

*Discurso de investidura como Doctor "Honoris Causa" del
Excmo. Sr. D. Willy R.G. Baeyens*

26 de octubre de 2004

Excelentísimo Señor Rector Magnífico,
Excelentísimas e Ilustrísimas Autoridades Académicas,
Queridos amigos y amigas,
Señoras y Señores,

En primer lugar quisiera expresar mi más sincero agradecimiento por la presencia de todos Vds., miembros de la Universidad Complutense de Madrid y también a todas las demás personas relacionadas con esta Universidad, y a los invitados a este importante acto académico, en especial al Sr. Ministro Consejero de la Embajada de Bélgica, Sr. Gilles M.G.E. Heyvaert , por su presencia.

Es un gran honor para mí ser investido *Doctor Honoris Causa* por esta Universidad Complutense, de gran tradición y reconocido prestigio internacional, y compartir este acto con dos ilustres colegas de las Facultades de Filología y de Veterinaria.

Especialmente quisiera agradecer a mi gran amigo, el Profesor Benito del Castillo, Decano de la Facultad de Farmacia de la UCM, Catedrático de Química Analítica y auténtico farmacéutico, por su entrañable discurso de bienvenida y por ser mi padrino de investidura en este día tan especial para mí, en el que me acompañan, aparte de mi familia, algunos miembros del Consejo Belga de Deontología Farmacéutica, y amigos españoles de otras Universidades, hombres y mujeres investigadores de muy alto nivel, que forman parte de la base del desarrollo científico exponencial de este país, un país que me parece mío también.

Mi país, Bélgica es una comunidad bilingüe (de hecho trilingüe), donde la educación de la lengua castellana en Flandes se ha incrementado exponencialmente en las dos últimas décadas, y en mi posición académica he intentado realizar notables esfuerzos desde hace 15 años para promover el conocimiento de esta bella lengua, y así favorecer las relaciones entre nuestro pequeño país que es Bélgica y el extenso mundo hispano.

Mi colaboración con colegas españoles y mi vinculación con este país se ha fomentado a lo largo de los años debido a mis actividades de investigación y académicas, que les intentaré describir brevemente, y que se centran en el ámbito del análisis y control de calidad de fármacos y en el análisis de medicamentos, aplicando técnicas cromatográficas y espectroscópicas, así

como métodos luminiscentes de análisis, tales como los de fluorescencia, fosforescencia y quimioluminiscencia.

Inicialmente, en el comienzo de mi carrera universitaria, me fascinaron las posibilidades analíticas que presentaban ciertos compuestos químicos caracterizados por su emisión de radiación luminosa, por ejemplo, fármacos intensamente fluorescentes, como la quinina o la fluoresceína, organismos biológicos luminiscentes, como luciérnagas o medusas, marcadores y colorantes, o aditivos que se encuentran en ciertas bebidas y que emiten radiaciones al ser expuestas a la luz ultravioleta. Todo ello inició mi curiosidad y motivó mi interés por ampliar mis conocimientos sobre la estructura química de tales compuestos altamente fluorescentes o fosforescentes en relación con la intensa emisión de luz que presentaban en medios específicos.

Así pues mis primeras investigaciones se centraron en el desarrollo de nuevos métodos fluorescentes para el análisis de neurolépticos, tanto de los que presentaban fluorescencia intrínseca como de aquellos que requerían un previo proceso químico de formación de un derivado fluorescente para conseguir la emisión luminosa.

Estas técnicas de análisis que presentan una elevada sensibilidad, consiguieron fascinarme. Déjenme decirles que hace relativamente pocos años apenas existían sistemas de separación eficaces como la cromatografía líquida: la mayoría de los análisis se llevaban a cabo de manera directa, tanto en el caso de compuestos puros como incluso para muestras complejas.

Mi actividad estuvo encaminada al desarrollo y búsqueda de aplicaciones analíticas de nuevos marcadores fluorogénicos y quimioluminiscentes (en cooperación, entre otros, con el prestigioso Prof. K. Imai, de la Universidad de Tokio y Doctor Honoris Causa entre otras por la UCM, y por la de Gante, para la detección ultrasensible de numerosos fármacos, tras derivatización química, en diversas matrices (lotes de productos, preparación de medicamentos, fluidos biológicos) empleando cromatografía líquida, electroforesis capilar y análisis por inyección en flujo.

El hecho de que algunos compuestos farmacéuticos posean fluorescencia intrínseca constituye una herramienta científica muy útil que permite su identificación específica e incluso su determinación. No obstante la sensibilidad de la detección puede no ser suficientemente adecuada. En este sentido, y en colaboración con distintos laboratorios de otras Universidades, nos planteamos como objetivo primordial la formación de derivados químicos de grupos orgánicos funcionales (como por ejemplo, la determinación por cromatografía líquida de fenfluramina y fentermina en plasma humano usando cloruro de dansilo como agente derivatizante), así como la aplicación de procedimientos físico-químicos directos (como la irradiación, el uso de oxidantes, la formación de complejos o reacciones específicas con iones metálicos) que permitieran una determinación más sensible de fármacos que presentaban escasa o ninguna emisión

fluorescente, así como de compuestos biológicamente activos, tales como aminoácidos, polipéptidos y proteínas.

A lo largo de mi vida en el laboratorio, también me fascinó la aparente potencialidad del análisis fosforescente, aunque en su primera época las medidas sólo podían llevarse a cabo en medios rígidos, a temperatura del nitrógeno líquido o mediante absorción de los analitos en superficies sólidas específicas, desarrollando metodologías en laboratorios especializados. En la evolución de estas técnicas destacó el grupo del Prof. Cees Gooijer, de Ámsterdam, pionero en los estudios de fosforescencia en disolución. La aplicación de técnicas fosforescentes a temperatura ambiente constituye una atractiva alternativa, aunque no demasiado considerada en la práctica analítica farmacéutica en los laboratorios oficiales de control de calidad.

Esta necesidad de conseguir una detección más sensible se intensificó a finales de los ochenta e incluso después, cuando debido a la toma de conciencia social por la protección medioambiental, se hizo necesaria una reducción del volumen de disolventes tóxicos generados por sistemas analíticos de separación, en laboratorios de control que trabajan en continuo durante todo el día.

Así, la aplicación de técnicas miniaturizadas de separación, como la microcromatografía capilar, en primer lugar o la electroforesis capilar, a pesar de su excelente eficacia, presentaban serias limitaciones en cuanto a la sensibilidad, de modo que el desarrollo de las técnicas luminiscentes como sistemas de detección planteaba una solución a este inconveniente en un momento crucial.

Obviamente, otras técnicas de detección se desarrollaron simultáneamente (tales como la detección electroquímica, con nucleidos radioactivos, mediante espectrometría de masas), aunque éstas presentan una mayor sofisticación y coste.

En las décadas de los setenta y ochenta el interés de nuestro Departamento se centró en el análisis de diversos compuestos farmacológicamente activos en medicamentos bajo diversas presentaciones. Así pues, se pusieron en marcha técnicas para el análisis de distintos grupos de fármacos neurolépticos tales como butirofenonas y derivados, analgésicos, moléculas activas vía gastrointestinal, antihelmínticos y sustancias biológicamente activas, frecuentemente determinadas mediante formación de derivados fluorescentes.

En relación con la formación de derivados fluorescentes, nuestra finalidad, aunque no siempre alcanzable, ha sido elucidar mediante espectrometría de masas la estructura química de la especie emisora de radiación luminosa con objeto de identificar la configuración química real de los productos medidos. Desafortunadamente, en el caso de reacciones de fotodegradación aplicadas en análisis en continuo, los fluoróforos responsables no pueden ser siempre inequívocamente identificados.

En los estudios mencionados, también nuestro equipo -en colaboración con el grupo del Profesor del Castillo como en varios otros casos- contribuyó al incremento del conocimiento de las propiedades luminiscentes, mediante el empleo de ciclodextrinas y otros medios organizados, tales como tensioactivos, macromoléculas, etc., llevando a cabo una aplicación eficaz en fase estacionaria (como en cromatografía de capa delgada) o en sistemas en continuo, tales como el análisis por inyección en flujo o la cromatografía líquida.

Las limitaciones presentadas en la detección en cromatografía líquida de alta eficacia igualmente llevó a nuestro equipo a la investigación de un área menos aplicada, la de las técnicas de detección "en columna", en comparación con las técnicas de cromatografía líquida convencionales.

Todas estas técnicas de formación de derivados fluorescentes y de aumento de la sensibilidad, desafortunadamente están todavía infravaloradas, debido a los vigentes protocolos normalizados de análisis, que han sido rigurosamente aplicadas a la electroforesis capilar en el ámbito del análisis de residuos de fármacos (como por ejemplo antibióticos del grupo de las tetraciclinas) en leche, mediante formación de quelatos fluorescentes con circonio post-columna o post-capilar.

Estas investigaciones analíticas, y la estimación crítica de las ventajas y especialmente de los inconvenientes, nos hicieron considerar la aplicación de un área particularmente compleja, la detección quimioluminiscente, fundamentalmente aplicada a la electroforesis capilar, acoplamiento que comenzó a desarrollarse en los años noventa, fundamentalmente debido al inicio de los sistemas miniaturizados en Química Analítica.

En este sentido, en nuestro laboratorio hemos desarrollado métodos muy útiles para la determinación, entre otros, de anestésicos locales y compuestos derivados, mediante la medida de la emisión quimioluminiscente generada tras la oxidación con permanganato.

La determinación de penicilina ha constituido una innovadora contribución en el área de la quimioluminiscencia, usando el análisis por inyección en flujo mediante el empleo de la reacción de oxidación con Cerio (IV), usando quinina como agente sensibilizante.

Igualmente se han obtenido resultados satisfactorios en la determinación de potentes nanopéptidos antihipertensivos y del captopril, antihipertensivo tipo tiol, mediante la aplicación de la reacción del luminol y de reacciones de oxidación con cerio (IV) con agentes sensibilizantes, como la rodamina B.

De la misma manera hemos sido capaces determinar ácido ascórbico en zumos de frutas y en fármacos; pilocarpina y su epímero, la trans isopilocarpina, así como varios fármacos antiinflamatorios no esteroideos, tales como el diclofenaco o el naproxeno.

Asimismo, el grupo de investigación que dirijo ha realizado considerables esfuerzos en la separación y determinación de compuestos enantiómeros de mezclas de fármacos racémicos, frecuentemente así comercializados, y de los que es sabida la diferencia sustancial existente entre tales compuestos en relación a su acción, toxicidad y mutagénesis. Recordar la talidomida. Esta diferenciación se ha abordado mediante el empleo de la microcromatografía líquida, bien de manera directa, empleando fases quirales estacionarias, o bien mediante un marcador enantioselectivo precolumna, fundamentalmente empleando marcadores fluorescentes, como por ejemplo, la determinación de los enantiómeros de la fluoxetina utilizando NBD-F en modo precolumna. Fluoxetina y norfluoxetina han podido determinarse en muestras microdializadas en cerebro de rata. Enantiómeros de fármacos diuréticos, también pudieron ser satisfactoriamente determinados mediante el empleo de un nuevo tipo de fase estacionaria, denominado Pirkle.

Últimamente y a través de proyectos de investigación internacionales, nuestros objetivos se han dirigido a la determinación de aminoácidos y tioles biológicamente activos, y compuestos relacionados, en sangre humana (como glutatión, cisteína, homocisteína, acetilcisteína, etc.) y sus homómeros (a veces hetero) disulfuros, centrándose en la regioselectividad de algunos glutatión-feniléteres, en el contexto general de la relación existente entre el metabolismo del fármaco, vía formación del epóxido, y las propiedades cancerígenas previsiblemente existentes.

En la actualidad nuestro interés se centra en el la aplicación de la espectroscopía Raman, que parece ofrecer increíbles posibilidades analíticas en el control de calidad cuali- y cuantitativo de medicamentos, en el terreno industrial, biomédico y toxicológico. Así, hemos desarrollado el control "on-line" del proceso de fabricación farmacéutica usando la espectroscopía Raman con transformada de Fourier, aplicado entre otras, a la determinación de algunos agentes antiinflamatorios no-esteroides, como el ketoprofeno en formulaciones farmacéuticas, algunos diuréticos, como la hidroclorotiazida, e isoflavonoides, así como la determinación de enantiómeros o la determinación de la hormona esteroidea acetato de medroxiprogesterona en suspensiones acuosas, un problema analítico que no es fácil de abordar correctamente y de gran importancia para las compañías farmacéuticas.

En este sentido, en los próximos años es de esperar un notable incremento en los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, relacionados con el desarrollo de esta específica técnica espectroscópica y su aplicación analítica, directamente en la línea de fabricación de medicamentos. Por ello, es nuestro interés buscar la cooperación internacional entre grupos de investigación activos en esta disciplina.

El creciente interés por la protección medioambiental, también nos condujo a la elaboración de estudios críticos con el objetivo de evaluar el empleo de columnas de diámetros reducidos en cromatografía líquida para análisis de residuos de fármacos a niveles traza, tales como antibióticos, analgésicos

antiinflamatorios no esteroídicos, barbitúricos, benzodiazepinas, para resoluciones quirales de ciertas fenotiazinas, catecolaminas, tiazinamium y fluoroquinolonas, como la ofloxacina y ciprofloxacina, cuyas propiedades de fluorescencia intrínseca podían ser aumentadas sustancialmente en medio micelar.

Los métodos analíticos propuestos para la determinación de los antiinflamatorios no esteroídicos llevada a cabo mediante sistemas miniaturizados fueron aplicados a la cuantificación de estos compuestos, en plasma humano y equino, tras su aplicación intravenosa y rectal, todo ello en colaboración con la Facultad de Veterinaria de Gante, en lo que llamamos "una unión" entre la investigación académica y la práctica clínica.

En relación con las ya citadas e innovadoras técnicas miniaturizadas en cromatografía líquida, de las que discutimos críticamente las ventajas y limitaciones, respecto al análisis mediante electroforesis capilar, hemos desarrollado importantes contribuciones en una de las etapas más importantes del análisis: el tratamiento de la muestra, considerando la aplicación de técnicas pre-columna en línea.

Nuestro departamento desde hace mucho tiempo, ha realizado notables esfuerzos en llevar a cabo la correcta validación de nuevos métodos desarrollados para el análisis de fármacos, considerando que existe una notable dificultad en sustituir protocolos ya existentes para análisis de rutina por otros más ventajosos basados en el uso de técnicas más rápidas y sensibles. Este es el caso de los nuevos métodos que sugerimos para el análisis de morfina e hidromorfona o de meloxicam y aciclovir, por citar algunos ejemplos.

También estamos contribuyendo, junto con algunos grupos de investigación asiáticos, al desarrollo de métodos de microdiálisis para la medida en-línea con detección quimioluminiscente, en el estudio de la generación de óxido nítrico en cerebro de rata debido a daños traumáticos. Así mismo, junto con el Departamento de Zoología de la Universidad de Gante se está evaluando el empleo de un colorante fluorescente muy común, la fluoresceína, como agente bioderivatizante para estimar la importancia de los crustáceos en la cadena global de alimentación.

Nuestra finalidad más actual y ambiciosa -en colaboración con investigadores extranjeros, varios de ellos españoles- está relacionada con la aplicación de poliestirenos y nanopartículas para facilitar la separación enantiomérica en electroforesis capilar, entre otras para la molécula de propranolol.

Me gustaría concluir, mi disertación desde mi modesta visión personal, apostando abiertamente por la progresiva evolución de las ciencias bioanalíticas, en las que adquiere gran interés el desarrollo de los métodos de análisis, cada vez más rápidos, aplicados a volúmenes de muestra cada vez menores, la optimización de métodos cada vez de mayor resolución, aplicados al análisis enantiomérico o a productos de descomposición con estructuras similares a la

molécula original, el creciente desarrollo de los sensores, principalmente biológicos, y el análisis sobre microchips: el laboratorio llevado al mismo lugar en donde se efectúa de toma de la muestra, para poder llevar a cabo los análisis "in-situ".

Como la clave de la limitación continuará siempre siendo la sensibilidad en la detección, los métodos luminiscentes continuarán ocupando un lugar principal, a pesar de la rápida evolución de la espectrometría de masas y de las técnicas electroquímicas.

Finalmente quiero destacar el amor que siento por su magnífico país, por sus Universidades públicas, su lengua, el respeto a sus costumbres y tradiciones, mi admiración hacia su estilo de vida, que siempre comparto y del que disfruto plenamente cuando viajo a España, con bastante frecuencia por cierto, y en el que tengo grandes colegas con los que comparto buenos ratos, sobre todo llenos de la amistad, que valoro profundamente.

Espero que me perdonen si hay errores en este discurso en el que he preferido usar el castellano, a pesar de mi modesto conocimiento de una lengua que aprendí hace ya algún tiempo y que intento perfeccionar en cada ocasión con los amigos españoles y con las relaciones académicas.

De nuevo, muchas gracias por este honor, a la Universidad Complutense, a su Rector, el Profesor Carlos Berzosa, a mi padrino, el Profesor Benito del Castillo y a todos ustedes por su atención.