

# Estimació del coeficient de distribució octanol-aigua de compostos àcids mitjançant un sistema de cromatografia electrocinètica de microemulsions

## *Estimation of the octanol-water distribution coefficient of acidic compounds by a microemulsion electrokinetic chromatography system*

Alejandro Fernández-Pumarega,<sup>1,2</sup> Susana Amézqueta,<sup>1,2</sup> Elisabet Fuguet,<sup>1,2,3</sup> Martí Rosés<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universitat de Barcelona. Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica

<sup>2</sup> Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB)

<sup>3</sup> Pla Serra Hünter de la Generalitat de Catalunya

**Resum:** La lipofilicitat és una propietat clau en la caracterització fisicoquímica de substàncies bioactives, ja que determina la seva capacitat de penetració en membranes cel·lulars. El mètode habitual per mesurar el coeficient de distribució octanol-aigua és el *shake-flask*, que és llarg i tediós, i, per tant, s'han desenvolupat altres mètodes alternatius, entre els quals la cromatografia electrocinètica de microemulsions (MEEKC), que són capaços d'estimar aquest paràmetre per a substàncies neutres. En el present treball es demostra l'aplicabilitat del mètode MEEKC per a substàncies àcides parcialment ionitzades.

**Paraules clau:** Electroforesi capil·lar, MEEKC,  $\log D_{o/w}$ , lipofilicitat, cromatografia electrocinètica de microemulsions, microemulsió.

**Abstract:** Lipophilicity is a key property in the physicochemical characterization of bioactive substances, since it is linked to the ability of the compounds to penetrate cell membranes. The most usual procedure for determining the octanol-water distribution coefficient is the shake-flask method, which is tedious and time-consuming. Due to these drawbacks, alternative methods have been developed such as microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC), which is able to estimate this parameter for neutral substances. In this paper, the applicability of the method for partially ionized acidic substances is demonstrated.

**Keywords:** Capillary electrophoresis, MEEKC,  $\log D_{o/w}$ , lipophilicity, microemulsion electrokinetic chromatography, microemulsion.

## Introducció

**E**l descobriment i desenvolupament de nous fàrmacs és un procés llarg (normalment, de més de deu anys) i costós. Aquest procés parteix de milers de substàncies potencials, de les quals, en una primera etapa, s'analitzen les propietats fisicoquímiques, primer *in silico* (a partir de diferents programes de càlcul) i després *in vitro* (mitjançant mesures experimentals), i a continuació les que presenten les característiques més òptimes se sotmeten a la investigació preclínica i clínica (*in vivo*). En aquest llarg procés s'avaluen, entre d'altres, l'efectivitat i la toxicitat dels compostos per seleccionar els més adequats, que puguin ser aprovats i registrats com a medicaments per les entitats reguladores, com ara l'EMA a la UE i l'FDA als Estats Units

[1, 2]. Una de les propietats més importants que es considera durant l'etapa inicial de cribatge és la lipofilicitat, que es defineix com la capacitat que tenen els diferents soluts per dissoldre's en olis, greixos o dissolvent apolars. Com que les membranes cel·lulars estan formades principalment per una bicapa lipídica, es pot relacionar la lipofilicitat amb la capacitat que tenen els diferents compostos de travessar aquestes membranes i arribar a l'interior de la cèl·lula, on tindran la seva activitat terapèutica. Per tant, la lipofilicitat esdevé una característica fisicoquímica important en el desenvolupament de nous fàrmacs.

La lipofilicitat es pot avaluar utilitzant diferents paràmetres, el més àmpliament conegut i usat dels quals és el coeficient de partició octanol-aigua ( $P_{o/w}$ ), que mesura l'afinitat que presenten els compostos pels dos dissolvents del sistema (l'aigua, més polar, i l'octanol, més apolar). És a dir, el coeficient de partició octanol-aigua és la relació de concentracions en equilibri del compost en octanol i en aigua. Quan el compost pot estar en algun dels dos medis en més d'una forma, s'utilitza el coeficient de distribució ( $D_{o/w}$ ), que recull la suma de les

Correspondència: Alejandro Fernández-Pumarega  
Universitat de Barcelona. Facultat de Química. Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica  
C. de Martí i Franquès, 1-11. 08028 Barcelona  
Tel.: +34 934 021 797  
A/e: [a.fernandezpu@ub.edu](mailto:a.fernandezpu@ub.edu)

concentracions de les diferents formes en els dos medis. Així, per a un àcid HA, que pot estar més o menys ionitzat segons el pH del medi aquós:

$$P_{o/w} = \frac{[HA]_{n\text{-octanol}}}{[HA]_{\text{aigua}}} \quad [\text{Eq. 1}]$$

$$D_{o/w} = \frac{[HA]_{n\text{-octanol}}}{[HA]_{\text{aigua}} + [A^-]_{\text{aigua}}} \quad [\text{Eq. 2}]$$

La manera directa de determinar aquest paràmetre és el mètode de *shake-flask*, en què el compost es dissol en un recipient que conté tant octanol com fase aquosa i s'agita. A continuació, es determina la concentració del compost en estudi en cada una de les fases i es calcula el coeficient de partició/distribució octanol-aigua.

Com més lipòfil sigui un compost, més afinitat tindrà per la fase apolar del sistema i més gran serà el valor del coeficient de partició/distribució.

El mètode de *shake-flask* té un procediment laboriós i no està completament automatitzat, raons per les quals és interessant substituir-lo per mètodes alternatius, com ara l'ús de sistemes cromatogràfics, ja que alguns sistemes de cromatografia de líquids en fase invertida i de cromatografia electrocinètica de fases adequades presenten particions similars a la d'octanol-aigua. En aquests sistemes, els diferents compostos analitzats es particionen entre la fase mòbil i la fase estacionària en els sistemes basats en la cromatografia de líquids en fase invertida, i entre el tampó aquós i la fase pseudoestacionària en els sistemes basats en la cromatografia electrocinètica. Per tant, en tots els casos les substàncies es particionen entre dues fases immiscibles (una hidrofòbica i una aquosa). La fase apolar seria l'octanol en el mètode de *shake-flask* i la fase estacionària o pseudoestacionària en els mètodes cromatogràfics, i la polar, l'aigua en *shake-flask* i la fase mòbil en cromatografia.

Per estimar el valor de partició octanol-aigua a partir dels sistemes cromatogràfics, es correlaciona el logaritme del coeficient de partició octanol-aigua conegut de diferents soluts ( $\log P_{o/w}$ ) amb el logaritme del seu factor de retenció en el sistema cromatogràfic adient ( $\log k$ ). Aquesta correlació hauria de respondre a una equació lineal com la següent:

$$\log P_{o/w} = a + b \cdot \log k \quad [\text{Eq. 3}]$$

on  $a$  seria l'ordenada a l'origen i  $b$  el pendent de l'equació. Així, és possible estimar el valor de lipofilitat d'una nova substància a partir de la seva retenció en el sistema cromatogràfic adient.

El sistema amb el qual s'ha treballat en aquest estudi és un sistema basat en la cromatografia electrocinètica de microemulsions (MEEKC), que és una modalitat de l'electroforesi capil·lar. En l'electroforesi capil·lar, les diferents substàncies migren en funció de la seva relació massa/càrrega en ser injectades en un capil·lar ple de tampó aquós i aplicar una diferència de potencial entre els extrems del capil·lar.

Ara bé, en els sistemes basats en MEEKC, a la fase aquosa se li afegeix una microemulsió (fase pseudoestacionària) que presenta la seva pròpia mobilitat, ja que està carregada. Aleshores, els compostos no se separen només segons l'atracció electroestàtica, sinó també per la partició que experimenten entre la microemulsió i el tampó (la fase aquosa).

En el present treball, la fase pseudoestacionària està formada per un oli (heptà), un tensioactiu (dodecilsulfat de sodi, SDS) i un cotensioactiu (1-butanol). El tensioactiu i el cotensioactiu estableixen les petites gotes de l'oli, de manera que s'obté una microemulsió amb una estructura semblant a la de la figura 1.

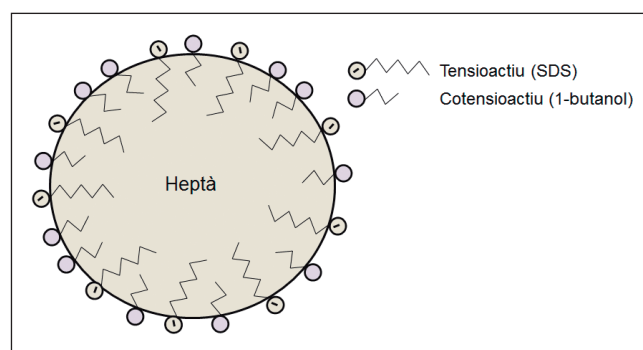


FIGURA 1. Estructura de la microemulsió.

Les gotes d'heptà i les parts apolars del tensioactiu i del cotensioactiu (les cues apolars) conformen el nucli de la microemulsió, mentre que els caps polars de l'SDS i de l'1-butanol es troben en contacte amb la fase aquosa i constitueixen la superfície de la microemulsió [3].

En estudis anteriors [4-6] s'ha vist que, per a substàncies neutres, aquesta microemulsió permet emular satisfactòriament

el sistema de partició octanol-aigua. Ara bé, com que la majoria de fàrmacs en el mercat són substàncies amb propietats àcid-base, en el present treball s'ha estudiat l'extensió del mètode per a substàncies àcides ionitzables.

## Teoria

La determinació del factor de retenció de compostos àcids és molt diferent a la de les substàncies neutres, ja que la mobilitat electroforètica d'un compost àcid parcialment o totalment ionitzat és el resultat de la contribució de dos factors principals [7]: a) la interacció hidrofòbica entre l'àcid i la microemulsió, i b) la mobilitat electroforètica de l'àcid per la seva atracció electroestàtica per l'ànode (elèctrode carregat positivament). La interacció electroestàtica entre la microemulsió i l'anàlit ionitzat es considera negligible, ja que els dos estan carregats negativament. Per tal de considerar únicament la primera de les dues contribucions, en el càlcul del factor de retenció s'ha de mesurar la mobilitat electroforètica de l'àcid en tampó sense microemulsió (electroforesi capil·lar en zona, CZE).

El factor de retenció ( $k_{\text{MEEKC}}$ ) es calcula a partir de l'equació següent:

$$k_{\text{MEEKC}} = \frac{\mu_{\text{MEEKC}} - \mu_{\text{CZE}}}{\mu_{\text{ME}} - \mu_{\text{MEEKC}}} \quad [\text{Eq. 4}]$$

on  $\mu_{\text{MEEKC}}$  és la mobilitat electroforètica del compost en MEEKC,  $\mu_{\text{ME}}$  és la mobilitat de la microemulsió (obtinguda mitjançant la mobilitat del marcador de la microemulsió, dodecanofenona) i  $\mu_{\text{CZE}}$  és la mobilitat electroforètica de l'àcid en CZE. En el cas de compostos neutres,  $\mu_{\text{CZE}}$  serà igual a 0.

Per calcular les mobilitats electroforètiques s'utilitza l'expressió matemàtica següent:

$$\mu = \left[ \frac{1}{t_r} - \frac{1}{t_0} \right] \cdot \left[ \frac{L_T \cdot L_D}{V} \right] \quad [\text{Eq. 5}]$$

on  $t_r$  és el temps de retenció de l'anàlit,  $t_0$  és el temps de retenció del marcador de flux electroosmòtic,  $L_T$  i  $L_D$  són, respectivament, la longitud total i efectiva del capil·lar i, finalment,  $V$  és la diferència de potencial aplicada.

En estudis paral·lels del grup de recerca, s'ha observat que la viscositat del tampó pot afectar la mobilitat electroforètica del compost. Per tant, com que s'està treballant amb solucions de naturalesa diferent (amb microemulsió i sense), s'ha introduït un factor de correcció de viscositats en la mobilitat en CZE [8].

## Part experimental

Per realitzar les mesures electroforètiques s'ha utilitzat una electroforesi capil·lar (G7100) equipada amb un detector d'UV-Vis d'Agilent Technologies (Santa Clara, Califòrnia, EUA). El capil·lar emprat, d'aproximadament 50  $\mu\text{m}$  de diàmetre intern, és de Polymicro Technologies (Lisle, Illinois, EUA).

Les anàlisis s'han dut a terme a diferents valors de pH en dos conjunts de solucions diferents: en microemulsió (anàlisi per MEEKC) i en tampó sense fase pseudoestacionària (anàlisi per CZE). Aquestes solucions s'han preparat en tampó de fosfat o acetat en funció del pH avaluat i a una força iònica 0,05 M.

Les anàlisis, en ambdós conjunts de solucions, s'han dut a terme a 25 °C, aplicant una diferència de potencial d'entre 8 i 15 kV i una pressió en la separació en l'interval 0-50 mbar, amb un capil·lar de 25 o 30 cm (en funció del pH) de longitud efectiva. En els dos casos el solut s'ha injectat aplicant una pressió de 50 mbar durant 5 s. La dodecanofenona s'ha usat com a marcador de la microemulsió (ja que es particiona totalment en la fase pseudoestacionària), i el dimetilsulfòxid (DMSO), com a marcador del flux electroosmòtic (és molt polar i pràcticament no es particiona en la fase estacionària). El ketoprofèn s'ha dissolt en una mescla de metanol/microemulsió (1:9) per a l'anàlisi en MEEKC, i en una mescla de metanol/aigua (1:9) per a l'anàlisi en CZE, a una concentració de 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

### Preparació de la microemulsió

La microemulsió s'ha preparat en tampó d'acetat o fosfat (en funció del pH desitjat) a una força iònica 0,05 M. Primer, es dissol el tensioactiu, en aquest cas l'SDS, a 1,30 % (m/v), després s'afegeix 1-butanol (el cotensioactiu) amb bureta i agitació magnètica constant fins a una concentració del 8,15 % (v/v) i, finalment, s'afegeix l'heptà fins a una concentració de l'1,15 % (v/v). La microemulsió s'agita i se sotmet a ultrasons fins que la solució deixa de ser tèrbola [6].

## Resultats i discussió

### Recta de calibratge

Per estimar el  $\log D_{o/w}$  de l'àcid model a diferents graus d'ionització, s'ha establert una recta de calibratge  $\log P_{o/w} - \log k_{MEEKC}$  amb 20 substàncies neutres que tenen valors de  $\log P_{o/w}$  coneguts i distribuïts uniformement al llarg del rang 0-4 [9, 10]. La recta de calibratge es mostra a continuació (figura 2):

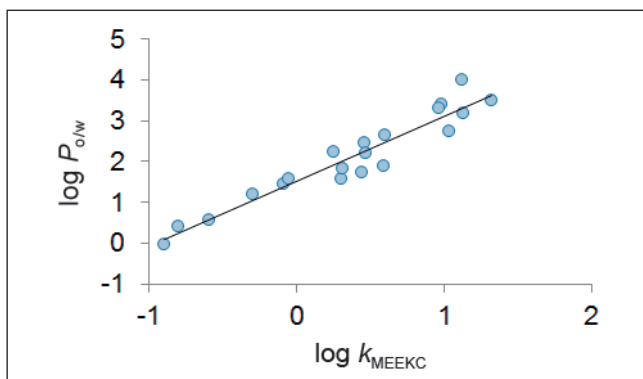


FIGURA 2.  $\log P_{o/w}$  vs.  $\log k_{MEEKC}$  de la recta de calibratge.

L'equació resultant és la següent:

$$\log P_{o/w} = 1,60 (\pm 0,11) \cdot \log k_{MEEKC} + 1,51 (\pm 0,08) \quad [\text{Eq. 6}]$$

Per tant, tal com s'ha vist en treballs anteriors [4-6], es pot concloure que és possible estimar el  $\log P_{o/w}$  de substàncies neutres a partir de mesures electrocinètiques.

Els paràmetres estadístics de l'equació 6 són:  $R^2 = 0,92$ ,  $DE = 0,33$ ,  $n = 20$  i  $F = 196$ , i indiquen una bona correlació entre els dos paràmetres.

### Estimació del $\log D_{o/w}$ d'àcids ionitzables

La substància que s'ha escollit com a model ha estat el ketoprofèn, un fàrmac antiinflamatori. S'ha escollit aquest compost perquè presenta un  $pK_a$  proper a 4 (dintre de l'interval de pH de treball electroforètic), presenta grups cromòfors (és detectable per UV-Vis) i té un comportament lipofílic conegut i estudiat en la bibliografia [11, 12].

El factor de retenció d'un compost àcid depèn del grau d'ionització ( $\alpha$ ) i del factor de retenció de les espècies neutra i to-

talment ionitzada de l'àcid (respectivament,  $k_{(HA)}$  i  $k_{(A^-)}$ ) segons l'equació següent [7]:

$$k = (1 - \alpha) \cdot k_{(HA)} + \alpha \cdot k_{(A^-)} \quad [\text{Eq. 7}]$$

El grau d'ionització ( $\alpha$ ) es calcula d'acord amb l'expressió matemàtica següent:

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH} - \text{p}K_a}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}} \quad [\text{Eq. 8}]$$

Combinant les equacions 7 i 8, s'obté:

$$k = \frac{k_{(HA)} + k_{(A^-)} \cdot 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}} \quad [\text{Eq. 9}]$$

Per estudiar l'aplicabilitat d'aquest mètode a substàncies àcides, s'ha mesurat el factor de retenció del ketoprofèn a diversos valors de pH (entre 2,0 i 7,0, incloent-hi tots els graus d'ionització de l'àcid). L'equació 9 s'ha ajustat als valors experimentals i s'ha obtingut el perfil k-pH de l'àcid model (figura 3).

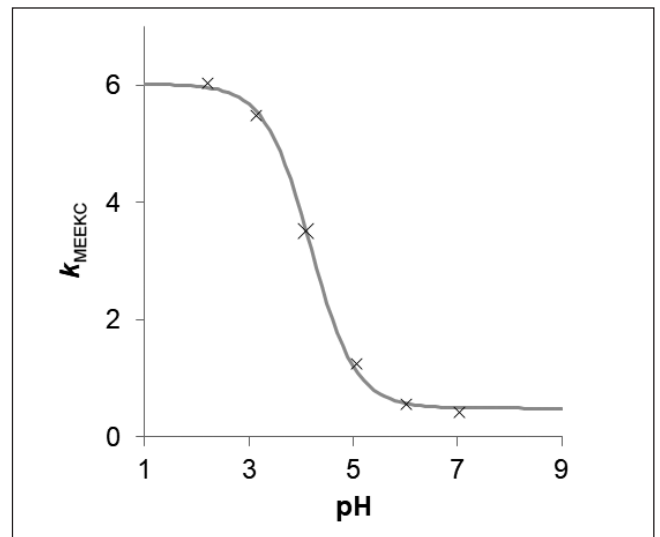


FIGURA 3. Perfil k-pH del ketoprofèn.

Els paràmetres obtinguts a partir de l'ajust són:  $k_{(HA)} = 6,02 (\pm 0,09)$ ;  $k_{(A^-)} = 0,49 (\pm 0,07)$ ;  $pK_a = 4,18 (\pm 0,04)$ ; ( $R^2 = 0,999$ ;  $F = 1474$ ;  $DE = 0,10$ ), que indiquen un bon ajust de l'equació 9 a les dades experimentals.

A continuació, a partir de  $k_{(HA)}$  i  $k_{(A^-)}$  (obtinguts a partir de l'ajust) i de la recta de calibratge (equació 6), s'ha estimat el

logaritme de la partició octanol-aigua de l'espècie neutra i totalment ionitzada de l'àcid (respectivament,  $\log D_{o/w(HA)} = 2,76$  i  $\log D_{o/w(A^-)} = 1,01$ ). Tal com el factor de retenció, el coeficient de distribució octanol-aigua també depèn del grau d'ionització del compost, segons l'equació següent:

$$D_{o/w} = (1 - \alpha) \cdot P_{o/w(HA)} + \alpha \cdot P_{o/w(A^-)} \quad [\text{Eq. 10}]$$

Finalment, a partir de l'equació 10, i considerant el  $pK_a$  del compost de 4,18 (ajust de l'equació 9), és possible estimar el  $\log D_{o/w}$  del ketoprofèn a qualsevol valor de pH. Així, s'han comparat les dades estimades a partir d'aquest mètode ( $\log D_{est}$ ) amb les determinades en la bibliografia a partir de mètodes tradicionals ( $\log D_{bibl}$ ) [11, 12] (taula 1).

TAULA 1. Diferències entre els valors estimats ( $\log D_{est}$ ) i els de la bibliografia ( $\log D_{bibl}$ ).

pH	$\log D_{bibl}$	$\alpha$	$D_{est}$	$\log D_{est}$	$\log D_{bibl} - \log D_{est}$
2,0	3,12	0,007	566,66	2,75	0,37
4,5	2,53	0,676	191,57	2,28	0,25
5,5	1,8	0,954	35,86	1,55	0,2
6,5	0,8	0,995	12,95	1,11	-0,3
7,4	0,1	0,999	10,62	1,03	-0,9
7,4	-0,25	0,999	10,62	1,03	-1,28

Les diferències entre els valors estimats i els de la bibliografia són més petits que 0,4 unitats de  $\log D_{o/w}$  quan l'àcid està en forma neutra o parcialment ionitzat. En canvi, quan l'àcid es troba altament o totalment ionitzat (> 99,5 %), les diferències entre els dos paràmetres són més elevades. Aquest fet pot ser degut a la formació de parells iònics de naturalesa diversa que modificarien les mobilitats electroforètiques, ja que les dades estimades i les obtingudes de la bibliografia s'han determinat en condicions experimentals diferents (tampons diferents i concentracions de tampó diferents), o a la baixa retenció de l'espècie totalment ionitzada (errors més elevats en el càlcul de  $k$ ).

## Conclusions

A partir del sistema de MEEKC presentat en aquest estudi, és possible determinar el coeficient de distribució octanol-aigua d'espècies àcides neutres i parcialment ionitzades (fins al 99,5 %) d'una manera acurada, ràpida i automatitzada.

## Agraïments

Alejandro Fernández-Pumarega dona gràcies a la Universitat de Barcelona per la seva beca predoctoral APIF. També agraïm el suport financer del Ministeri d'Economia i Competitivitat (CTQ2017-88179-P) i del Govern català (SGR 2017- 1074).

## Referències i altres fonts

- [1] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *Learn about drug and device approvals* [en línia]. <<https://www.fda.gov/ForPatients/Approvals/default.htm>> [Consulta: 9 abril 2018].
- [2] AGÈNCIA EUROPEA DE MEDICAMENTS (EMA). <<http://www.ema.europa.eu/ema/>> [Consulta: 9 abril 2018].
- [3] RYAN, R.; ALTRIA, K; MCEVOY, E; DONEGAN, S.; POWER, J. «A review of developments in the methodology and application of microemulsion electrokinetic chromatography». *Electrophoresis*, vol. 34 (2013), p. 159-177.
- [4] ISHIHAMA, Y.; ODA, Y.; UCHIKAWA, K.; ASAKAWA, N. «Evaluation of solute hydrophobicity by microemulsion electrokinetic chromatography». *Analytical Chemistry*, vol. 67 (1995), p. 1588-1595.
- [5] ABRAHAM, M. H.; TREINER, C.; ROSES, M.; RAFOLS, C.; ISHIHAMA, Y. «Linear free energy relationship analysis of microemulsion electrokinetic chromatographic determination of lipophilicity». *Journal of Chromatography A*, vol. 752 (1996), p. 243-249.
- [6] SUBIRATS, X.; YUAN, H. P.; CHAVES, V.; MARZAL, N.; ROSÉS, M. «Microemulsion electrokinetic chromatography as a suitable tool for lipophilicity determination of acidic, neutral, and basic compounds». *Electrophoresis*, vol. 37 (2016), p. 2010-2016.
- [7] KHALEDI, M. G.; SMITH, S. C.; STRASTERS, J. K. «Micellar electrokinetic capillary chromatography of acidic solutes - migration behavior and optimization strategies». *Analytical Chemistry*, vol. 63 (1991), p. 1820-1830.
- [8] FERNÁNDEZ-PUMAREGA, A.; AMÉZQUETA, S.; FUGUET, E.; ROSÉS, M. [Manuscrit en preparació (2018)]
- [9] ANDRÉS, A.; ROSÉS, M.; RAFOLS, C.; BOSCH, E.; ESPINOSA, S.; SEGARRA, V.; HUERTA, J. M. «Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients ( $\log D$ ) from low drug amounts». *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 76 (2015), p. 181-191.
- [10] AVDEEF, A. *Absorption and drug development: solubility, permeability, and charge state*. Hoboken (Nova Jersey): John Wiley & Sons, 2012 (segona edició), p. 201.

[11] LA ROTONDA, M. I.; AMATO, G.; BARBATO, F.; SILIPO, C.; VITTORIA, A. «Relationships between octanol-water partition data, chromatographic indices and their dependence on pH in a set of nonsteroidal anti-inflammatory drugs». *Quantitative Structure-Activity Relationships*, vol. 2 (1983), p. 168-173.

[12] WINIWARTER, S.; BONHAM, N. M.; AX, F.; HALLBERG, A.; LENNERNÄS, H.; KARLÉN, A. «Correlation of human jejunal permeability (*in vivo*) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach». *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 41 (1998), p. 4939-4949.



A. Fernández-Pumarega



S. Amézqueta



E. Fuguet



M. Rosés

**Alejandro Fernández-Pumarega** és llicenciat en química per la Universitat Autònoma de Barcelona. Actualment està fent la tesi doctoral a la Universitat de Barcelona, on també va realitzar el Màster de Química Analítica. La seva tesi doctoral es basa en la química analítica aplicada al medi ambient i a l'àmbit farmacèutic.

**Susana Amézqueta** és llicenciada en química i doctora per la Universitat de Navarra. Actualment és professora lectora de la Universitat de Barcelona. La seva recerca se centra en la química analítica aplicada als camps de la farmàcia, la biomedicina, el medi ambient i els aliments.

**Elisabet Fuguet i Jordà** és llicenciada en química i doctora per la Universitat de Barcelona. Actualment és professora agregada Serra Húnter de la Secció de Química Analítica de la Universitat de Barcelona. La seva recerca se centra en la química analítica aplicada als camps de la farmàcia, la biomedicina, el medi ambient i els aliments.

**Martí Rosés** és doctor en ciències químiques i catedràtic de química analítica a la Universitat de Barcelona. La seva recerca se centra en l'estudi dels processos fonamentals de retenció i migració en cromatografia de líquids i electroforesi capil·lar i, en particular, en la seva aplicació a la caracterització fisicoquímica de fàrmacs en el procés de *drug discovery*. Té prop de dues-centes publicacions científiques i un índex *h* de 46 (WOS).