

---

*Revisión*

---

**Proyección de las técnicas analíticas  
espectroscópicas y cromatográficas de aplicación  
en análisis farmacéutico en el Laboratorio de  
Técnicas Instrumentales de la Facultad  
de Farmacia de Madrid (UCM) en los últimos  
25 años**

Recibido el 6 de noviembre de 2007

BENITO DEL CASTILLO\*, ANA I. OLIVES, M. ANTONIA  
MARTÍN

*Laboratorio de Técnicas Instrumentales. S. D. Química Analítica,  
Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040-  
Madrid (SPAIN)*

**RESUMEN**

En este trabajo se realiza un breve repaso de las líneas de investigación y trabajos dirigidos por el Profesor Dr. Benito del Castillo, de su trayectoria investigadora y la de su grupo de investigación, así como de los logros alcanzados a través de distintas colaboraciones a nivel internacional.

**Palabras clave:** espectroscopia; cromatografía; análisis farmacéutico; análisis medioambiental; análisis toxicológico.

---

**\* Dirección de correspondencia:**

Benito del Castillo García  
Laboratorio de Técnicas Instrumentales. S. D. Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid (ESPAÑA)  
Tfno: 91-3941702  
E-mail: bdc@farm.ucm.es  
Dedicado a nuestro maestro D. Manuel Ortega Mata

### ABSTRACT

**An outline of spectroscopic and chromatographic techniques and their application to pharmaceutical analysis at the Laboratory of Instrumental Techniques of the Faculty of Pharmacy of Madrid (UCM) during the last 25 years**

A summary of the research work supervised by Professor Dr. Benito del Castillo is presented. In this research career, the achievements of his group and his international collaborations are briefly reviewed.

**Key words:** spectroscopy; chromatography; pharmaceutical, environmental and toxicological analysis.

### INTRODUCCIÓN

De forma sucinta se van a exponer algunos de los trabajos de investigación analítica más representativos de los miembros del equipo de investigación que firman el presente artículo y que han dado lugar a trabajos y publicaciones de diversa índole.

En el Laboratorio de Técnicas Instrumentales, actualmente adscrito a la Sección Departamental de Química Analítica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, se han desarrollado otros trabajos y seguido líneas de investigación dirigidas por otros profesores además de los que aquí se citan. En este resumen se recogen diversas publicaciones de autores que también han participado directamente en lo que constituyó el objeto de sus tesis doctorales, bajo la dirección del Prof. Dr. Benito del Castillo, o bien posteriormente, como codirectores de diferentes artículos científicos surgidos en colaboración con el Profesor del Castillo, Catedrático de Química Analítica, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia y Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

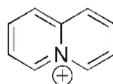
### **ANÁLISIS DE COMPUESTOS DE INTERÉS BIOLÓGICO, FARMACÉUTICO Y MEDIOAMBIENTAL POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y CROMATOGRÁFICAS**

A comienzos de la década de los setenta y bajo la dirección del también Académico de Número y Catedrático de Técnicas Instru-

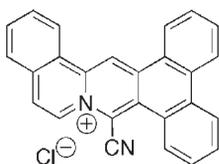
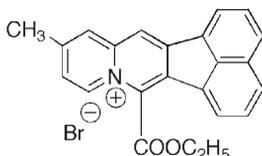
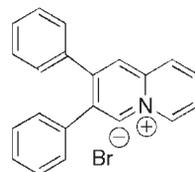
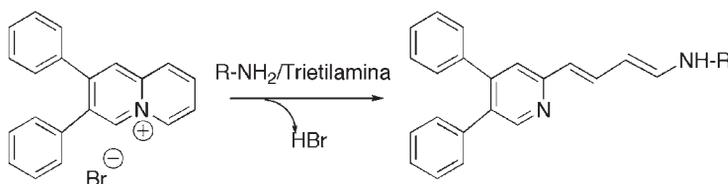
mentales, Prof. Dr. Manuel Ortega Mata, el profesor del Castillo realizó su tesis doctoral centrada en el análisis fluorimétrico de antibióticos, siendo pioneros en España en el análisis de fármacos por espectrofluorimetría (1-4). El análisis de antibióticos ha continuado siendo una constante de interés para este grupo y gracias una Acción Integrada Hispano-Portuguesa (HP-93006/1994), en que los autores realizaron un interesante trabajo científico en colaboración con el Departamento de Bromatología, Toxicología y Análisis Químico de la Universidad de Coimbra, centrado en la determinación de antibióticos, en concreto tetraciclinas, en alimentos por HPLC con detección espectrofluorimétrica (5) mediante reacción de derivatización con calcio, con el fin de lograr la sensibilidad requerida para detectar las tetraciclinas en las concentraciones tan bajas en las que se encuentran en la carne de bovino, ovino o porcino. Asimismo, se emplearon diversos reactivos fluorogénicos para la determinación de tioles de interés biológico, mediante cromatografía en capa delgada de alta eficacia (6, 7). También se continuó trabajando en la determinación de algunos fármacos mediante el empleo de técnicas analíticas de separación, de la más reciente introducción, como fue el caso de la electroforesis capilar (8).

Continuando con el desarrollo de las aplicaciones de la espectrofluorimetría, este grupo de investigación viene efectuando trabajos acerca del desarrollo de nuevos marcadores fluorescentes (9, 10) y reacciones de derivatización fluorimétrica (11, 12) mediante el empleo de sales de quinolininio de nueva síntesis (Figura 1) para la determinación de compuestos de interés biológico (13, 14) (catecolaminas, fármacos y aminas —VOC—, volatile organic compounds, que presentan notable interés desde el punto de vista medioambiental). Asimismo, se han estudiado las posibilidades analíticas que los medios organizados (micelas y ciclodextrinas) aportan a la mejora en la sensibilidad y selectividad analítica de numerosos compuestos hidrofóbicos, manteniendo en este campo una estrecha colaboración con el Prof. Dr. Dan A. Lerner, catedrático de Química Física de la Escuela Nacional Superior de Química de Montpellier (ENSCM). En esta línea se han establecido las ventajas (mejora en la sensibilidad analítica y mayor resolución espectral) que la solubilización en medios micelares (15, 16) aportan a la determinación de distintos heterociclos nitrogenados; además, se pudo demostrar que el cloruro

de 9-cianobenzo[*a*]fenantro[9,10-*g*]quinolizinio se comporta como un sensor fluorescente que permite detectar cambios en el entorno hidrofílico/hidrofóbico en el que se encuentre alojado, guardando similitud con los descrito para el pireno y sus derivados. El Profesor Lerner disfrutó de un año sabático en nuestro el Laboratorio de Técnicas Instrumentales, en 1996.



Anillo de quinolizinio

Cloruro de 9-cianobenzo[*a*]fenantro[9,10-*g*]quinolizinio  
**Sensor fluorescente**Bromuro de 7-etoxicarbonil-11 metilacenafto[1,2-*b*] quinolizinio  
**Agente intercalante de ADN**Bromuro de 2,3-difenil-quinolizinio  
**Reactivo fluorogénico**

Cuantificación de aminas por reacción de derivatización con bromuro de 2,3-difenilquinolizinio

FIGURA 1. *Estructuras químicas de algunas de las sales de quinolizinio estudiadas de relevancia por su aplicación analítica como sensores, agentes intercalantes o reactivos fluorogénicos.*

Por otra parte en 1991 se inició un ambicioso proyecto de colaboración con el Prof. Dr. Kazuhiro Imai, catedrático de Química

Bioanalítica de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Tokio, dada nuestra experiencia en el campo de los reactivos fluorescentes y en el desarrollo de las reacciones de derivatización, se estudiaron las condiciones experimentales para la reacción y detección quimioluminiscente de catecolaminas (17), ya que se hayan implicadas en los complejos mecanismos que contribuyen a la hipertensión, una de las patologías más frecuentes en el mundo desarrollado. Por ello, se puso a punto la metodología para el análisis de catecolaminas en plasma, mediante HPLC con detección postcolumna (Figura 2) por reacción quimioluminiscente (18) y se aplicó a la determinación de catecolaminas en plasma en modelos experimentales (ratas normotensas e hipertensas) (19).

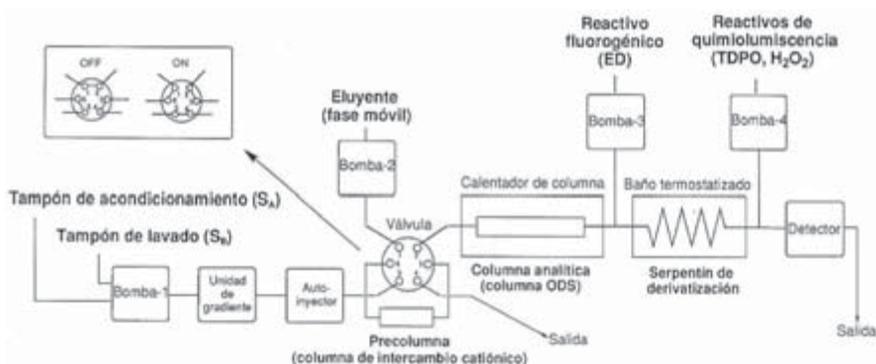


FIGURA 2. *Esquema de un equipo de HPLC con detección quimioluminiscente totalmente automatizado para la determinación de catecolaminas en plasma de rata.*

Muchos heterociclos nitrogenados muestran actividad antitumoral, por ello también se inició una línea de trabajo centrada en los estudios de interacción de diversos derivados de quinolizino (20), benzo[*a*]quinolizidina (21) y azaquinolizino (22) con ADN, pudiendo establecerse una clara correlación entre la estructura química de los derivados estudiados y la magnitud de la interacción con el ADN. Tanto en el caso de los derivados de quinolizino como de benzo[*a*]quinolizidina, los resultados experimentales evidencian que es la parte aromática plana, aquella que queda atrapada entre los pares de bases del ADN, lo que puede dificultar su replicación y por

tanto, explica su potencial actividad antitumoral (Figura 3). Con la finalidad de determinar si la interacción heterociclo-ADN se produce a través del bolsillo hidrofóbico de la macromolécula, se estudió la influencia de la polaridad de los disolventes sobre estos compuestos mediante técnicas espectroscópicas de absorción y de emisión (23, 24). Esta línea se continua en la actualidad plasmada en la colaboración que mantenemos con el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la UCM, para el estudio de la interacción con ADN de los agentes antitumorales sintetizados por el grupo que dirigen los profesores Avendaño y Menéndez.

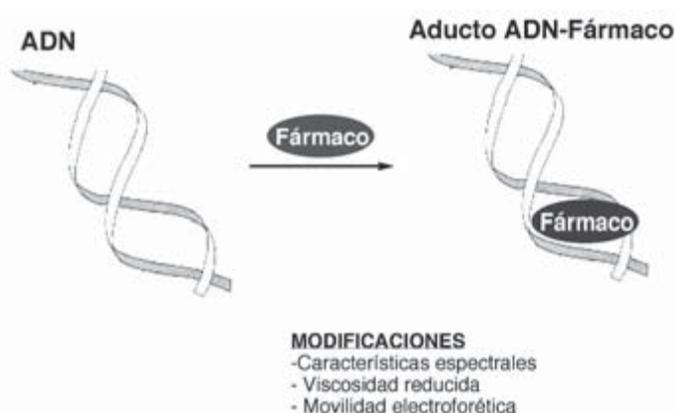


FIGURA 3. *Esquema del modelo de interacción de algunos fármacos antitumorales con ADN, ilustrando los cambios en parámetros analíticos que permiten establecer dicha interacción.*

La experiencia adquirida en este campo ha hecho posible la participación en la redacción de un capítulo de libro centrado en la importancia de los marcadores fluorescentes en el contexto general de las técnicas de luminiscencia (25) y en la invitación para escribir un artículo de revisión sobre la relevancia de los marcadores fluorescentes en el análisis farmacéutico (26).

Los retinoides, entre los que se encuentran la vitamina A (retinol), el retinal y el ácido retinoico poseen una gran significación biológica (27) por su papel en la fotoquímica de la visión, así como en los procesos de diferenciación celular. Además, debido a su cadena poliéni-

ca son fotolábiles y fácilmente isomerizables, perdiendo parte de su actividad biológica. La formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas incrementa su estabilidad (28) frente al oxígeno y las radiaciones visibles, lo cual se demostró por la separación y cuantificación de los isómeros geométricos, mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). Asimismo, la inclusión permite la cuantificación de estos compuestos en disolución acuosa, hecho de especial relevancia considerando su elevada hidrofobicidad. Tanto la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas (29, 30) como la solubilización de estos retinoides en soluciones micelares (31) permite observar la luminiscencia a temperatura ambiente de estos compuestos, hecho que hasta el momento sólo se había apreciado a bajas temperaturas (77 K). Asimismo, se han aislado y caracterizado por distintas técnicas instrumentales espectroscópicas (difractometría de rayos X,  $^1\text{H-RMN}$ ,  $^{13}\text{C-RMN}$ , espectrofotometría UV-VIS, IR y espectrofluorimetría) los complejos retinal/ $\beta$ -ciclodextrina (32), y estos mismos complejos sólidos se han estudiado mediante la moderna técnica de microscopia atómica de fuerzas (AFM) (33).

En 1993, se abrió una línea de colaboración, con la Profra. Dra. Ait-Lyazidi de Facultad de Ciencias de Meknes (Marruecos), que condujo a la presentación de la tesis doctoral en Ciencias de Mohamed Sbai (34). En este campo, se ha logrado la solubilización en soluciones micelares de algunos alcaloides hidrofóbicos, tales como la elipticina, que posee una potente actividad biológica como antitumoral. Su inclusión en ciclodextrinas permite la solubilización de la forma neutra de la elipticina, insoluble en agua. En nuestros experimentos se ha demostrado que el uso de tensioactivos (35) o la inclusión en diversas ciclodextrinas (36) exaltan su hidrosolubilidad, sin pérdida en su actividad biológica. Los complejos de elipticina con diversas ciclodextrinas se han caracterizado por espectrofotometría de absorción UV-Vis y espectrofluorimetría, mediante la determinación de su estequiometría y de sus constantes de asociación (37). En paralelo, y tomando como estructura química modelo el carbazol, se ha verificado su inclusión en ciclodextrinas (Figura 4) y se han caracterizado los citados complejos por su estequiometría y constantes de asociación (38). Análogamente, se ha verificado la sensibilidad para su determinación espectrofluorimétrica mediante el empleo de soluciones micelares y de ciclodextrinas (39).

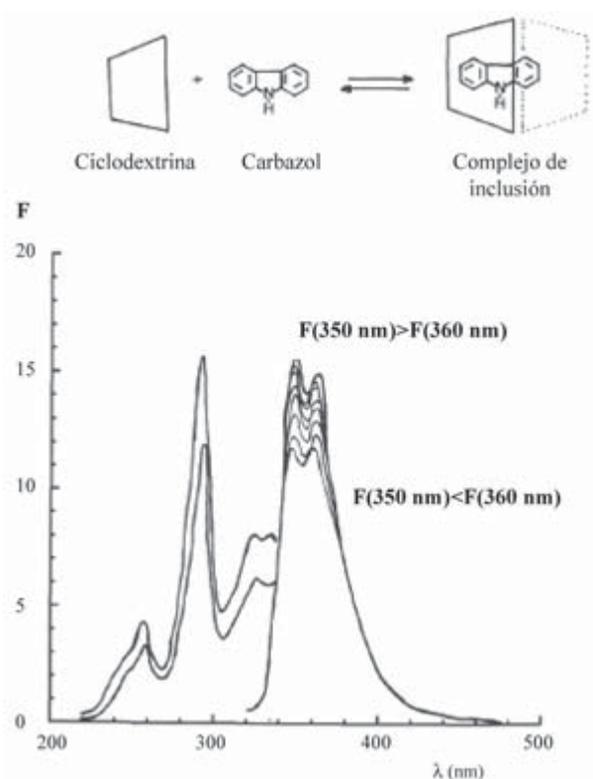


FIGURA 4. *Modelo de inclusión del carbazol en las cavidades de beta-ciclodextrinas formando complejos de estequiometría 1:1 y 1:2; deducidos a partir de los cambios espectrales.*

Esta línea de investigación ha continuado con posterioridad con el estudio y caracterización de los complejos de inclusión entre los alcaloides derivados de  $\beta$ -carbolina (harmano y harmina) y distintas ciclodextrinas (40). La inclusión en ciclodextrinas (41, 42) o la solubilización mediante el empleo de tensioactivos (43) afecta notablemente a los equilibrios ácido-base de estos alcaloides, produciéndose la emisión del fluoróforo predominante, dependiendo de la carga neta global de la micela en la que se solubilizan. Por otra parte, se ha demostrado que el empleo de medios micelares protege los estados excitados de estas moléculas frente a los agentes amortiguadores externos; sin embargo, el grado de protección depende de la naturaleza de la micela empleada, lo que tiene una gran importancia cuan-

do se emplean tensioactivos como aditivos en las fase móviles de las separaciones cromatográficas (44).

La experiencia adquirida en este campo dio lugar a dos artículos de revisión, solicitados por los editores de la revista *Analisis*, relativo a la importancia de los medios organizados en las técnicas espectroscópicas (45) y de la revista *Ars Pharmaceutica*, centrado en las características químicas de los complejos de inclusión con ciclodextrinas y sus aplicaciones analíticas (46).

Con la incorporación a nuestro grupo del Prof. Andrés León Leal, de la Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela), se continuaron los trabajos sobre complejos de inclusión con ciclodextrinas, en este caso centrándose en la caracterización de los complejos de inclusión de los derivados de  $\beta$ -carbolina por técnicas espectroscópicas (47), así como en la determinación de la estequiometría con la problemática asociada a ella (48) y las constantes de asociación de los complejos (49). Los trabajos experimentales de su tesis doctoral (50) se han centrado en la separación de los alcaloides derivados de  $\beta$ -carbolina por HPLC con detección fluorimétrica, adicionando a las fases móviles ciclodextrinas. Estos macrociclos tienen una elevada capacidad de reconocer molecularmente y distinguir compuestos química y estructuralmente relacionados; con esta finalidad, se han enlazado químicamente a las distintas fases estacionarias y se han empleado con éxito en la separación de analitos quirales por cromatografía de líquidos, de gases y de fluidos supercríticos. Una alternativa que permitió una mayor versatilidad en las determinaciones analíticas consistió en la incorporación de ciclodextrinas como modificadores de las fases móviles convencionales. En este campo de trabajo nuestro grupo ha demostrado que se puede mejorar notablemente la eficacia de las separaciones (51, 52) (mejor selectividad y mayor resolución entre los compuestos separados). Asimismo, la adición de ciclodextrinas a las fases móviles conlleva una reducción en la proporción de disolventes orgánicos en esas fases móviles (53), lo que tiene un gran interés desde el punto de vista medioambiental, ámbito conocido como tecnologías limpias y metodologías analíticas respetuosas con el medio ambiente (*química verde*). Asimismo, se han estudiado diversas variables que influyen en la separación, demostrándose la existencia de un equilibrio secundario (54) al proceso de separación, que es el equilibrio de inclusión en las cavidades de las

ciclodextrinas de los alcaloides estudiados. Además, para demostrar este proceso de inclusión los complejos modelo alcaloide/ciclodextrina, se sintetizaron, aislaron y caracterizaron (55) por técnicas de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono 13.

Los alcaloides derivados de  $\beta$ -carbolina, al igual que los derivados de carbazol, poseen actividad antitumoral y presentan singulares características espectroscópicas, siendo muy sensibles al microentorno molecular, pudiendo participar en procesos de transferencia de protón en estado excitado (56) inducidos por vía fotoquímica; también se ha demostrado que la solubilización de estos alcaloides en medios micelares mejora la sensibilidad en la cuantificación por espectrofluorimetría, gracias a que se evita la amortiguación de la fluorescencia (44) nativa de estos compuestos. La notable sensibilidad de los complejos de inclusión norharmano/ciclodextrinas a las variaciones de pH permiten utilizarlos como sensores de células tumorales, ya que las zonas circundantes a un tumor presentan un valor de pH inferior a 7.0 y estos complejos son capaces de detectar variaciones de pH de 0.01 unidades de pH (57, 58).

Con la incorporación de Emiliano E. Romero Ale, procedente de la Universidad JFK (Buenos Aires, Argentina), gracias a una beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), ampliamos nuestro campo de estudio a los compuestos derivados de carbazol como reactivos fluorogénicos (59, 60) para la detección de aminas de interés biológico, mediante HPLC con detección fluorimétrica. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto una notable dependencia de la fluorescencia con la estructura molecular (61) de los distintos derivados de carbazol estudiados, así como de la polaridad de los disolvente o de otras variables experimentales como el pH. Asimismo, la reactividad (62) de estos compuestos se ve seriamente afectada por el microentorno molecular. Teniendo en cuenta las posibilidades analíticas que los heterociclos derivados de carbazol presentan, en la actualidad estamos considerando su utilidad en el reconocimiento molecular de aniones (63) de interés biológico, por lo que se ha propuesto su aplicación para la determinación de cloruros y fluoruros.

No obstante, se han desarrollado otras líneas de trabajo que tienen un marcado aspecto aplicado. Como ya hemos señalado, el es-

tudio de las propiedades fluorescentes de diversos compuestos naturales ha sido una constante en este grupo de trabajo. Así, se puso a punto un método espectrofluorimétrico para la determinación de oenantotoxina (64), aunque tuvo una mayor repercusión el desarrollo de la metodología para la determinación de biocanina A, formononetina y genisteína, un grupo de flavonoides presentes en algunas especies del género *Trifolium*, muy común en nuestros campos y capaces de provocar abortos en el ganado bovino y ovino cuando ingieren masivamente este tipo de plantas, ocasionando graves pérdidas a los ganaderos. Dada la relevancia del problema se hizo posible la determinación de estos compuestos mediante espectrofluorimetría y HPLC-UV (65). Asimismo, en colaboración con un grupo de investigadores de la Universidad de Córdoba (Argentina) se procedió a la caracterización por espectrofluorimetría de distintos derivados de quercetina, presentes en raíces de *Dalea elegans* (66). Algunos compuestos como el ácido indolacético (IAA) o el ácido abscísico (ABA), compuestos de origen natural presentes en las plantas y conocidos como fitohormonas, debido a que actúan regulando el crecimiento de los vegetales y se sabe que se acumulan en las semillas cuando estas se encuentran en ambientes desfavorables para la germinación. Para tratar de conocer mejor estos procesos, se desarrollaron distintas metodologías para la determinación de ambos ácidos destacando la derivatización química para producir compuestos fluorescentes, determinándose el contenido IAA en diferentes variedades de semillas de *Pinus pinea* (67). En el caso del ácido abscísico se determinó su contenido en las semillas de *Helianthus annuus* (68, 69) y los resultados se compararon con los de la determinación por HPLC-UV. En la Figura 5 se muestran los cromatogramas correspondientes a la separación de los isómeros del ABA en muestras reales y patrones. Otro grupo de compuestos, naturales y modificados por síntesis química, estudiados por espectrofluorimetría son los derivados de benzimidazol (70), los cuales presentan actividad farmacológica como antihelmínticos. También se ha iniciado una línea de investigación encaminada al desarrollo de reacciones de derivatización para la determinación de diarilaminas mediante su transformación en carbazoles altamente fluorescentes (71).

Con la incorporación de la Profra. Dra. Olives, en el año 1989, al grupo de investigación que dirige el Profesor del Castillo, se abrió

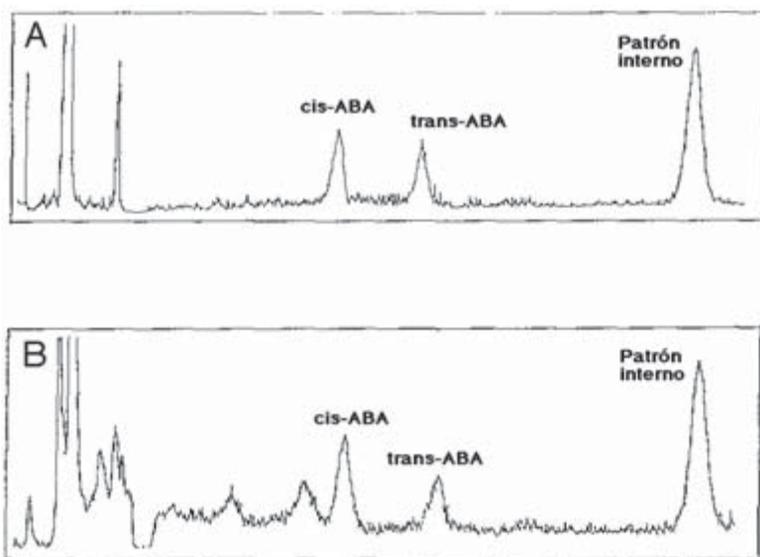


FIGURA 5. *Cromatogramas obtenidos en la determinación de ácido abscísico en semillas de Heliantus annuus por HPLC-UV. (A) Cromatograma obtenido para los patrones de cis- y trans-ABA con el patrón interno adicionado para cuantificar. (B) Cromatograma obtenido en el análisis de muestras reales, mostrando la presencia de cis- y trans-ABA junto con el patrón interno adicionado para cuantificar.*

una nueva línea de trabajo en colaboración con la Profra. Dra. M. Esperanza Torija Isasa del Departamento de Nutrición y Bromatología II, de la Facultad de Farmacia de la UCM. El objetivo de esta colaboración, que se mantiene en la actualidad, se centra en el análisis y calidad de aguas fluviales mediante técnicas espectroscópicas atómicas y moleculares (72). Hay factores naturales (la geología y el clima) y otros artificiales (vertidos y núcleos de población) que afectan a la calidad de las aguas. Se estudió el contenido de diversos metales (cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel, plomo y cinc) (73, 74), así como otros parámetros fisicoquímicos y de contaminación en 21 puntos de muestreo a lo largo del río Arlanzón (Burgos), desde su nacimiento hasta su llegada a la capital. Los resultados obtenidos durante las campañas de los años 1991 y 1992, pusieron de manifiesto que las aguas del río Arlanzón son poco mineralizadas y poco contaminadas, además de poseer un gran poder de autodepuración, en concordancia con sus características de

río de alta montaña; la composición química cambia según la naturaleza geológica del terreno surcado y la densidad de población de los núcleos urbanos que atraviesa o que lo circundan (75). De las conclusiones obtenidas es de reseñar que el manganeso superaba los niveles máximos permitidos para aguas de consumo público en el tramo medio del río (76), el hierro fue el elemento más abundante, superando su concentración media anual en todos de los puntos del muestreo el nivel guía (50 mg/L) (77). Con respecto al plomo (Figura 6) se observó que si bien sus niveles nunca superan los niveles de concentración máxima permitida, estos se incrementan en las zonas próximas a los núcleos de población (78).

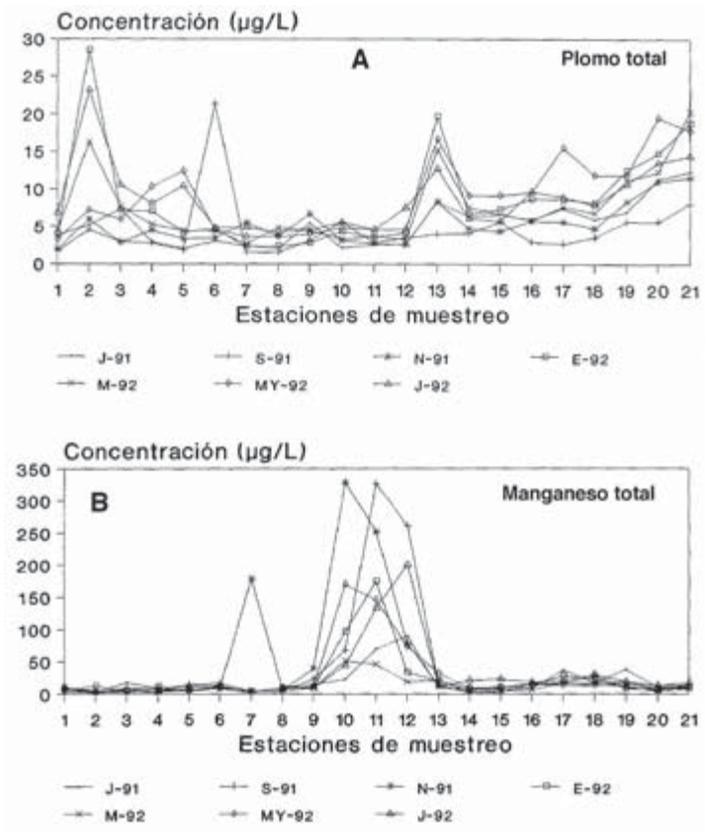


FIGURA 6. Evolución anual de los niveles de concentración de metales totales en el agua del río Arlanzón a lo largo de los diferentes puntos de muestreo. (A), Plomo (B) Manganeso.

En estudios posteriores se ha relacionado la composición química de las aguas del río Arlanzón con la flora acuática y de rivera (comunidades acuáticas, helofíticas e hidrófilas) de las zonas circundantes, como un indicador biológico de calidad de las citadas aguas, obteniendo muy buena correlación entre los bioindicadores y los parámetros químicos de calidad de las aguas (79). Estos trabajos se han realizado gracias a la colaboración con el Prof. Dr. Molina. Dicha colaboración continúa en la actualidad con el Departamento de Biología Vegetal II (Dr. Molina) y con el Departamento de Edafología (Dr. Casermeiro y Dra. de la Cruz), estudiando otros ecosistemas, tales como humedales y charcas estacionales, así como zonas fluviales de otras zonas de la geografía española, como los humedales Ibero-Mediterráneos (80).

### OTRAS LÍNEAS DE TRABAJO

Como resultado de la estancia de la Dra. Martín Gómez en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Alcalá (Madrid), con los profesores Ortega Ortiz de Apodaca y Ballesteros, se potenció la colaboración con el laboratorio de Técnicas Instrumentales (Sección Departamental de Química Analítica) de la Facultad de Farmacia de la UCM, en la línea de análisis y control de medicamentos, que cristalizó en diferentes artículos y ponencias recogidas en la bibliografía, y entre ellas destacamos las presentadas en el I Congreso Internacional de Química Analítica celebrado en Lima (Perú) (81, 82).

Además de estas líneas de trabajo, se han desarrollado otros trabajos en colaboración con otros departamentos e instituciones de la UCM, en concreto con la Facultad de Medicina, se realizaron estudios sobre litiasis renal y de la caracterización de cálculos renales, para lo que se emplearon técnicas espectroscópicas (espectrometría IR) y distintas modalidades de microscopía electrónica (83). Por otra parte, en colaboración con el Instituto de Nutrición (C.S.I.C.) se utilizó uno de los métodos oficiales de análisis (I.U.P.A.C.) para la determinación por HPLC con detección fluorimétrica de los niveles de vitamina E en distintos aceites vegetales, y se valoró como el proceso de fritura contribuye al deterioro de los mismos debido a la

desaparición de la vitamina E y sus análogos presentes en los aceites (84). Por otra parte y debido al gran interés que existe en la industria farmacéutica para evidenciar el fenómeno del polimorfismo, gracias a la estancia de C. T. Quirino, de la UAMX (México), se estudiaron las formas polimórficas de la tolbutamida, un hipoglucemiante oral, mediante espectrometría de absorción IR, la modificación de los ensayos de solubilidad (test de disolución) y técnicas de microscopía electrónica de barrido. Además se estudió la influencia que la presencia de metales (calcio, hierro, manganeso, magnesio...) cedidos por los envases pudiera tener sobre la aparición de las formas polimórficas (85, 86). Se puede concluir que cuando se produce esta cesión de calcio, en cantidades traza, contrariamente a lo que podría pensarse se favorece la formación del polimorfo más estable de la tolbutamida.

## RESUMEN

No podemos olvidar que en el desarrollo de toda esta labor ha sido posible gracias a las personas que actualmente están presentes y también a todas aquellas que en este periodo han trabajado en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales, se han formado en él o han completado su formación y con posterioridad han partido para ocupar puestos de relevancia en la Administración, en la industria farmacéutica, en hospitales de la red sanitaria nacional, o en otras universidades, tal es el caso de Silvia Muñoz Botella (Farmaeuropa, Estrasburgo, U.E.), Mohamed Sbai (Fez, Marruecos), Pablo Prados Ruano (París, Aventis), Carlos Tomás Quirino (UAM-X, Méjico), Andrés G. León Leal (U. de Los Andes, Mérida, Venezuela), Emiliano E. Romero Ale (INTI, Buenos Aires, Argentina).

Asimismo hemos de resaltar la fructífera relación que hemos mantenido y actualmente continúa con distintos grupos de investigación de universidades extranjeras, como los de los profesores Irene Noronha da Silveira (Universidad de Coimbra, Portugal), Willy R. G. Baeyens (Rije Universitat, Gante Bélgica), Lucette Bardet (Universidad de Montpellier, Francia), Dan A. Lerner (ENSCM, Montpellier, Francia), Kazuhiro Imai (Universidad de Tokio, Japón), S. Ait-Lyazidi (Universidad de Meknes, Fez, Marruecos), Alfredo Carabot (Uni-

versidad de Los Andes, Mérida, Venezuela), Rubén Manzo (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Toda esta labor no podría haberse llevado a cabo sin contar con el apoyo y la financiación a través de las diferentes convocatorias destinadas a Proyectos de Investigación, subvencionados por el Ministerio de Educación y Ciencia o anteriormente el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MEC/MCYT), así como diversos Proyectos de Investigación financiados por la propia Universidad Complutense y mas recientemente a través de la UCM-CAM. Asimismo, entidades privadas como los Laboratorios Glaxo (actualmente GSK) han contribuido a la formación de estudiantes predoctorales, a través de la concesión de becas o ayudas. Además, las estancias de investigadores en formación ha sido posible gracias a las Ayudas del MEC a través de los Programas de Formación de Doctores y Tecnólogos y de estancias en Régimen de Sabático para Profesores Extranjeros, becas concedidas por la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), o diferentes Programas del Ministerio de Asuntos Exteriores (ALE, Intercampus, etc...).

## REFERENCIAS

- (1) ORTEGA, M. Y DEL CASTILLO, B. (1973) *Afinidad*. 30: 651- 667.
- (2) DEL CASTILLO, B.; ORTEGA, M. AND BALLESTEROS, M. (1978) *Pharmacia Mediterranea*. 12: 161-171.
- (3) BALLESTEROS, M.; MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (1988) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 6: 191-197.
- (4) DEL CASTILLO, B.; BALLESTEROS, M. AND ORTEGA, M. (1979) *Il Farmaco*. 34: 107-113.
- (5) PENA, A.; CARMONA, A.; BARBOSA, A.; LINO, C.; SILVEIRA, I. AND DEL CASTILLO, B. (1998) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21: 839-845.
- (6) LIN, B.; BAHEYENS, W.R.G.; DEL CASTILLO, B.; IMAI, K.; DE MOERLOOSE, P. AND STRAGIER, K. (1989) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7: 1663-1670.
- (7) LIN, B.; DEL CASTILLO, B. Y BAHEYENS, W.R.G. (1990) *Anal. Real Acad. Farm.* 53: 223-232.
- (8) BERZAS, J.J.; DEL CASTILLO, B.; CASTAÑEDA, G. AND PINILLA, M.J. (1999) *Talanta*. 50: 261-268.
- (9) MARTÍN CARMONA, M.A. (1989) *Estudio espectrofluorimétrico de sales de quinozolinio y su empleo como marcadores fluorescentes*. Tesis doctoral. Universidad Complutense. Dirección: Benito del Castillo.
- (10) MARTÍN CARMONA, M.A.; DEL CASTILLO GARCÍA, B.; EZQUERRA, J. AND ÁLVAREZ-BUILLA, J. (1984) *Anal. Real Acad. Farm.* 50: 417-428.

- (11) MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; EZQUERRA, J. AND ALVAREZ-BUILLA, J. (1985) *Anal. Chim. Acta.* 170: 89-94.
- (12) MARTÍN, M.A.; BALLESTEROS, M. AND DEL CASTILLO, B. (1985) *Anal. Chim. Acta.* 170: 95-100.
- (13) MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (1991) *Anal. Chim. Acta.* 245: 217-223.
- (14) MARTÍN, M.A.; FRUTOS, G.; DEL CASTILLO, B.; ÁLVAREZ-BUILLA, J. AND MARTÍN, P.J. (1992) *J. Chemometrics.* 6: 1-10.
- (15) MARTÍN, P.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND CAYRE, I. (1988) *Anal. Chim. Acta.* 205: 129-137.
- (16) MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; LERNER, D.A.; EZQUERRA, J. AND ALVAREZ-BUILLA, J. (1988) *Anal. Chim. Acta.* 205: 117-127.
- (17) PRADOS RUANO, P. (1998) *Análisis de catecolaminas por quimioluminiscencia: desarrollo de un método y su aplicación a muestras biológicas.* Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Codirección: Kazuhiro Imai, Benito del Castillo, M. Antonia Martín.
- (18) PRADOS, P.; SANTA, T.; HOMMA, H.; DOI, H.; NARITA, H.; DEL CASTILLO, B.; MARTÍN, M.A. AND IMAI, K. (1997) *Biol. Pharm. Bull.* 20: 341-344.
- (19) PRADOS, P.; SANTA, T.; FUKUSHIMA, T.; HOMMA, H.; KASAI, C.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND IMAI, K. (1998) *Hypertens. Res.* 21: 147-153.
- (20) MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; LERNER, D.A.; EZQUERRA, J. AND ALVAREZ-BUILLA, J. (1988) *Anal. Chim. Acta.* 205: 117-127.
- (21) MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND MENÉNDEZ, J.C. (1991) *Anal. Lett.* 24: 1503-1515.
- (22) MARTÍN, M.A.; BOUIN, A.S.; MUÑOZ-BOTELLA, S. AND DEL CASTILLO, B. (2002) *Polycycl. Arom. Comp.* 22: 37-53.
- (23) MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND PRADOS, P. (1993) *Talanta.* 40: 1719-1723.
- (24) PRADOS, P.; MARTÍN, M.A. Y DEL CASTILLO, B. (1996) *Anal. Real Acad. Farm.* 62: 211-222.
- (25) DEL CASTILLO, B.; ALVAREZ-BUILLA, J. AND LERNER, D.A. (1991) *Fluorogenic Reagents and Fluorescent Probes* En W. R. G. BAEYENS, D. DE KEKULEIRE, K. KOR-KIDIS, (Editores) *Luminiscence Techniques of Chemical and Biochemical Analysis*, Editorial: Marcel Dekker Inc., Nueva York, pags. 73-139.
- (26) MARTÍN, M.A.; LIN, B. AND DEL CASTILLO, B. (1988) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 6: 573-583.
- (27) MUÑOZ BOTELLA, S. (1994) *Formación de complejos de inclusión entre retinoides y ciclodextrinas: Características, propiedades y ventajas analíticas* Tesis Doctoral, Universidad Complutense. Codirección: M. Antonia Martín, Benito del Castillo, Dan A. Lerner.
- (28) MUÑOZ-BOTELLA, S.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; LERNER, D.A. AND MENÉN-DEZ, J.C. (2002) *Anal. Chim. Acta.* 468: 161-170.
- (29) LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B. AND MUÑOZ-BOTELLA, S. (1989) *Anal. Chim. Acta.* 227: 297-301.
- (30) MUÑOZ-BOTELLA, S.; LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (1996) *Analyst.* 121: 1557-1560.
- (31) MUÑOZ-BOTELLA, S.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND LERNER, D.A. (1997) *J. Fluoresc.* 7: 243S-246S.

- (32) MUÑOZ-BOTELLA, S.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; MENÉNDEZ, J.C.; VÁZQUEZ, L. AND LERNER, D.A. (1996) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14: 909-915.
- (33) MUÑOZ-BOTELLA, S.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND VÁZQUEZ, L. (1996) *Biophys. J.* 71: 86-90.
- (34) SBAI, M. (1996) *Preparation et etude spectrophotometrique UV-VIS et spectrofluorimetrique de complexes d'inclusion d'alcaloides derives du carbazole avec des cyclodextrines*. Universite Moulay Ismail, Meknes (Marruecos). Codirección: M. Antonia Martín, Benito del Castillo, Dan A. Lerner.
- (35) SBAI, M.; AIT LYAZIDI, S.; LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (1996) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14: 959-965.
- (36) SBAI, M.; AIT LYAZIDI, S.; LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (1995) *Anal. Chim. Acta.* 303: 47-55.
- (37) SBAI, M.; AIT LYAZIDI, S.; LERNER, S.A.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (1996) *Analyst.* 121: 1561-1564.
- (38) SBAI, M.; AIT LYAZIDI, S.; LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (1997) *J. Fluoresc.* 7: 7S-10S.
- (39) SBAI, M.; AIT LYAZIDI, S.; LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (1997) *Biomed. Chromatogr.* 11: 89-90.
- (40) MARTÍN CARBAJO, M.L. (2007) *Determinación analítica de complejos de inclusión entre alcaloides derivados de  $\beta$ -carbolina y ciclodextrinas*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense. Codirección: M. Antonia Martín, Benito del Castillo.
- (41) MARTÍN, L.; MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (1997) *Analyst.* 122: 45-49.
- (42) MARTÍN, L.; MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (1997) *Biomed. Chromatogr.* 11: 87-88.
- (43) MARTÍN, L.; MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (1997) *J. Fluoresc.* 7: 95S-98S.
- (44) MARTÍN, L.; OLIVES, A.I.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (2005) *Luminescence.* 20: 152-161.
- (45) LERNER, D.A. AND MARTÍN, M.A. (2000) *Analysis.* 28: 649-663.
- (46) MUÑOZ-BOTELLA, D.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (1995) *Ars Pharmaceutica.* 36: 187-198.
- (47) MARTÍN, L.; LEÓN, A.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND MENÉNDEZ, J.C. (2003) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32: 991-1001.
- (48) LEÓN LEAL, A.; MARTÍN CARBAJO, L.; OLIVES BARBA, A.I.; MARTÍN CARMONA, M.A. Y DEL CASTILLO GARCÍA, B. (2004) *Anal. Real Acad. Farm.* 70: 681-693.
- (49) MARTÍN, L.; LEÓN, A.; OLIVES, A.I.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (2003) *Talanta.* 60: 493-503.
- (50) LEÓN LEAL, A.G. (2005) *Las ciclodextrinas como modificadores de las fases móviles en las separaciones por HPLC de los alcaloides derivados de  $\beta$ -carbolina. Aplicaciones analíticas y de impacto medioambiental*. Tesis doctoral, Universidad Complutense. Codirección: Benito del Castillo, M. Antonia Martín, Ana I. Olives.
- (51) LEÓN, A.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A. Y DEL CASTILLO, B. (2003) *Empleo de fases móviles modificadas con ciclodextrinas. Una alternativa para mejorar las separaciones de los alcaloides harmano y harmina por HPLC*. XXIX Reunión Bie-

- nal conmemorativa del centenario de la Real Sociedad Española de Química, Madrid, (España). Libro de resúmenes.
- (52) LEÓN, A.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (2003) *Enhanced Separation of  $\beta$ -Carboline Alkaloids by RP-HPLC Using Cyclodextrins as Mobile Phase Additives* 3rd Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques, Aguadulce, Almería (España). Abstract book.
- (53) LEÓN, A.G.; OLIVES, A.I.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (2004) *Molecular Recognition Of  $\beta$ -Carboline Alkaloids By Cyclodextrin Complex Formation Using HPLC With Fluorescence Detection. Evaluation Of The Association Constants*, International Symposium on Luminescence Spectrometry, ISLS 2004, Beijing (China). Abstract book.
- (54) LEÓN, A.G.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (2007) *J. Incl. Phenom. Macromol. Chem.* 57: 577-583.
- (55) LEÓN, A.G.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; VÁZQUEZ, L. AND MENÉNDEZ, J.C. (2004) *Study of the Inclusion Modes of Harmine and Harmine into Cyclodextrin Cavities*, Euroanalysis XIII, Salamanca (España). Abstract book.
- (56) PRADOS, J.L.; LEÓN, A.G.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (2005) *J. Photochem. Photobiol. A.* 173: 287-295.
- (57) OLIVES, A.I.; PRADOS, J.L.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (mayo, 2006) *Norharmine Cyclodextrin Inclusion Complexes as Sensitive pH Sensors*. 13th International Cyclodextrin Symposium, Torino (Italia). Abstract book.
- (58) PRADOS, J.L.; OLIVES, A.I.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (2006) *Luminescence.* 21: 379-380.
- (59) PRADOS RUANO, J.L. (2007) Trabajo de investigación (DEA), *Aplicaciones analíticas de los complejos de inclusión de norharmano y ciclodextrinas. Su utilidad como sensores fluorescentes para la detección de modificaciones en el microentorno celular*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense.
- (60) ROMERO ALE, E.E. (2004) Trabajo de investigación (DEA), *Influencia de las ciclodextrinas sobre la reactividad y las propiedades espectroscópicas de los reactivos fluorogénicos derivados de carbazol. Proyección en la determinación de aminas de interés farmacológico*. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense.
- (61) ROMERO-ALE, E.E.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; LÓPEZ-ALVARADO, P. AND MENÉNDEZ, J.C. (2005) *Luminescence.* 20: 162-169.
- (62) OLIVES, A.I.; ROMERO-ALE, E.E.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; LÓPEZ-ALVARADO, P. AND MENÉNDEZ, J.C. (2007) *J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.* 57: 553-559.
- (63) GONZÁLEZ-RUIZ, V.; SRIDHARAN, V.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND MENÉNDEZ, J.C. (2006) *Luminescence.* 21: 377-378.
- (64) DEL CASTILLO, B.; GARCÍA DE MARINA, A. AND MARTÍNEZ HONDUVILLA, M.P. (1980) *Ital. J. Biochemistry.* 29: 233-237.
- (65) GARCÍA DE MARINA, A.; RAMOS, A. Y DEL CASTILLO, B. (1985) *Anal. Inst. Nac. Inv. Agrarias.* (Serie Ganadera). 22: 13-22.
- (66) ROMERO-ALE, E.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; AGNESE, A.M.; ORTEGA, M.G.; NÚÑEZ-MONTOYA, S. AND CABRERA, J.L. (2002) *Ars Pharmaceutica.* 43: 57-71.

- (67) RECUENCO, I.; MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C.J. AND DEL CASTILLO, B. (1984) *Pharm. Med.* 2: 353-358.
- (68) DARDER, M.; DE PAULA, M.; MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C.J.; TORRES, M.; MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (mayo de 1993) *A New Spectrofluorimetric Method for the Determination of the Plant Hormone Abscisic Acid*. IV International Symposium On Quantitative Luminescence Spectrometry In Biomedical Sciences. I.U.P.A.C. Conference. Gante (Bélgica). Abstract book.
- (69) DARDER, M.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; DE PAULA, M.; MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C.J. AND TORRES, M. (mayo de 1993) *Interferences in the Determination of Abscisic Acid in Sunflower Seeds by Spectrofluorimetry*. IV International Symposium On Quantitative Luminescence Spectrometry In Biomedical Sciences. I.U.P.A.C. Conference. Gante (Bélgica). Abstract book.
- (70) VERDASCO, G.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; LÓPEZ-ALVARADO, P. AND MENÉNDEZ, J.C. (1995) *Analytica Chimica Acta*. 303: 73-78.
- (71) SRIDHARAN, V.; MARTÍN, M.A.; MENÉNDEZ, J.C. (2006) *Synlett*. 2375-2378.
- (72) OLIVES BARBA, A.I. (1996) *Incidencia de las características geológicas y medioambientales sobre la calidad de las aguas de los tramos superior y medio del río Arlanzón*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Codirección: Benito del Castillo, M. Esperanza Torija.
- (73) OLIVES BARBA, A.I.; DEL CASTILLO GARCIA, B. Y TORIJA ISASA, M.E. (septiembre 1994) *Determinación por E.A.A. de los niveles de cobre y cinc en las aguas del río Arlanzón (Burgos)*. XIV Reunión Nacional de Espectroscopia, Baeza (España). Libro de resúmenes.
- (74) OLIVES, A.I.; DEL CASTILLO, B. Y TORIJA, M.E. (1995) *Impacto ambiental de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn en las aguas del río Arlanzón (Burgos)*. *Determinación por E.A.A.* Reunión Científica Pluridisciplinar 150 Aniversario De La Facultad de Farmacia, Madrid. Libro de resúmenes.
- (75) OLIVES BARBA, A.I. Y TORIJA ISASA, M.E. (2002) *¿Por qué el río Arlanzón fluye próximo al ferrocarril minero Villafría-Bezares?* En M. MORENO GALLO (Coordinador): *El ferrocarril minero de Villafría a Monterrubio de la Demanda (Historia y Naturaleza)*. Publicaciones de la Excma. Diputación Provincial de Burgos, Salamanca (España). ISBN: 84-95874-07-5.
- (76) OLIVES BARBA, A.I.; TORIJA ISASA, M.E. Y DEL CASTILLO GARCÍA, B. (1993) *Estudio estacional de los niveles de hierro y manganeso en las aguas del río Arlanzón (Burgos)*. IX Congreso Nacional De Química, Sevilla (España). Libro de resúmenes.
- (77) OLIVES BARBA, A.I.; TORIJA ISASA, M.E. Y DEL CASTILLO GARCÍA, B. (1995) *Evolución estacional del contenido de cobalto, cromo, hierro, manganeso y níquel en las aguas del río Arlanzón (Burgos)*. *Determinación por E.A.A.* 7<sup>as</sup> Jornadas de Análisis Instrumental, Madrid (España). Libro de resúmenes.
- (78) OLIVES BARBA, A.I.; TORIJA ISASA, M.E. Y DEL CASTILLO GARCÍA, B. (1995) *Evolución estacional del contenido de cadmio y plomo en las aguas del río Arlanzón (Burgos)*. 2<sup>as</sup> Jornadas de Sanidad Ambiental, Granada (España). Libro de resúmenes.
- (79) MOLINA, J.A.; OLIVES, A.I.; DEL CASTILLO, B. Y TORIJA, M.E. (2003) *Lazaroa*, 24: 111-112.

- (80) MOLINA, J.A.; CASERMEIRO, M.A.; OLIVES BARBA, A.I. Y DE LA CRUZ CARAVACA, M.T. (2002) *Bol. Real Soc. Esp. de Historia Natural (Sección Biológica)*. 97: 19-26.
- (81) BALLESTEROS, M.; DEL CASTILLO, B.; MARTÍN M.C. AND ORTEGA, F. (2006) *Schiro-nia*. 5: 23-29.
- (82) ORTEGA, F.; BALLESTEROS, M.; MARTÍN M.C. AND DEL CASTILLO, B. (2006) *Educa-ción especializada en análisis de medicamentos*. I Congreso Internacional de Química Analítica Aplicada. Lima (Perú). Libro de resúmenes.
- (83) BARBA CARRETERO, S. (1996) *Métodos microscópicos (MEB) y espectroscópicos (IR) en el estudio de la litiasis renal. Valoración clínica y factores pronósticos experimentales*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Codirección: Benito del Castillo, José Luis Resel, Carlos Barba.
- (84) MARTÍN, L.; GRANERO, G.; ASENJO, M. J.; MARTÍN, M.A.; RÓDENAS, S. AND CUESTA, C. (mayo, 1998) *Study by HPLC-Fluorescence Detection of the Changes in the Composition of Tocopherol Derivatives Present in Sunflower Oil After Frying Process*, VIII International Symposium on Quantitative Luminescence Spec-trometry in Biomedical Analysis. Detection Techniques and Applications in Chromatography and Capillary Electrophoresis, Las Palmas de Gran Canaria (España). Abstract book.
- (85) OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND BARBA, C. (1996) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14: 1069-1076.
- (86) QUIRINO BARREDA, C.T. (2001) *Estudios de preformulación sobre los efectos del ion  $Ca^{+2}$  en la cristalización de la tolbutamida*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Codirección: Benito del Castillo y José Luis Lastres.