo tratamiento con cabozantinib (60 mg), 7 horas después de la ingesta. Tamoxifeno (TAM) fue utilizado como patrón interno.

### 3. Métodos cromatográficos

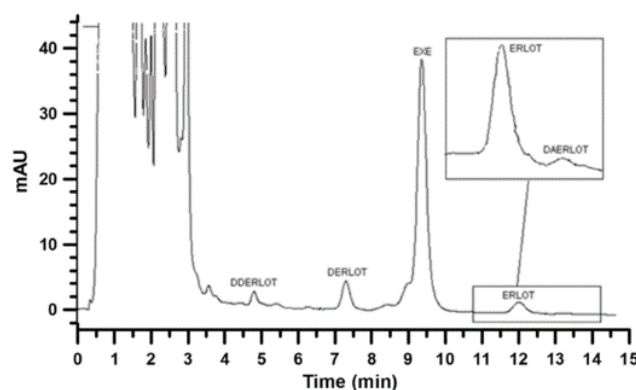
La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es una técnica que permite separar una mezcla de sustancias tras ser arrastradas por una fase móvil a lo largo de una fase estacionaria, donde las sustancias avanzan a lo largo del sistema con distinta velocidad en función de la afinidad que presenten por cada una de las fases. Tras su paso por la columna, las sustancias son identificadas en función de sus tiempos de retención. Atendiendo a la polaridad de la fase estacionaria, se puede distinguir entre cromatografía en fase normal (presenta grupos activos de alta polaridad y las interacciones que se producen con el soluto son específicas del grupo activo) o reversa (formada por ligandos hidrofóbicos inmovilizados, siendo de naturaleza apolar). Los detectores más utilizados son los detectores ópticos (UV-vis, fluorescencia), detectores electroquímicos (potenciométricos, amperométricos) y detectores de espectrometría de masas.

En cuanto a publicaciones utilizando este tipo de técnica, se ha desarrollado un método rápido y simple empleando HPLC en fase reversa con detección UV-vis para la separación y determinación simultánea de erlotinib (ERLOT), un agente antineoplásico, que se utiliza en la terapia del cáncer de páncreas avanzado o metastásico, además de cáncer pulmón de células no pequeñas, y sus metabolitos de ERLOT [7]. Dicha estrategia fue aplicada con éxito para la monitorización simultánea de ERLOT y sus metabolitos (desmetil erlotinib, DERLOT; didesmetil erlotinib, DDERLOT; y acetato desmetil erlotinib, DAERLOT) en muestras de orina (Fig. 5) y suero de pacientes bajo tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas. Los límites de detección estuvieron a niveles de  $\text{ng mL}^{-1}$ .

En cuanto a los pacientes con carcinoma epidermoide, la suma de las concentraciones de los cuatro analitos en orina se encontró entre 38 y  $4711 \text{ ng mL}^{-1}$ . ERLOT se detectó en todos los pacientes excepto en uno, mientras que DAERLOT se encontró a una concentración muy baja. En cuanto a los pacientes con adenocarcinoma, se cuantificaron tres de los metabolitos de interés en dos pacientes. Sin embargo, metabolitos como DAERLOT y/o DDERLOT no fueron detectados en algunos de los pacientes. La presente metodología analítica puede ser empleada en ensayos clínicos y análisis de rutina en laboratorios clínicos. Una ventaja importante es la fácil preparación de la muestra, que consiste en una simple dilución de la orina y el suero con metanol y acetonitrilo, respectivamente. Esta estrategia podría usarse para saber si la coadministración de otros fármacos podría tener influencia en el metabolismo de ERLOT y también para proponer un tratamiento de quimioterapia

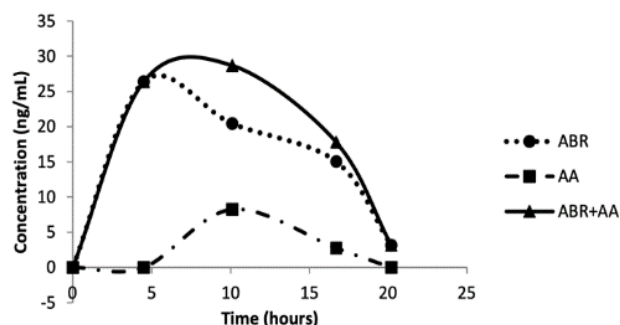
individualizado dependiendo del estado de salud particular de los pacientes.

Mediante el uso de la técnica HPLC con detector de fluorescencia, fue posible la determinación simultánea de acetato de abiraterona (profármaco, ABR) y abiraterona (fármaco, AA) en muestras clínicas complejas como son la orina y suero humano de pacientes con cáncer de próstata [8]. El método propuesto permite la cuantificación de ABR y AA minimizando los procedimientos laboriosos y complicados de preparación de muestras.



**Fig. 5.** Cromatograma correspondiente a la orina de un paciente bajo tratamiento con ERLOT. En ella aparecen también los metabolitos citados. Exemestano (EXE) fue utilizado como patrón interno.

El estudio farmacocinético en orina de un paciente se realizó durante 24 horas (Fig. 6). La concentración máxima de AA para este paciente fue de  $27 \text{ ng mL}^{-1}$  al cabo de 5 horas, mientras que la máxima excreción fue detectada al cabo de 10 horas. La gran ventaja de este nuevo método es su idoneidad para el análisis inmediato de muestras tanto de orina como de suero de pacientes con cáncer de próstata tratados con AA. La alta sensibilidad, la selectividad probada y la buena precisión y exactitud obtenidas en fluidos biológicos hacen que este método sea útil para el establecimiento de una dosis más segura y eficiente.



**Fig. 6.** Estudio farmacocinético de la orina de un paciente bajo tratamiento con AA.

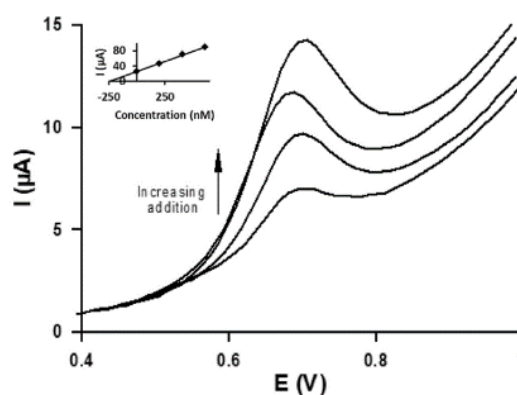
#### 4. Métodos electroquímicos

Las técnicas electroanalíticas se basan en reacciones redox en las que el intercambio de electrones tiene lugar en un electrodo. A día de hoy, se persigue una tendencia de simplificación y miniaturización con la finalidad de usar volúmenes de celda de trabajo más pequeños, lo que lleva a la utilización de pequeñas cantidades tanto de muestras como de reactivos, así como permitir el desarrollo de análisis "in situ". Se puede decir que los electrodos serigrafados (SPEs, de sus siglas en inglés Screen Printed Electrodes) son sensores innovadores que se llevan usando desde la década de los 90, por lo que se trata de una tecnología relativamente moderna. Dadas sus múltiples ventajas sobre los electrodos convencionales, estos electrodos han atraído una atención notable en áreas tan diferentes como son las de origen medioambiental, agroalimentaria, industrial, clínica y farmacéutica por tener un bajo coste, ser dispositivos pequeños y portátiles y flexibles en el diseño, ya que permiten realizar modificaciones de su superficie. Dentro de los métodos electroquímicos, se puede destacar el empleo de las técnicas voltamperométricas, las cuales obtienen información del analito a partir de la medida de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado. Dentro de éstas, las más empleadas son la voltamperometría de onda cuadrada (aplicación de una onda cuadrada simétrica en forma de escalera sobre una rampa de potencial en el tiempo) y la cíclica (aplica un barrido lineal de potencial al electrodo de trabajo tanto en el sentido directo como en el inverso, es decir, se realiza un barrido triangular de potencial).

Basándose en el empleo de este tipo de técnicas, se desarrolló un método sensible de voltamperometría de onda cuadrada con electrodos de carbono serigrafados para determinar imatinib en orina humana utilizando nanotubos de carbono de pared múltiple modificados con grupos carboxilo como electrodo de trabajo [9]. El comportamiento electroquímico del fármaco se investigó con varios tipos de electrodos y mediante tres técnicas voltamperométricas diferentes: voltametría cíclica (CV), diferencial de pulso (DPV) y de onda cuadrada (SWV). El análisis cuantitativo se realizó mediante su proceso de oxidación a +0,7 V, pH 7 y con tiempo de acumulación de 120 s. El método SWV fue lineal en el intervalo de concentraciones comprendidas entre 50 nM y 912 nM. La señal derivada del voltamograma SW dio como resultado límites de detección y límites de cuantificación dos veces más bajos que el método de SWV directo (7 nM y 23 nM, respectivamente). La estrategia desarrollada fue aplicada para la determinación de imatinib en orina de pacientes con leucemia mieloide crónica (Fig. 7) y los resultados se corroboraron mediante electroforesis capilar. El imatinib

contenido en las muestras de orina de los pacientes se determinó siguiendo el método de adición estándar utilizando el mismo electrodo serigrafado. En el presente método, el único tratamiento de la orina fue una simple dilución con el tampón de soporte.

En conclusión, el sensor desarrollado es simple, económico y rápido para la determinación de imatinib en orina. No hubo interferencias por parte de compuestos como el ácido úrico, la urea, la creatinina y el ácido ascórbico, que podrían estar presentes en los fluidos corporales. Basado en este hecho, el método propuesto ofrece posibilidades rápidas, de bajo coste, selectivas y sensibles para el análisis de este inhibidor de tirosina quinasa en muestras biológicas sin ningún pretratamiento de muestra.



**Fig. 7.** Voltamograma de onda cuadrada de la determinación de imatinib en muestra de orina utilizando el método de adiciones estándar. Se realizaron tres adiciones sucesivas con 100 nM de fármaco.

#### 5. Conclusiones y perspectivas de futuro

Los hallazgos descubiertos en estas publicaciones ponen de manifiesto el importante papel de la determinación de agentes anticancerígenos para garantizar una terapia farmacológica óptima considerando principios farmacocinéticos y farmacodinámicos para mejorar la eficacia y seguridad de estos protocolos. Dado los recientes avances en instrumentación analítica como el uso de técnicas de separación acopladas con sistemas de detección sofisticados, así como el empleo de la Nanociencia y Nanotecnología como herramientas de análisis, han estimulado esfuerzos para llevar la medicina personalizada a la práctica. Se necesita seguir desarrollando nuevas e innovadoras estrategias analíticas rápidas, rentables y fiables que puedan ser empleadas en laboratorios de rutina y/o laboratorios clínicos para mejorar la futura calidad de vida de los pacientes encontrando el ajuste preciso de la dosis en función de los perfiles de concentración del fármaco estudiado, siendo un desafío internacional para la Química Analítica actual.

## Agradecimientos

Las investigaciones presentadas en este número de la revista *Actualidad Analítica* procedentes del grupo Analytical-Nano-Group han estado financiadas a través del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, CTQ2013-48411-P, CTQ2016-78793-P, así como del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, PID2019-104381GB-I00. Además, los autores agradecen la reciente concesión de nuevos proyectos de investigación a nivel estatal, PID2022-138761NB-I00, así como a nivel regional, SBPLY/23/180225/000153. Dr. D. Sergio Fernández-Trujillo agradece a la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha la concesión de su contrato postdoctoral, SBPLY/22/180502/000068.

## Referencias

- [1] Ates, H. C., Roberts, J. A., Lipman, J., Cass, A. E., Urban, G. A., Dincer, C., On-site therapeutic drug monitoring, *Trends in biotechnology*, 38(11), 1262-1277 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.03.001>
- [2] Fang, Z., Zhang, H., Guo, J., Guo, J., Overview of therapeutic drug monitoring and clinical practice, *Talanta*, 124996 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124996>
- [3] van Leuven, J., Evans, S., Kichenadasse, G., Steeghs, N., Bonevski, B., Mikus, G., van Dyk, M., Framework for Implementing Individualised Dosing of Anti-Cancer Drugs in Routine Care: Overcoming the Logistical Challenges, *Cancers*, 15(13), 3293 (2023). <https://doi.org/10.3390/cancers15133293>
- [4] Rodríguez-Flores, J., Castañeda-Peñalvo, G., Muñoz, L., Lizcano-Sanz, I., Berciano, M. A., Micellar electrokinetic chromatographic method for the dabrafenib determination in biological samples, *Electrophoresis*, 37(10), 1296-1302 (2016). <https://doi.org/10.1002/elps.201500570>
- [5] Lizcano-Sanz, I., Guzmán-Bernardo, F. J., Castañeda-Peñalvo, G., Rodríguez-Flores, J., Determination of dabrafenib and trametinib in serum by dispersive solid phase extraction with multi-walled carbon nanotubes and capillary electrophoresis coupled to ultraviolet/visible detection, *Microchemical Journal*, 165, 106180 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106180>
- [6] López de la Nieta, L., Guzmán-Bernardo, F. J., Peñalvo-Castañeda, G., Rodríguez-Flores, J. R., Solid phase extraction prior to non-aqueous capillary electrophoresis with ultraviolet detection as a valuable strategy for therapeutic drug monitoring of cabozantinib. *Microchemical Journal*, 181, 107830 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107830>
- [7] Rodríguez-Flores, J., Castañeda-Peñalvo, G., Muñoz, L., Delgado, M. C., Lizcano-Sanz, I., Villa, J. C., Lopez, R., Simultaneous determination of erlotinib and its metabolites in human urine and serum samples by high-performance liquid chromatography, *Chromatographia*, 80, 409-415 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3258-6>
- [8] Rodríguez-Flores, J., Castañeda-Peñalvo, G., Lizcano-Sanz, I., Villa, J. C., A rapid, direct and validated hplc-fluorescence method for the quantification of abiraterone and abiraterone acetate in urine and serum samples from patients with castration-resistant prostate cancer, *Current Pharmaceutical Analysis*, 14(3), 233-238 (2018). <https://doi.org/10.2174/1573412913666170213152002>
- [9] Rodríguez-Flores, J., Castañeda-Peñalvo, G., Lizcano-Sanz, I., Electrochemical sensor for leukemia drug imatinib determination in urine by adsorptive stripping square wave voltammetry using modified screen-printed electrodes, *Electrochimica Acta*, 269, 668-675 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.03.051>