

**EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
DE POLI(ETIL-2-CIANOACRILATO)
CON NÚCLEO MAGNÉTICO COMO
SISTEMAS DE LIBERACIÓN
CONTROLADA DEL ANTINEOPLÁSICO
5-FLUOROURACILO**



**DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**

UNIVERSIDAD DE GRANADA

TESIS DOCTORAL

José Luis Arias Mediano

Granada, 2003

**EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
DE POLI(ETIL-2-CIANOACRILATO)
CON NÚCLEO MAGNÉTICO COMO
SISTEMAS DE LIBERACIÓN
CONTROLADA DEL ANTINEOPLÁSICO
5-FLUOROURACILO**



**DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

TESIS DOCTORAL

José Luis Arias Mediano

Granada, 2003

D^a. Visitación Gallardo Lara, Profesora Titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada, y D. Ángel V. Delgado Mora, Catedrático del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada,

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación que se presenta en esta memoria, titulado

**EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE
POLI(ETIL-2-CIANOACRILATO) CON NÚCLEO MAGNÉTICO
COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DEL
ANTINEOPLÁSICO 5-FLUOROURACILO**

ha sido realizado en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Física Aplicada de la Universidad de Granada, bajo nuestra dirección, por el Licenciado D. José Luis Arias Mediano, y constituye su Tesis Doctoral.

Con esta fecha autorizamos su presentación ante la Comisión de Doctorado de la Universidad de Granada.

Granada, 9 de abril de 2003.

Fdo. Visitación Gallardo Lara.

Fdo.: Ángel V. Delgado Mora.

El doctorando,

José Luis Arias Mediano

A mi madre Rita María
A la memoria de mi abuelo Juan

Este trabajo de investigación no podría haberse realizado sin la colaboración de las personas que a continuación se indican. Llegado este momento, aprovecho para mostrarles mi más sincera gratitud.

En primer lugar al Dr. Ángel V. Delgado Mora, por su ayuda incansable, paciencia y sabio consejo. Su ejemplo ha sido fundamental en mi formación como investigador.

A la Dra. Visitación Gallardo Lara, por su seguimiento y orientación. Gracias a ella no he olvidado mis raíces farmacéuticas.

Al Dr. Fernando González Caballero, por su confianza en mi investigación y tratarme “casi” como a un físico más.

Al Dr. Juan de Dios García Durán, por su desinteresada ayuda siempre que lo he necesitado.

Al “futuro” Dr. Salvador A Gómez-Lopera, compañero de viaje en el fascinante mundo de los transportadores magnéticos coloidales. Su apoyo y amistad han facilitado todo.

A mis compañeros: Juan de Vicente, María del Mar, Marisa, Mari Carmen, Paco, Julián, Modesto, Manuel, Silvia, Cecilia, Juan, Rosario y Arturo, por su ayuda y compañerismo.

A mi madre Rjta María. Baste decir que si he llegado hasta aquí ha sido gracias a ella.

A mis tíos Ángel y Concha, y primos Carmen y Manuel, por convertirme en uno más desde mi llegada a Granada. Nunca podré agradecerles lo suficiente todo lo que me han dado estos años.

Al resto de mi familia: mi padre José, mi hermana Rjta María, mi abuela Rjta, mis tíos Juan Pedro y Rosa, y primos Juampe y Rosilla. De ellos también es este trabajo.

La gota horada la piedra, no por la fuerza, sino cayendo a menudo

OVIDIO.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: Introducción 1

1.1. Generalidades.....	3
1.2. Contribución del trabajo propuesto.....	15
1.3. Objetivos	16

CAPÍTULO 2: Síntesis y caracterización de partículas compuestas de núcleo magnético y recubrimiento polimérico biodegradable 19

2.1. Síntesis y estudio morfológico.....	21
2.1.1. Magnetita.....	21
a) Metodología de la síntesis.....	21
b) Aspectos físicos y químicos de la reacción.....	24
c) Forma y tamaño.....	28
2.1.2. Poli(etil-2-cianoacrilato).....	30
a) Aspectos generales de la síntesis.....	30
b) Metodología.....	33
c) Análisis de las reacciones de síntesis.....	34
d) Forma y tamaño.....	36
2.1.3. Partículas compuestas.....	37
a) Metodología de la síntesis.....	38
b) Forma y tamaño.....	39
2.2. Estructura y composición química.....	43
2.2.1. Superficie específica.....	43
a) Fundamentos teóricos.....	43
b) Metodología experimental y resultados	46

2.2.2. Difractometría de rayos X	48
a) Fundamentos teóricos	48
b) Metodología experimental y resultados	50
2.2.3. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier	52
a) Fundamentos teóricos	52
b) Metodología experimental	53
c) Interpretación del espectro	53
2.2.4. Resonancia magnética nuclear	57
a) Fundamentos teóricos	57
b) RMN de protones (^1H -RMN)	58
c) RMN de carbono 13 (^{13}C -RMN)	61
2.2.5. Espectrometría de masas de ión secundario	63
a) Fundamentos teóricos	63
b) Metodología experimental y resultados	65
2.2.6. Propiedades magnéticas	67
a) Fundamentos teóricos	67
b) Metodología experimental y resultados	70

CAPÍTULO 3: Propiedades eléctricas superficiales..... 77

3.1. Introducción	79
3.2. Descripción clásica de la doble capa eléctrica	80
3.3. Fenómenos electrocinéticos. Potencial zeta	88
3.3.1. Electroforesis: teoría elemental	89
3.3.2. Electroforesis: tratamientos más elaborados	96
3.4. Metodología experimental	98
3.5. Efecto del pH y de la fuerza iónica sobre la movilidad electroforética	99
3.6. Estabilidad de las propiedades eléctricas superficiales	103
3.6.1. Estabilidad del recubrimiento polimérico	103
3.6.2. Magnetita	105

CAPÍTULO 4: Termodinámica superficial..... 111

4.1. Introducción	111
4.2. Interacciones superficiales	112
4.2.1. Interacciones dispersivas	112
4.2.2. Interacciones no-DLVO.....	115
4.2.3. Contribuciones a la energía libre superficial. Teoría de van Oss, Good y cols.....	117
4.3. Metodología experimental	123
4.4. Componentes de la energía libre superficial de las nanopartículas.....	128
4.5. Análisis de la naturaleza hidrófila/hidrófoba	129
4.6. Mecanismo de formación de la capa de polímero en las partículas compuestas	131

**CAPÍTULO 5: Evaluación de la capacidad de vehiculización de
5-fluorouracilo 133**

5.1. Introducción	135
5.2. 5-fluorouracilo: generalidades	137
5.3. Determinación experimental de la absorción.....	142
5.3.1. Fundamentos teóricos	142
5.3.2. Absorbancia óptica de las disoluciones de 5-fluorouracilo.....	145
5.3.3. Influencia de la exposición a la luz ambiental	150
5.3.4. Influencia del pH del medio de polimerización	152
a) Sobre la estabilidad del 5-fluorouracilo	152
b) Sobre la estabilidad del poli(etil-2-cianoacrilato).....	154
5.3.5. Justificación de la metodología de determinación de la incorporación de fármaco.....	164
5.3.6. Otros ensayos de determinación del 5-fluorouracilo incorporado	173
5.4. Incorporación superficial del 5-fluorouracilo	177
5.4.1. Determinación espectrofotométrica	177
5.4.2. Determinación electroforética.....	179

5.5. Incorporación del 5-fluorouracilo a la matriz polimérica.....	181
5.5.1. Efecto de la concentración de etil-2-cianoacrilato	182
5.5.2. Efecto de la concentración de dextrano-70	185
5.5.3. Efecto de la concentración de HCl	187
5.5.4. Efecto de la concentración de 5-fluorouracilo.....	191
5.5.5. Incorporación en condiciones óptimas	193
5.6. Incorporación del 5-fluorouracilo en las partículas compuestas	197
CAPÍTULO 6: Conclusiones	203
CAPÍTULO 7: Bibliografía	211

Capítulo 1.
INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES.

La actividad biológica de un principio activo depende fundamentalmente de la naturaleza de la interacción entre éste y el tejido diana. Sin embargo, para poder ejercer dicho efecto, el fármaco debe estar presente en su lugar de acción en cantidad suficiente como para provocar la respuesta deseada. Por lo tanto, es esencial que sea liberado en el lugar apropiado del organismo a una velocidad adecuada. Esto puede controlarse mediante el modo en que el principio activo es preparado (formulado) antes de su administración como medicamento: todas las formas de dosificación contienen excipientes que, aunque por sí mismos carecen de actividad biológica, aportan unas características al medicamento que facilitan su proceso de fabricación y, lo que es más importante, pueden modificar la manera en la que el fármaco interacciona con el organismo. La obtención de medicamentos a partir de los principios activos es, por lo tanto, un amplio e importante campo dentro de las ciencias farmacéuticas que incorpora elementos de la Ingeniería y Ciencia de los Materiales, de la Química Física, de la Ciencia de Polímeros, de la Química de Disoluciones y de la Bioquímica, entre otros.

Aunque la mayoría de los principios activos son administrados mediante formas de dosificación convencionales (tabletas, cápsulas, disoluciones inyectables, etc.), determinados tipos de fármacos precisan otras formas adecuadas a sus características. La necesidad de mantener una concentración de fármaco que garantice y mantenga un efecto terapéutico, implica la administración crónica de estas formas de dosificación convencionales. Sin embargo, esta pauta de tratamiento puede constituir un inconveniente para el paciente y podrá provocar un bajo índice de cumplimiento terapéutico. Además, la administración crónica puede provocar considerables fluctuaciones en las concentraciones sanguíneas de fármaco entre dosis, pudiendo dar lugar a efectos adversos tóxicos o a una respuesta inapropiada cuando los niveles se encuentran en un máximo o en un mínimo, respectivamente. Una forma de resolver estos problemas es el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos que garanticen una

velocidad de liberación constante (o casi constante) durante un período de tiempo prolongado.

Por otro lado, no sólo se produce la difusión del fármaco dentro del tejido de interés, sino que una proporción importante se distribuirá por otras zonas del organismo. Esto puede provocar su acción en regiones diferentes a las deseadas, aumentando así la probabilidad de aparición de reacciones adversas. Además, la concentración de fármaco en el lugar de acción será baja, debido a una distribución inapropiada o a una pobre absorción. Por lo tanto, es preferible la concentración del fármaco en el tejido o células de interés antes que su libre distribución por el sistema circulatorio.

Un ejemplo de la importancia de lograr la localización de la acción de un fármaco es el tratamiento de tumores sólidos. Entre las diferentes formas de tratamiento, la farmacoterapia intenta explotar las diferencias entre las células sanas y las cancerosas, además de permitir la selectividad tóxica frente a tumores. Sin embargo, debido a la similitud intrínseca entre estas células, a menudo es sólo posible explotar la rápida velocidad de división de estas células tumorales, no pudiéndose desarrollar fármacos que reconozcan características bioquímicas específicas que no se encuentren en un tejido sano. Estos fármacos, conocidos como agentes citotóxicos, destruyen las células que se encuentran en una fase de división rápida. Desgraciadamente, las células sanas que también están en fase de rápida división (células del intestino, de los folículos pilosos, de la médula ósea, de los testículos y del feto) también se ven afectadas. Además un problema importante de los tumores sólidos es que el fármaco debe estar presente en una concentración suficientemente alta como para penetrar en el tumor. Por lo tanto, el desarrollo de sistemas que maximicen la concentración de fármaco en las cercanías del tumor constituye una alternativa prometedora para solventar eficazmente estos problemas.

Mediante el uso apropiado de sistemas transportadores de fármaco se puede lograr la concentración de éste en una región específica del organismo y su

liberación modificada. Los sistemas dispersos han sido extensamente utilizados con ambos fines, particularmente para lograr la localización específica. Estas formas de dosificación son sistemas coloidales, que están constituidos por suspensiones acuosas de partículas que contienen fármacos y que, generalmente, se administran mediante inyección. Las características que debe cumplir un sistema coloidal para poder ser utilizado son (1):

1. El fármaco debe acumularse selectivamente en el lugar de acción requerido, con concentraciones residuales muy pequeñas en la circulación.
2. Las partículas portadoras deben ser capaces de transportar una cantidad apropiada de fármaco.
3. El fármaco debe liberarse a una velocidad adecuada en el lugar de acción.
4. El coloide debe ser estable *in vitro* y en su tránsito al lugar requerido *in vivo*.
5. El sistema debe presentar una toxicidad e inmunogenicidad mínimas, además de ser biodegradable para prevenir su acumulación.
6. El sistema debe ser relativamente simple de producir a gran escala.
7. Las autoridades sanitarias deben reconocer los materiales que constituyen el coloide como no tóxicos.

Tras su administración como sistema inyectable, el destino de las partículas coloidales en el sistema circulatorio dependerá de la vía de administración y del tamaño y características superficiales de las partículas (1).

En cuanto a la vía de administración, a pesar de indicarse a menudo la administración intraarterial como un método para dirigir los principios activos a los órganos objetivo, diversos riesgos asociados con esta ruta hacen que la administración intravenosa, intramuscular o subcutánea sean preferibles en la gran mayoría de los casos.

Respecto al tamaño, las partículas con un diámetro superior a unas 7 μm se acumularán en los pulmones, ya que estos órganos poseen la primera red de capilares que se encontrarán las partículas. Por lo tanto, las partículas más grandes quedarán atrapadas en los capilares sanguíneos de diámetro pequeño. Sin embargo, las partículas de pequeño tamaño serán retiradas de la circulación sanguínea principalmente por el sistema inmune. Este sistema comprende una serie de procesos muy complejos e interactivos, cuya misión es la de proteger al organismo de los cuerpos extraños que lo invaden. Los tejidos y células responsables de la retirada física de las partículas de la circulación constituyen el sistema fagocítico mononuclear (SFM). Este sistema representa la principal barrera para el uso de sistemas coloidales transportadores de fármacos, ya que cualquier coloide inyectado será captado y eliminado de la circulación rápidamente. Esto puede ser aprovechado en el tratamiento de las enfermedades donde el objetivo terapéutico son las células del propio sistema inmune, por ejemplo: lepra, tuberculosis, leishmaniosis y leptospirosis.

Para que se produzca el reconocimiento por el SFM y los macrófagos realicen la fagocitosis, se requiere una fase previa en la que son importantes el tamaño, la carga superficial y la naturaleza química del coloide. Esta fase previa recibe el nombre de opsonización y en ella están implicados determinados componentes de la sangre (opsoninas) que interaccionarán con la superficie del coloide, haciéndolo menos hidrófilo y, por lo tanto, más susceptible de ser captado por el SFM. A pesar de ser difícil, es posible prevenir (o retrasar) el proceso de opsonización mediante la modificación de las características superficiales de las partículas. La utilización de tensioactivos para recubrir las partículas coloidales permitirá hacer que sean más hidrófilas, lo que retrasará su reconocimiento por el SFM y generará una estabilización estérica que reducirá la adhesión partícula-macrófago.

Otro problema a salvar es la necesidad que tienen las partículas de abandonar la circulación sanguínea para penetrar en el órgano diana. Esta salida de la circulación general se conoce como extravasación. Sin embargo, si las

partículas van a ser retenidas de forma física en la red capilar del órgano y se produce la liberación lenta del fármaco, la extravasación no es un problema, ya que el fármaco difundirá a través de los capilares mientras las partículas quedan atrapadas en el sistema sanguíneo.

Dentro de los diferentes sistemas coloidales diseñados para el transporte específico de fármacos destacan, por sus grandes posibilidades, los transportadores magnéticos coloidales. La Tecnología de Transportadores Magnéticos se originó en la década de 1940 a partir de estudios sobre el tratamiento de aguas residuales, donde se pretendía absorber materia orgánica en pequeñas partículas de magnetita y separar magnéticamente la magnetita cargada de materia orgánica del resto de líquido procesado. Dentro de las aplicaciones biológicas de esta tecnología destacan el tratamiento de aguas residuales, la inmovilización enzimática, la separación magnética por afinidad de biomoléculas, la selección de un tipo de células entre una población celular, el transporte de fármacos y los biosensores (2).

Con el desarrollo de los métodos físicos y químicos para la caracterización del óxido de hierro coloidal durante la década de los 60, comenzaron a aparecer las primeras aplicaciones biomédicas de los “fluidos magnéticos” en radiodiagnóstico (3) y emboloterapia (4). La aparición de microcápsulas magnéticas como soportes de moléculas biológicas (5, 6) dio lugar al uso de matrices y de numerosos recubrimientos poliméricos biológicos (7) y sintéticos (8), para ser utilizados como transportadores magnéticos en dispositivos biomédicos, agentes de contraste superparamagnéticos orales (9) e intravenosos (10), y transportadores de fármaco (11-13).

Los principales beneficios de estos sistemas dentro del campo terapéutico (13) son la eliminación de reacciones adversas que frecuentemente derivan de la distribución sistémica de los fármacos y la posibilidad de reducir la dosis precisa de un agente terapéutico por peso corporal, disminuyendo los posibles efectos adversos derivados de las dosis tradicionales. Además, se solucionan los

problemas de inestabilidad en los fluidos biológicos o *in vivo* del fármaco (14); podríamos pensar, por ejemplo, en la utilidad de estos sistemas en la terapia antiparkinsoniana, como vehículos que faciliten el paso de la levodopa a través de la barrera hematoencefálica para poder llegar a su lugar de acción en el cerebro y evitar la degradación de ésta en el resto del organismo. Por otro lado, el reconocimiento y eliminación del sistema coloidal por el SFM se verá retrasado, al estar concentradas las partículas en un lugar determinado del organismo por acción de un campo magnético, que impedirá su libre distribución. Así, las partículas verán retrasada su llegada al hígado.

Las características que idealmente debe tener un transportador magnético de fármaco son (13):

1. Pequeño tamaño (inferior a 1.4 μm), para permitir la distribución a nivel capilar y la perfusión uniforme al lugar de carga deseado.
2. Una respuesta magnética adecuada a los campos y gradientes magnéticos técnicamente alcanzables, a la velocidad de flujo presente en los sistemas fisiológicos.
3. Capacidad para transportar una amplia variedad de agentes terapéuticos, en cuantía suficiente para permitir un transporte adecuado de cantidades biológicamente activas, sin hacer que el organismo se cargue demasiado de material magnetizable.
4. Velocidad de liberación de fármaco controlable (o predecible) en el lugar deseado.
5. Propiedades superficiales que permitan una máxima biocompatibilidad y una mínima antigenicidad.
6. Biodegradabilidad, con eliminación y toxicidad mínima de los productos de degradación.

La acción del fármaco liberado de un transportador magnético en el lugar diana puede desarrollarse mediante varios mecanismos (15):

- El fármaco es liberado del transportador detenido por el campo magnético en la pared del vaso y ejerce su acción según su mecanismo de acción habitual.
- El fármaco (de carácter enzimático) actúa al mismo tiempo que está unido al transportador inmovilizado en la pared del vaso.
- El fármaco es transportado junto con su transportador desde el vaso sanguíneo directamente al tejido o a las células objetivo.

Los microtransportadores magnéticos de fármaco pueden diferenciarse en dos categorías principales según el origen de su recubrimiento (14):

- Celular: Eritrocitos, neutrófilos y linfocitos.
- Sintético:
 - Capsular: Matriz de nanocápsulas, matriz de microcápsulas y microcápsulas reservorias.
 - Vesicular: Emulsiones y liposomas.

La utilización de microtransportadores celulares magnéticos fue sugerida inicialmente por Zimmerman (7); en este sentido los eritrocitos pueden comportarse como microrreservorios de un sistema de liberación lento (16) y la técnica preferida para su obtención es la diálisis hipotónica (17, 18).

Las nanocápsulas magnéticas pueden prepararse mediante la polimerización del correspondiente monómero [p.ej.: alquilocianoacrilato (19) o glutaraldehído (20)] en presencia de las partículas magnéticas. La matriz de tipo microcápsula magnética se prepara mediante la adición de una mezcla acuosa caliente de albúmina (12) o almidón (21, 22), partículas de magnetita y el fármaco, en una fase oleosa en agitación continua, y enfriando a una temperatura de 20 °C o inferior. El tamaño de partícula puede controlarse en un intervalo amplio, y la ultrasonicación permite la preparación de microcápsulas en el rango de tamaño de 0.2 a 2 μm . La preparación de microcápsulas reservorias se realiza,

entre otros métodos, mediante coacervación. De esta manera se obtienen microcápsulas grandes (200 a 500 μm) y las partículas magnéticas presentes en la mezcla inicial pueden tener hasta 1.6 μm .

Las emulsiones magnéticas o/w se obtienen mediante la utilización de magnetita en ácido oleico (23) o en oleato de etilo (23-25) como fase dispersa. Proteínas como la caseína, la albúmina sérica bovina o la gelatina pueden utilizarse como estabilizadores en la fase continua acuosa. Los liposomas magnéticos (26, 27) se preparan mediante la evaporación de una dispersión en cloroformo o éter de un lípido y partículas de magnetita, y la hidratación de la capa lípido/magnetita con un buffer.

Los componentes magnéticos más utilizados son el hierro, la magnetita y la ferrita de bario, altamente dispersados. La seguridad de la magnetita y la ferrita de bario finamente dispersadas es bien conocida (28). La toxicidad de la magnetita ha demostrado ser muy baja [DL_{50} en ratas: 400 mg/kg (29)] y es un material bien tolerado por el organismo humano (30). Además, la magnetita recubierta de polímero no ha provocado una toxicidad aguda o subaguda en animales de experimentación (29). Con respecto a su biodegradación, se ha demostrado que si las partículas de magnetita son muy pequeñas (superparamagnéticas), ésta tendrá lugar en los lisosomas de las células del SFM generándose hierro libre, que se unirá finalmente a la ferritina y la transferrina (31). En el caso de las partículas sintetizadas en este trabajo, con un diámetro medio de 80 nm (ver más adelante), este proceso probablemente no degradará la cantidad total de magnetita y la mayoría de las partículas permanecerán en el organismo, siendo eliminadas fundamentalmente mediante filtración renal (31).

Los fármacos utilizados en el transporte magnéticamente controlado pueden clasificarse según su peso molecular en fármacos de peso molecular bajo (inferior a 1000 Da) y, en péptidos y proteínas (superior a 1000 Da). En la Tabla 1 se indican algunos ejemplos de estudios sobre la utilización de

microtransportadores magnéticos de fármaco. Los anticancerígenos que más han sido microencapsulados son la adriamicina (8, 32-36), la doxorubicina (37-39) y la plasmina (21, 22) en albúmina; la dactinomicina (19) y el conjugado poli-L-lisina-metotrexato (20) en poliglutaraldehído; la mitomicina C (40, 41) en etilcelulosa; la metilCCNu (25) en emulsiones; y la inulina (27) en liposomas. Los eritrocitos magnéticos también han sido utilizados para el transporte local de acetilsalicilato para prevenir la agregación plaquetaria (42) y, para el transporte de diclofenaco sódico para tratar las articulaciones inflamadas doloridas (18, 43). Entre los fármacos de elevado peso molecular en los que ha sido ensayado un guiado magnético destacan la insulina y, otros péptidos y proteínas con posible uso en endocrinología (44-46).

La eficacia terapéutica de un sistema de liberación modificada depende del mecanismo y velocidad de liberación del fármaco en el lugar diana. Hasta ahora, la eficacia de los transportadores vesiculares y celulares está limitada por problemas relacionados con el pobre arrastre magnético, la baja estabilidad y la rápida liberación *in vivo*. A pesar de que estos sistemas de transporte desarrollan algunas propiedades deseables como la biodegradabilidad y la no inmunogenicidad, su ejecución *in vivo* debe ser mejor estudiada. También, la reactividad química y la no degradabilidad de los componentes utilizados en la preparación de algunas nanocápsulas magnéticas, parecen complicar su aprobación para el transporte intravascular (12).

Se ha demostrado el potencial de las microcápsulas magnéticas en el tratamiento experimental en pacientes con carcinomas (47-52), tumor de vejiga (53) y hepatomas (54). Las microcápsulas de albúmina magnéticas han resultado ser eficaces en el tratamiento del sarcoma de Yoshida trasplantado en ratas (38, 55, 56).

Por otro lado, la oclusión de los vasos sanguíneos de un tumor mediante embolización permite la eliminación de este sin necesidad de intervención quirúrgica. Entre los diferentes agentes oclusivos, se ha investigado la utilización

de micropartículas magnéticas para el tratamiento de los aneurismas intracraneales (4) y de los hipernefromas (57). Se ha demostrado que los coloides magnéticos son superiores a otros agentes que, principalmente, obliteran los vasos sanguíneos principales y producen una circulación colateral (58). Para alcanzar la diminuta red vascular de los vasos sanguíneos pueden utilizarse pequeñas partículas, pero éstas pasarán más fácilmente a través de las desviaciones arteriovenosas dando lugar a una embolización pulmonar o de otro tipo, indeseables (58). La administración magnéticamente controlada de partículas de hierro carbonilo (59), microesferas de ferropolisacárido (58) y microcápsulas de etilcelulosa magnética (40), representa una alternativa eficaz para confinar las partículas magnéticas en los vasos sanguíneos diana. El efecto terapéutico de los preparados coloidales para embolización puede potenciarse mediante un calentamiento inducido de las partículas magnéticas, para calentar selectivamente el tumor (54).

Tabla 1: Ejemplos de estudios sobre el uso de transportadores magnéticos coloidales.

Fármaco / Resultados	Diana	Transportador magnético / Núcleo magnético	Campo magnético (Gauss)	Refs.
Inulina / Localización en el tumor	Sarcoma de Yoshida (rata)	Liposomas / Magnetita (20 %)	2000 – 6000	26
Azul brillante FCF / Localización en la región diana tras 2 horas	Cáncer esofágico (conejo)	Gránulos bioadhesivos / Ferrita (50 %)	1900	60
Doxorrubicina / Remisión total en el 75 % de los animales	Sarcoma de Yoshida (rata)	Microcápsulas de albúmina / Magnetita	5500	38
Mitomicina C / Remisión completa	Tumor de vesícula VX2 (conejo)	Microcápsulas de etilcelulosa / Ferrita de zinc (16 - 50 %)	3500	50, 53
Doxorrubicina / Aumento supervivencia un 44 %	Metástasis de pulmón AH 7974 (rata)	Microcápsulas de albúmina / Magnetita (47 %)	6000	61
Hierro / Porcentaje alto de supervivencia	Hepatoma (ensayo clínico)	Microcápsulas de polisacárido	-	54
Hierro / Convalecencia sin reacciones adversas durante un año	Hipernefroma (ensayo clínico)	Ferrosilicona	-	57

En cuanto al campo magnético aplicado, se cree que posee unas propiedades biotrópicas responsables de una acción antiinflamatoria, analgésica e hipotensora y de unos efectos positivos sobre la homeostasis, el metabolismo y la reparación de los tejidos dañados (15, 28).

El proceso de guiado magnético de este tipo de transportadores está basado en el equilibrio entre las fuerzas ejercidas sobre el microtransportador por el flujo sanguíneo y la fuerza de un campo magnético aplicado externamente. La localización de las partículas *in vitro* está determinada por la relación entre la fuerza (\vec{F}), el gradiente del campo magnético ($\nabla\vec{B}$) y la imanación de las partículas (\vec{M}), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\vec{F} = \vec{M} \cdot \nabla\vec{B} \quad (1)$$

Cuanto mayor sea la imanación de saturación (M_s) de las partículas, menor será el campo magnético precisado para la retención del microtransportador magnético, y mayor será la eficacia del guiado magnético. A pesar de que el comportamiento de las partículas magnéticas en los líquidos viene dado por ecuaciones ferrohodinámicas (62), diversos factores biológicos pueden afectar a las características farmacodinámicas del transportador *in vivo*. En particular, el reconocimiento de las partículas por las células del sistema reticuloendotelial generalmente provoca la localización no específica del fármaco en el hígado y otros órganos de este sistema.

Para el transporte magnéticamente controlado de fármaco y la emboloterapia, el transportador magnético puede ser retenido en el órgano diana si las fuerzas magnéticas contrarrestan las velocidades de flujo lineal de la sangre en el tejido vascular (> 10 cm/s en las arterias, > 0.05 cm/s en los capilares) (63). Se ha sugerido que a velocidades de flujo sanguíneo arteriocapilar de $0.05 - 0.1$ cm/s, un campo magnético aplicado de 0.8 T es suficiente para permitir la localización deseada del 100 % de un transportador magnético que contenga un 20 % de

magnetita (13). Generalmente, el campo magnético es aplicado directamente sobre el tumor o el tejido diana durante al menos 10 minutos.

Las microcápsulas magnéticas también permiten el transporte rítmico de péptidos mediante el control de la difusión desde el transportador. El desarrollo de microcápsulas para la liberación controlada de moléculas grandes ($M_R > 1000$ Da) es aún un objetivo primordial en el transporte de fármacos. Se ha demostrado que la velocidad de liberación puede incrementarse más de 30 veces mediante sistemas poliméricos de fármaco que contienen nanopartículas magnéticas expuestas a un campo magnético externo oscilatorio (44). El mecanismo puede implicar el desplazamiento de las cadenas poliméricas con (45), o sin (46) la entrada de agua, la cual induce una mayor disolución del fármaco.

Diversos factores influyen en la distribución tisular de este tipo de transportadores (64, 65). Parámetros como el tamaño, que afecta a la biodistribución de transportadores de fármaco no magnéticos, influyen igualmente en el guiado de transportadores magnéticos. El tamaño parece ser un factor crítico en la localización de las microcápsulas magnéticas de 3 μm en el pulmón, y la distribución de las partículas de 1 μm en el hígado, el bazo y los riñones no se ve afectada por la intensidad del campo magnético (66). Otros estudios (40, 67) sugieren que los transportadores magnéticos pueden ser dirigidos mediante campos magnéticos inferiores a 0.8 T.

Otra forma de incrementar la respuesta magnética es aumentar el contenido magnético de las microcápsulas. Sin embargo, esta aproximación está limitada por la reducción proporcional en contenido de fármaco (32) y, en el caso de los eritrocitos y otras células sanguíneas, por la resistencia al shock osmótico y la turbulencia (43).

La evaluación experimental de la distribución tisular de este tipo de transportadores ha sido fundamentalmente documentada mediante la utilización

de microcápsulas de albúmina que contienen en torno a un 20 % de partículas de magnetita (63). Por ejemplo, comparado con la disolución de adriamicina de administración intravenosa, se ha demostrado que la administración intrarterial de un 1 % de la dosis normal de este fármaco mediante microcápsulas magnéticas de albúmina en presencia de un campo de 0.8 T logra la misma concentración de fármaco en el lugar diana (67). A excepción de los polímeros bioadhesivos y de las microcápsulas de etilcelulosa, todos los experimentos han sido realizados con campos externos inferiores a 0.4 T y se han observado diferentes perfiles farmacocinéticos y de distribución según el tamaño de partícula, el tipo de campo magnético y la profundidad y permeabilidad del lugar diana (63, 68).

Se ha demostrado que se puede lograr un incremento de entre 8 y 25 veces en la concentración de fármaco en el tejido diana con un tercio de la dosis convencional administrada. Sin embargo, el uso de transportadores magnéticos está restringido por la necesidad de un campo magnético (con intensidad de campo apropiada, gradientes de campo constantes y con la geometría adecuada), y por las dificultades propias del acceso al lugar diana (63, 69).

1.2. CONTRIBUCIÓN DEL TRABAJO PROPUESTO.

En el ámbito de la Tecnología de los Transportadores Magnéticos, la contribución esencial de este trabajo es el diseño de un sistema de liberación controlada constituido por un núcleo magnético y un recubrimiento polimérico biodegradable, que permita el transporte magnéticamente controlado de un fármaco anticancerígeno hasta el órgano diana de interés. En principio, usando este tipo de sistemas se minimizarán las reacciones adversas derivadas de la distribución sistémica y de la baja especificidad del fármaco, y se precisarán dosis inferiores para lograr el mismo efecto terapéutico. Este campo de investigación es amplio y está en rápido crecimiento, por lo que un trabajo como el que proponemos ha de centrarse en algunos aspectos concretos del mismo.

Específicamente, creemos que nuestra investigación podría contribuir en los siguientes aspectos:

- Síntesis y estudio morfológico de las partículas compuestas de núcleo magnético (magnetita) y recubrimiento polimérico biodegradable [poli(etil-2-cianoacrilato), PE-2-CA].
- Determinación de la estructura, composición química y propiedades magnéticas de este tipo de partículas, y caracterización eléctrica y termodinámica superficial de las mismas.
- Análisis de la capacidad de las partículas poliméricas y compuestas como transportadores de fármaco, en concreto del antineoplásico 5-fluorouracilo.

1.3. OBJETIVOS.

En este trabajo de investigación pretendemos alcanzar los siguientes objetivos:

1. Síntesis de partículas compuestas de un núcleo magnético (magnetita) y un recubrimiento polimérico biodegradable (PE-2-CA). Nos basaremos en el método de polimerización en emulsión utilizado previamente en la obtención del polímero. Se investigarán la forma, tamaño, propiedades magnéticas, composición química y estructura, de las partículas sintetizadas. Se analizarán las condiciones (proporción monómero:magnetita) en las que se obtenga el mejor recubrimiento, la máxima homogeneidad de tamaño y una redispersabilidad adecuada.
-

-
2. Estudio comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de las partículas compuestas con las de sus componentes, magnetita y PE-2-CA, mediante electroforesis. Estudio de la estabilidad de las propiedades eléctricas superficiales.
 3. Análisis comparativo de las propiedades termodinámicas superficiales de los tres tipos de partículas, mediante la determinación del ángulo de contacto de líquidos seleccionados. Uso de modelos teóricos para evaluar dichas propiedades. Estudio de la naturaleza hidrófila/hidrófoba de las partículas, e investigación del mecanismo de formación del revestimiento polimérico de los núcleos magnéticos.
 4. Estudio de la influencia de las condiciones de manipulación y conservación (concentración, pH, temperatura y exposición a la luz ambiental) de las disoluciones de 5-fluorouracilo sobre su estabilidad y su perfil espectrofotométrico. Determinación del coeficiente de absorción molar del antineoplásico.
 5. Diseño de una metodología reproducible de determinación de la incorporación de fármaco en nuestros materiales, basada en técnicas espectrofotométricas.
 6. Determinación de la capacidad de incorporación de 5-fluorouracilo por las partículas poliméricas mediante medidas espectrofotométricas y de movilidad electroforética. Análisis de la contribución de la superficie y de la matriz polimérica a esta captación de fármaco. Estudio de la influencia de las condiciones de polimerización (concentración de fármaco, HCl, agentes estabilizantes y monómero) sobre la capacidad de vehiculización y las características de las suspensiones obtenidas.
-

7. Análisis de la incorporación de 5-fluorouracilo bajo las condiciones óptimas de síntesis por las partículas poliméricas y compuestas. Estudio comparativo con otros sistemas transportadores.
-

Capítulo 2.
SÍNTESIS Y
CARACTERIZACIÓN DE
PARTÍCULAS COMPUESTAS
DE NÚCLEO MAGNÉTICO Y
RECUBRIMIENTO POLIMÉRICO
BIODEGRADABLE

2.1. SÍNTESIS Y ESTUDIO MORFOLÓGICO.

2.1.1. Magnetita.

a) Metodología de la síntesis.

La magnetita ($Fe^{2+}Fe^{3+}O_4$) es uno de los óxidos más abundantes y extendidos. Se ha encontrado en diversos entornos geológicos y en algunos depósitos en cantidad suficiente como para constituir un mineral de hierro importante (70). En organismos vivos como las abejas, los delfines, las palomas o los microorganismos se han encontrado pequeños dominios individuales ferromagnéticos (31).

Los procedimientos de síntesis desarrollados para la preparación de magnetita pueden clasificarse principalmente en tres categorías (71):

- Métodos secos: generalmente deben realizarse a altas temperaturas (de 200 °C a 1500 °C).
 - Oxidación de hierro metálico por oxígeno u otros agentes oxidantes.
 - Desproporción de óxido ferroso.
 - Descomposición de diferentes sales férricas o ferrosas.
 - Envejecimiento de mezclas estequiométricas de hidróxidos férricos y ferrosos en medio acuoso.
 - Oxidación parcial de suspensiones acuosas de hidróxido ferroso con diferentes agentes oxidantes.
-

En nuestro trabajo vamos a seguir el método desarrollado por Sugimoto y Matijević (71) que permite la obtención de partículas de magnetita de morfología bien definida y distribución estrecha de tamaños, según las condiciones de reacción utilizadas. Esta técnica se basa en la precipitación de hidróxido ferroso amorfo y posterior envejecimiento del gel acuoso a 90 °C en presencia de ion nitrato, dando lugar a la formación de magnetita.

En nuestro proceso de síntesis quedan claramente definidas cuatro etapas:

1. Preparación del gel de hidróxido ferroso.

Para su formación partimos de una disolución constituida por 2.5 mL de KOH 5 M (KOH para análisis, Merck, Alemania), 25 mL de KNO₃ 2 M (KNO₃ para análisis, Merck, Alemania) y 216 mL de agua (agua ultrapura obtenida del dispositivo Milli-Q Academic, MILLIPORE). Para garantizar la formación exclusiva de hidróxido ferroso purgamos el agua empleada durante 15 minutos con nitrógeno para expulsar el oxígeno disuelto. Por otro lado, se preparó una disolución 1 M de FeSO₄, utilizando para ello 100 mL de agua ultrapura purgada previamente con N₂ durante 15 minutos, 27.8 g de FeSO₄·H₂O (FeSO₄·H₂O purísimo, Panreac Química, S. A., España), cuya deshidratación se fuerza inicialmente con 0.1 mL de H₂SO₄ 1:1 en agua (H₂SO₄ 96 % purísimo, Panreac, S. A., España).

Ambas disoluciones se mantuvieron durante 2 horas bajo una corriente de N₂ para eliminar el O₂ disuelto. Una vez transcurrido este periodo se tomaron 6.5 mL de la disolución de FeSO₄ 1 M y se añadieron a la otra disolución, observándose la formación inmediata del gel de hidróxido ferroso Fe(OH)₂ de color verde oscuro. Antes de pasar a la siguiente etapa, a este gel se le hizo pasar de nuevo una corriente de N₂ durante 10 minutos. Con el desplazamiento del O₂ disuelto por el N₂, pretendemos evitar la formación de goetita [FeO(OH)] como subproducto de la reacción.

2. Envejecimiento del gel.

Esta fase se llevó a cabo en un baño de aceite (Memmert, Alemania) precalentado a $90\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. El período de envejecimiento fue de 4 horas y tras su finalización se detuvo la reacción en frío.

3. Limpieza de la suspensión y separación de las partículas no deseadas.

La separación de las partículas de magnetita de las de goetita se puede realizar mediante ultrasonidos, sedimentación diferencial o mediante el uso de un imán permanente. En nuestra rutina de limpieza, tanto la eliminación de los iones no deseados producto de la síntesis, como la separación de las partículas de magnetita y de goetita se realizan al mismo tiempo. La técnica consiste en la repetición sucesiva de las siguientes operaciones: agitación manual de la suspensión, redispersión en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos (Ultrasons, J. P. Selecta, S. A.), sedimentación sobre imán permanente de 0.42 T, extracción del sobrenadante y sustitución con agua ultrapura.

Los primeros sobrenadantes obtenidos son de color amarillo verdoso (o amarillo anaranjado); este color nos revela la presencia de goetita que no ha sido atraída por el imán ya que posee baja susceptibilidad magnética. Es importante tener en cuenta que en la sedimentación magnética hay que dejar el tiempo suficiente para que todas las partículas de magnetita sedimenten, incluso las más pequeñas. Este proceso de limpieza fue controlado midiendo la conductividad del sobrenadante con un conductímetro digital (Conductimeter 525, Crison) y se consideró finalizado cuando la conductividad eléctrica del sobrenadante era inferior a $2\text{ }\mu\text{S/cm}$.

4. Secado y almacenamiento de las partículas.

Una vez que la suspensión está limpia, procedimos a secar las partículas para su almacenamiento. El secado se realizó en una estufa con circulación forzada de aire (Digitronic, J. P. Selecta, S. A.) a 60 °C. Las partículas secas se almacenaron en recipientes de polietileno y, posteriormente, se mantuvieron en un desecador para evitar la exposición de las partículas a la humedad. De esta manera evitamos en lo posible la fácil oxidación de la magnetita de tamaño coloidal en el aire o en suspensión neutra o alcalina por quimisorción de oxígeno.

b) Aspectos físicos y químicos de la reacción.

La complejidad de las reacciones y la sensibilidad a las condiciones experimentales de los procesos de precipitación y recristalización en los que están implicados los oxihidróxidos férricos y la magnetita, hacen necesario un análisis pormenorizado de esta síntesis. Esta sensibilidad es debida en parte a la hidrolizabilidad extrema del ión férrico, particularmente a altas temperaturas, y a la variedad de complejos de este catión con diferentes aniones. Además, no debería sorprender que la corrosión y el endurecimiento puedan producirse por muchos caminos alternativos, dando lugar a numerosos productos de diversa conformación, morfología y dispersidad.

❖ Aspectos físicos.

Respecto a la morfología, bajo nuestras condiciones de síntesis (exceso de Fe^{2+}) se produce la formación de partículas esféricas como consecuencia de un mecanismo de coagulación. Las partículas muy pequeñas nucleadas en el gel de $\text{Fe}(\text{OH})_2$, primero se agregan y por un mecanismo de contacto/recristalización dan lugar a las partículas de mayor tamaño. La adición de nuevas partículas a las esferas ya cristalizadas provocará la continuación del crecimiento. Si la reacción hubiera tenido lugar bajo un exceso de OH^- se habrían obtenido partículas cúbicas

con una constitución bien definida, lo que sugeriría un mecanismo de crecimiento cristalino directo.

La coagulación de las primeras partículas de magnetita resulta de las fuerzas magnéticas y de Van der Waals bajo condiciones de repulsión débil. En presencia de exceso de especies ferrosas (Fe^{2+}), la repulsión electrostática entre las partículas de pequeño tamaño es pequeña o despreciable y, en consecuencia, se espera la fácil coagulación de las partículas iniciales muy pequeñas.

La uniformidad de las esferas de magnetita obtenidas puede entenderse si consideramos el papel del $\text{Fe}(\text{OH})_2$ en el proceso de cristalización. Parece que las primeras partículas generadas se acumulan (en su formación) en la superficie de las plaquetas de $\text{Fe}(\text{OH})_2$, donde se agregan y recrystalizan. Las partículas de magnetita de mayor tamaño quedan atrapadas en el gel y crecen mediante la atracción de las partículas pequeñas, recién generadas, que las rodean. Cuando dejan de existir pequeñas partículas en las proximidades de las partículas grandes, éstas dejan de crecer. En su lugar, se formarán nuevas partículas donde se localicen clusters de unidades finamente dispersadas. Además, al agotarse la cantidad de gel $\text{Fe}(\text{OH})_2$, no podrá realizarse más nucleación o agregación de magnetita. Por lo tanto, los sólidos más uniformes se obtendrán en medios estabilizados y, cualquier agitación podrá afectar la agregación de las partículas y, consecuentemente, la distribución de tamaños final.

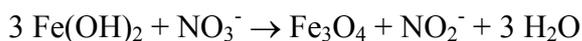
El exceso de concentración de Fe^{2+} afecta al diámetro modal, a la distribución de tamaños y a la rugosidad superficial de las partículas de magnetita finales. En sistemas donde hay un exceso de Fe^{2+} , la distribución final de tamaños es bastante estrecha a pesar de que hay un cambio bastante dramático en el diámetro modal por encima de un intervalo de concentración muy pequeño de exceso de FeSO_4 . Este cambio está asociado con una variación igualmente intensa en el pH por encima de las mismas condiciones establecidas. Este marcado incremento de pH por encima del punto isoeléctrico provocará la carga de las partículas iniciales de magnetita, además de prevenir su agregación.

El cambio en el tamaño de partícula y el ensanchamiento de la distribución de tamaños que ocurre al aumentar la concentración en exceso de Fe^{2+} , es debido a la competencia entre el crecimiento de las partículas provocado por la adhesión de las partículas iniciales de magnetita a los agregados ya formados y la agregación de las partículas ya crecidas. A excesos muy pequeños de soluto Fe^{2+} , como es nuestro caso ($[\text{Fe}^{+2}]_{\text{exceso}} = 0.001 \text{ M}$), las partículas grandes de varias distribuciones de tamaño se forman únicamente mediante un crecimiento rápido de adhesión como el ya descrito. De esta forma, se consigue una reducción del tamaño de partícula y de su distribución, una morfología esférica, un aumento de la velocidad de conversión del gel de $\text{Fe}(\text{OH})_2$ y la generación de menos goetita. A mayor concentración de Fe^{2+} , la velocidad de formación de magnetita se ralentiza y podrá producirse el crecimiento simultáneo de las agrupaciones más pequeñas, dando lugar a partículas más grandes mediante adhesión y coagulación, particularmente en vista de la mayor fuerza iónica del medio. Esto justifica el ensanchamiento de la distribución de tamaños y el incremento de la rugosidad superficial de las partículas de magnetita finales.

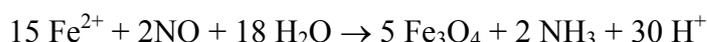
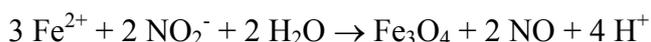
En cuanto al color, el $\text{Fe}(\text{OH})_2$ (originalmente blanco) se vuelve verde cuando adsorbe incluso una pequeña cantidad de O_2 . Esto es lo que observamos en nuestra síntesis a pesar de haber purgado las disoluciones con N_2 y, por lo tanto, cabía la posibilidad de formación de goetita, como así ocurrió. Además, a temperatura ambiente el color del gel cambia al añadirse KNO_3 : ante un exceso de FeSO_4 , como es nuestro caso, el sólido se vuelve verde oscuro.

❖ Aspectos químicos.

A continuación, mostramos un resumen de las reacciones, incluyendo los pasos intermedios, para la oxidación de $\text{Fe}(\text{OH})_2$ a magnetita mediante las interacciones con NO_3^- (71):



y para la correspondiente oxidación de Fe^{2+} en disolución a magnetita:



La velocidad de formación de la magnetita también se ve afectada por la concentración de KNO_3 en la mezcla. Una concentración inferior a 10^{-1} M ralentiza el crecimiento, mientras que una concentración superior no acelera significativamente el proceso. De esta manera, se evita la formación de partículas de gran tamaño. El KNO_3 se reduce a amoníaco por el Fe(OH)_2 , y de esta manera controla la reacción porque, de agotarse, no habría ninguna especie que se redujera en la reacción redox. Sin embargo, el Fe(OH)_2 en disoluciones neutras o débilmente alcalinas es incapaz de reducir nitratos a nitritos, pero esta reducción puede producirse con la cooperación de oxígeno. De esta manera, el Fe(OH)_2 activo está en forma de peroxihidróxido ferroso (Fig. 1) mediante la absorción de oxígeno.

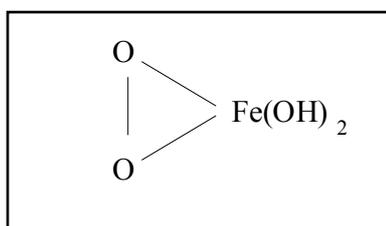


Fig. 1: Representación del peroxihidróxido ferroso.

El nitrito producido mediante la reducción de nitrato continúa su reducción a amoníaco por el Fe(OH)_2 hidratado. Mientras tanto, el oxígeno liberado en la reacción del peroxihidróxido ferroso con nitrato puede reaccionar de nuevo con

$\text{Fe}(\text{OH})_2$. Por lo tanto, una pequeña cantidad de oxígeno juega el papel de catalizador en la iniciación y mantenimiento del proceso redox. El proceso de cristalización que da lugar a magnetita debe implicar la oxidación de los iones Fe^{2+} . Durante el periodo de tiempo en el que cristaliza la mayor parte de la magnetita, el pH se mantiene esencialmente constante o se reduce ligeramente. Simultáneamente, la cantidad de gel continúa decreciendo. Además, el hierro que constituye la magnetita debe generarse principalmente a partir del gel $\text{Fe}(\text{OH})_2$. En el transcurso del proceso, el sistema entero está supersaturado con respecto a magnetita, pero poco saturado con respecto a $\text{Fe}(\text{OH})_2$. Este último continúa disolviéndose y como consecuencia se mantiene un cuasiequilibrio provocando la casi constancia del pH. Una vez que la mayor parte del $\text{Fe}(\text{OH})_2$ se ha disuelto, el hierro necesario para el posterior incremento en el contenido de magnetita debe ser aportado por solutos complejos. Esto podrá provocar un descenso del pH.

Un medio fuertemente oxidante ($\text{KNO}_3 + \text{O}_2$) provocará la precipitación simultánea de magnetita y goetita [$\text{FeO}(\text{OH})$]; esta es la razón de que intentemos la eliminación del O_2 disuelto mediante purgado con N_2 para buscar la formación exclusiva de magnetita. Todos los factores que impidan la disolución del gel, también reducirán la fracción de goetita en los sólidos recristalizados, excepto en un medio fuertemente alcalino donde la goetita se genera de forma rápida y exclusiva. La goetita acicular se genera principalmente en aquellos sistemas que sufren una hidrólisis lenta.

c) Forma y tamaño.

Las condiciones establecidas para la síntesis de magnetita discutidas anteriormente, nos permiten predecir la forma esférica de las partículas de magnetita y el pequeño tamaño de éstas (del orden de nanómetros). Esto se confirma al observar las fotografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) obtenidas en el Centro de Instrumentación Científica de la UGR, que presentamos en la Fig. 2a. Antes de su observación, una suspensión diluida de las partículas [en torno al 0.1 % (p/v)] fue sonicada durante 5 minutos y se

depositaron unas gotas en rejillas de cobre con película de formvar. A continuación, se secaron a 40 °C en un horno de convección. A pesar de las condiciones de la síntesis, se produjo la formación de goetita acicular (Fig. 2b) como subproducto.

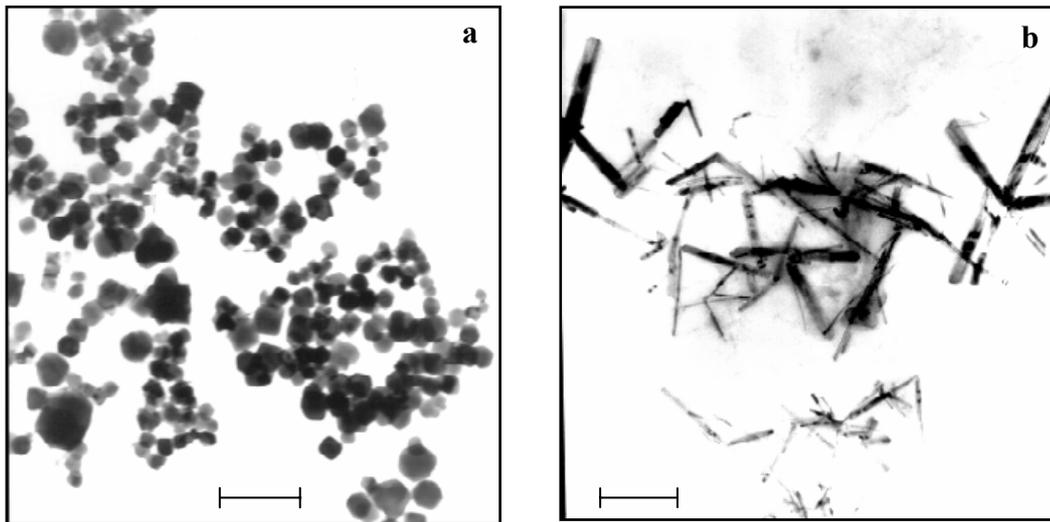


Fig. 2: Microfotografía electrónica de transmisión de: a) magnetita, y b) goetita.

Longitud de barras: 200 nm (a) y 100 nm (b).

En cuanto al tamaño, se realizaron medidas sobre 100 partículas de magnetita para obtener el histograma de la Fig. 3. Su diámetro medio y desviación típica se obtuvieron ajustando al histograma una distribución logarítmica. El resultado obtenido fue $\bar{d}_p = 80 \pm 25$ nm.

Como puede observarse, existe cierta polidispersión en la distribución de tamaños que pudiera ser debida a una leve agitación en la manipulación durante la síntesis. A pesar de todo, hemos obtenido partículas de moderada monodispersión, si se tiene en cuenta la complejidad de la síntesis.

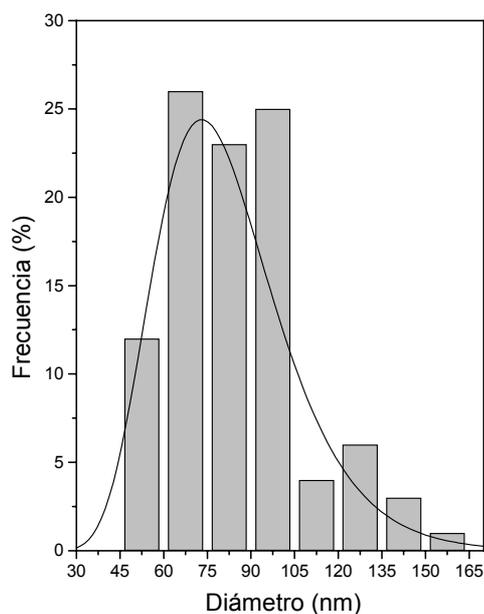


Fig. 3: Histograma de frecuencias relativas de diámetros de las partículas de magnetita obtenidas. La curva corresponde a una distribución logarítmica ajustada.

2.1.2. Poli(etil-2-cianoacrilato).

a) Aspectos generales de la síntesis.

El poli(etil-2-cianoacrilato) pertenece a la familia de los poli(alquilocianoacrilatos), de gran interés por la elevada reactividad de sus monómeros, capaces de polimerizar fácilmente en varios medios, incluida el agua. Entre sus múltiples aplicaciones destaca su uso como adhesivo quirúrgico y como sistema coloidal de transporte controlado de fármaco. Incluso se ha realizado un ensayo clínico en fase I en 21 pacientes con tumor refractario utilizando nanopartículas de poli(isohexilcianoacrilato) cargadas con doxorrubicina (72).

Su aplicación en el caso concreto del diseño de vehículos de fármaco se debe a su capacidad, ya mencionada, de polimerizar en medio acuoso (de gran interés para propósitos farmacéuticos), a sus propiedades mecánicas, a su biocompatibilidad y compatibilidad con fármacos, a su permeabilidad, a ser un

polímero biodegradable (lo cual es preciso para la administración parenteral) y a que su amplio uso como adhesivo quirúrgico en humanos constituye una garantía de baja toxicidad (73, 74). A pesar de que existe cierta controversia sobre su absorción oral, esta familia ha sido utilizada en el transporte de una amplia gama de fármacos (75-79), constituyendo incluso una alternativa a los transportadores virales en la terapia génica.

Una de las aplicaciones terapéuticas más prometedoras es el tratamiento del cáncer, donde incrementan la eficacia terapéutica como consecuencia de su capacidad *in vitro* para revertir la resistencia celular tumoral *in vitro* a anticancerígenos (80-82). Su toxicidad, aunque baja [DL₅₀ del poli(isobutilcianoacrilato) (PIBCA) en ratas: 242 mg/Kg; DL₅₀ del poli(isohexilcianoacrilato) (PIHCA) en ratas: 585 mg/Kg (19, 83)], puede ser importante debido a su rápida velocidad de degradación comparado con otros polímeros utilizados en el transporte de fármacos, como la poli(lactida) (PLA) y sus copolímeros con la glicolida (PLA/GA), los cuales presentan una degradación *in vivo* relativamente lenta. Además, sus productos de degradación pueden ser más tóxicos que los del PLA y PLA/GA. Sin embargo, en el caso de la administración de dosis múltiples (tratamientos crónicos), el uso de transportadores de cianoacrilato de rápida degradación parece más adecuada para evitar la sobrecarga celular con poliésteres de degradación lenta (84).

La obtención de cada uno de los polímeros de esta familia se logra mediante polimerización del monómero correspondiente. Los monómeros presentan la estructura química de un éster del ácido cianoacrílico con diferentes cadenas laterales alquílicas que van desde el metil al decil. El método general de síntesis de los monómeros fue descrito por Leonard y cols. (85) obteniéndose purezas medias del 98.5 % o más. Sin embargo, es muy difícil manejar el monómero en forma pura, se precisa un estabilizador ácido (SO₂, ácido sulfónico, etc.) o eliminadores (*scavengers*) de radicales libres (hidroquinona) para prevenir la polimerización espontánea cuando están congelados.

Empleando condiciones apropiadas de polimerización, podemos obtener nanopartículas de polímero. Las nanopartículas pueden definirse como sistemas coloidales submicrónicos generalmente constituidos por polímeros sintéticos o naturales. Según la estructura morfológica, podemos clasificarlas en nanosferas o nanocápsulas. Las nanosferas son sistemas matriciales en los que el fármaco se dispersa completamente en la partícula o se adsorbe en la superficie; las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los que el fármaco está confinado en una cavidad rodeada por una única capa polimérica (86).

Las nanosferas se preparan mediante un proceso de emulsión/polimerización, en el que gotas de monómero insoluble en agua se emulsionan en fase acuosa (87, 88). El mecanismo de polimerización es un proceso aniónico iniciado por bases covalentes presentes en el medio de polimerización (p.ej.: iones OH^- derivados de la disociación del agua). La reacción se produce en micelas tras la difusión de moléculas de monómero a través de la fase acuosa. El pH del medio determina la velocidad de polimerización y la adsorción de fármaco cuando este último es ionizable (87). El fármaco puede combinarse con las nanopartículas tras la disolución en el medio de polimerización, antes de la introducción del monómero o después de su polimerización. El tamaño de las partículas es de 200 nm aproximadamente, pero puede reducirse a 30 – 40 nm empleando tensioactivos no iónicos en el medio de polimerización (89) o añadiendo SO_2 al monómero (90).

La preparación de las nanocápsulas (91) consiste en la solubilización del monómero en una fase alcohólica que contiene un aceite, para luego realizar una dispersión en una fase acuosa que contenga tensioactivo. En contacto con el agua, la fase alcohólica difunde y favorece la formación de una emulsión o/w muy fina. El monómero, insoluble en agua, polimeriza en la zona interfacial, formando un muro polimérico.

b) Metodología.

Aunque con ligeras diferencias, la mayoría de los autores han empleado el método de polimerización en emulsión para la síntesis de esferas coloidales de poli(etil-2-cianoacrilato). La técnica implica la polimerización del monómero en una solución acuosa, de principio activo en la mayoría de los casos. Las nanopartículas se prepararon a partir del monómero correspondiente (etil-2-cianoacrilato, Loctite España, S. A.), siguiendo el método de Couvreur y cols. (87).

La adición del monómero [1 % (p/v)] se realizó de forma progresiva, bajo agitación mecánica (1000 rpm), en 50 mL de un medio de polimerización $2 \cdot 10^{-3}$ N de HCl. Para garantizar la completa polimerización del monómero establecimos un tiempo de polimerización de 3 horas (seguido por la mayoría de los autores), tras el cual se procedió a la neutralización del medio con 1 mL de una disolución 10^{-1} N de KOH para finalizar la polimerización. Se obtuvo una suspensión blanquecina que fue sometida a un proceso de limpieza en el que se realizaban repetidos ciclos de centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos (centrifugadora de alta velocidad Centrikon T-124, Kontron, Francia) y redispersión en agua ultrapura, y finalmente *serum replacement* en una célula de filtración bajo agitación con una membrana de un tamaño de poro de 16 μm . Para asegurar que la suspensión estaba suficientemente limpia, se midió la conductividad del sobrenadante.

Las partículas de polímero se secaron a 35 °C en una estufa con circulación forzada de aire (Digitronic, J. P. Selecta, S. A.) En el proceso de secado se observó la formación de una lámina compacta de polímero, atribuible al carácter adhesivo de éste, que da lugar a la agregación de las partículas poliméricas; esto volverá a observarse en las partículas compuestas. Finalmente, el almacenamiento se realizó en recipientes de polietileno conservados en un desecador.

c) Análisis de la reacción de síntesis.

En el proceso de síntesis se pueden diferenciar claramente 3 fases:

1. Polimerización.

Puede realizarse mediante el mecanismo del radical libre (92) y mediante el mecanismo aniónico/anfótero (93-95), cuyos esquemas se recogen en la Fig. 4.

- a) Mecanismo de polimerización de radical libre: está determinado por una alta energía de activación (125 KJ/mol). Se trata de una polimerización muy lenta, cuya velocidad de reacción depende fuertemente de la temperatura y de la cantidad de radicales libres.

 - b) Mecanismo de polimerización aniónica/anfótera: tiene mayor interés por ser más rápido y fácil de realizar, además de ser apropiado para las aplicaciones biomédicas. Incluso bases muy débiles como los iones OH^- derivados de la disociación del agua son capaces de iniciarla. Los iniciadores clásicos son compuestos iónicos (I^- , CH_3COO^- , Br^- , OH^- , etc.) pero también los compuestos nucleofílicos pueden iniciarla (bases terciarias: piridina, fosfina). Presumiblemente estos generan zwitteriones (ion híbrido con carga negativa y positiva), más que especies iónicas cargadas capaces de realizar una propagación aniónica. En nuestro caso, los iones OH^- de la disociación del agua son los encargados de actuar como iniciadores de la reacción de polimerización.
-

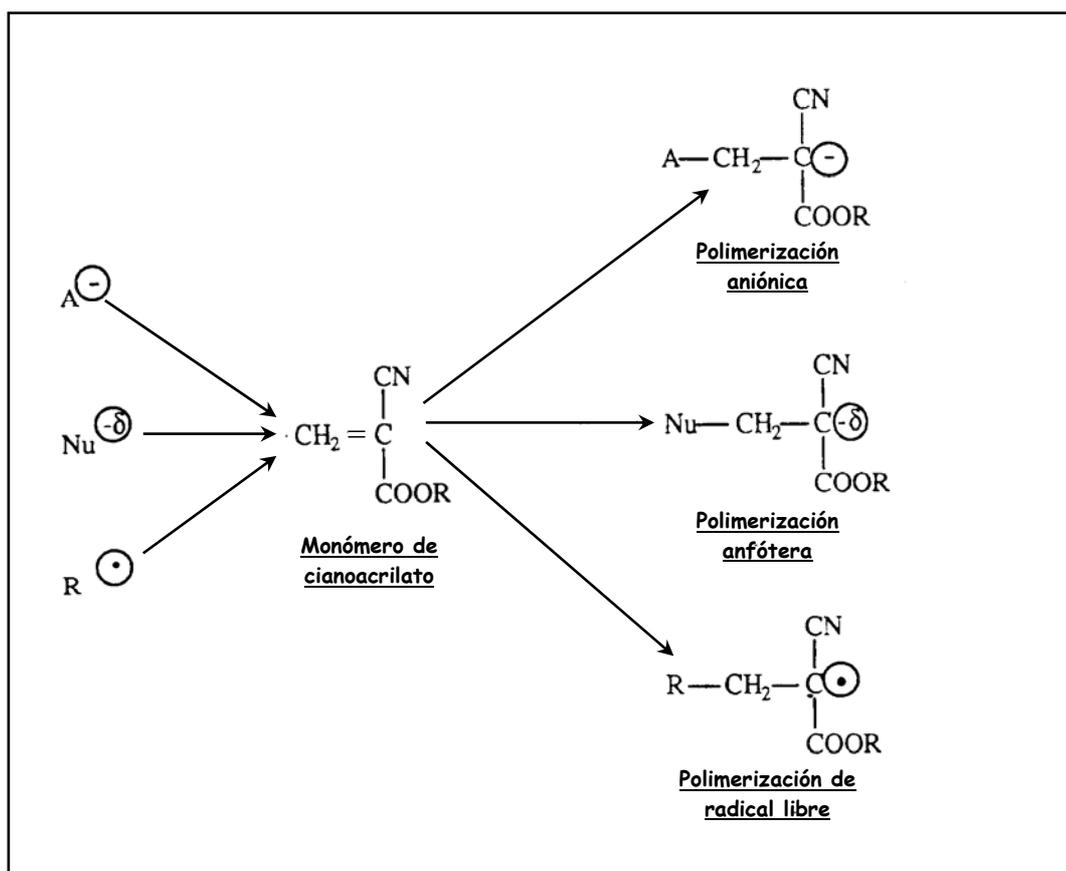


Fig. 4: Representación esquemática de los posibles mecanismos de polimerización del monómero alquilcianoacrilato: aniónico, anfótero y de radical libre. A^- : anión; $\text{Nu}^{-\delta}$: nucleófilo; R^\bullet : radical libre.

2. Propagación.

Se produce tras la formación de carbaniones capaces de reaccionar con otra molécula de monómero. De esta manera se forman cadenas poliméricas vivas.

3. Terminación.

La presencia de un catión provoca el final de la polimerización. Sólo los ácidos fuertes son capaces de finalizar la polimerización. Sin embargo, el agua también es capaz de finalizarla mediante el ácido conjugado H_3O^+ . La polimerización aniónica da lugar a una sal polimérica del catión responsable de la

terminación. La terminación de una polimerización anfótera generalmente se produce por la formación de enlaces intramoleculares que provocan la duplicación de la longitud de la cadena polimérica. El zwitterion parece ser estable e insensible a los terminadores aniónicos de las cadenas (como H_2O_2 y CO_2), dando lugar a la formación de polímeros de elevado peso molecular.

d) Forma y tamaño.

La observación de la fotografía de microscopía electrónica de transmisión (T.E.M.) que presentamos en la Fig. 5 nos permite identificar la morfología de las partículas como esférica.

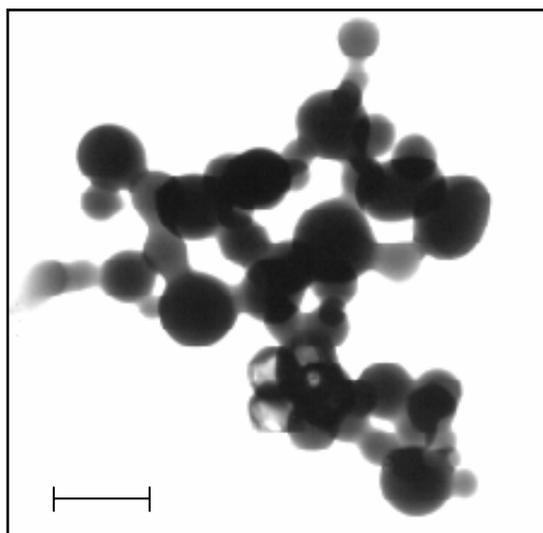


Fig. 5: Microfotografía electrónica de transmisión de poli(etil-2-cianoacrilato).

Longitud de barra: 500 nm.

Como puede observarse, existe cierta polidispersión en la distribución de tamaños y, lo que es más llamativo, la presencia de una especie de “puente” polimérico que atribuimos al carácter adhesivo del polímero y que, probablemente, se produce al secar la muestra sobre la rejilla de cobre del portamuestras.

Respecto al tamaño, se realizaron medidas sobre 100 partículas de polímero para obtener el histograma de la Fig. 6. Como antes, el diámetro medio y su desviación típica se obtuvieron ajustando al histograma una distribución logarítmica. El resultado obtenido fue $\bar{d}_p = 300 \pm 50$ nm.

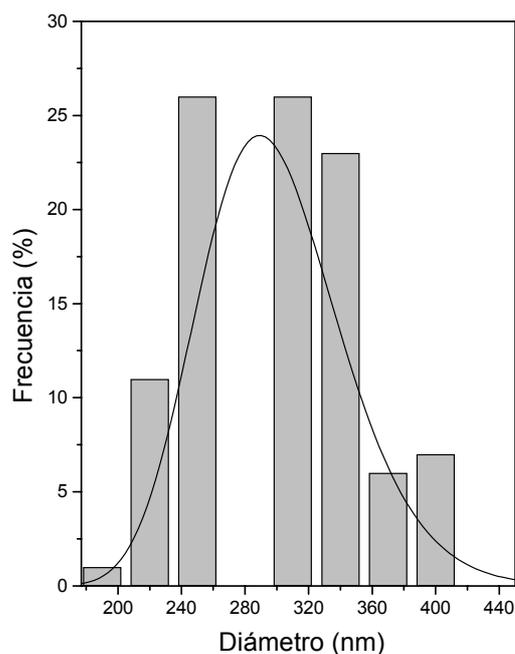


Fig. 6: Histograma de frecuencias relativas de diámetros de las partículas obtenidas de poli(etil-2-cianoacrilato). La curva corresponde a una distribución logarítmica.

2.1.3. Partículas compuestas.

Ya hemos comentado el gran interés que ha despertado la Tecnología de Transportadores Magnéticos desde su comienzo en la década de 1940. La aplicación de los miembros de la familia de los poli(alquilocianoacrilatos) como recubrimiento polimérico de núcleos magnéticos ya ha suscitado interés científico (19), observándose que la incorporación de magnetita al polímero no modifica la toxicidad de este último (DL_{50} Fe_3O_4 /PIBCA en ratas: 245 mg/Kg). Pretendemos desarrollar la síntesis de partículas de magnetita con recubrimiento de poli(etil-2-

cianoacrilato), así como la identificación de las condiciones óptimas para la realización de este proceso.

a) Metodología de la síntesis.

El método de síntesis que proponemos (96), está basado en las condiciones utilizadas en la síntesis de nanosferas de polímero (método de polimerización en emulsión). En definitiva, se trata de realizar la polimerización del monómero bajo idénticas condiciones a las descritas anteriormente, pero en un medio de polimerización en el que se encuentran los núcleos magnéticos. De esta manera pretendemos que la polimerización del monómero en presencia de magnetita provoque el recubrimiento de ésta, aunque es obvio que también se puede producir la formación de polímero independiente.

El proceso de síntesis comienza con la adición de un 1 % (p/v) de monómero, de forma progresiva y bajo agitación mecánica (1000 rpm), a 50 mL de un medio de polimerización con un 0.75 % (p/v) de suspensión de magnetita en una solución $2 \cdot 10^{-3}$ N de HCl. Tras la polimerización del monómero (3 horas), se realizó la neutralización del medio con 1 mL de una disolución de KOH 10^{-1} N para finalizar la polimerización. La rutina de limpieza descrita para los núcleos magnéticos también se utilizó con las partículas compuestas, considerándose la limpieza total del sistema cuando el sobrenadante dejaba de ser blanquecino (color debido a las partículas poliméricas no magnéticas) y cuando la conductividad del sobrenadante (menos de $2 \mu\text{S/cm}$) nos hacía ver que la suspensión estaba libre de restos químicos necesarios para la finalización del proceso. El secado y almacenamiento fueron idénticos a los descritos para las partículas de polímero. Al igual que con las nanosferas poliméricas se observó la formación de una capa compacta tras la desecación, debida al carácter adhesivo del polímero.

Para optimizar las condiciones de la síntesis (96), se obtuvieron partículas compuestas con diferentes proporciones de monómero:magnetita (desde 1:4 a

4:1), determinándose en los cuatro casos el efecto de la cantidad de monómero sobre el número de núcleos magnéticos recubiertos y el grosor del recubrimiento.

b) Forma y tamaño.

La secuencia de microfotografías de la Fig. 7 nos permite realizar un análisis cualitativo del efecto de la variación de las cantidades relativas de monómero y magnetita en el medio de dispersión sobre la estructura de las partículas. La Fig. 7a presenta las partículas sintetizadas cuando la proporción de peso inicial es de 4:3 [la Fig. 7b es un detalle de la muestra 7a, obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (H.R.T.E.M.)]. Éstas son las partículas utilizadas en el resto del estudio; su diámetro medio es de 130 ± 20 nm y la microfotografía muestra claramente que las partículas de magnetita están recubiertas por una capa polimérica de unos 25 nm de grosor. La Fig. 7c corresponde al caso en que la proporción de monómero es baja (1:4); en estas condiciones, como mucho se obtiene una capa muy fina de polímero principalmente localizada en las regiones de contacto entre las partículas, aunque bastante magnetita parece no estar recubierta en absoluto. Por el contrario, cuando la cantidad de monómero está en exceso respecto a la de magnetita (4:2 y 4:1), y todas las partículas aparecen recubiertas, la apariencia del sistema compuesto es la de una gran matriz polimérica con partículas de magnetita embebidas (Fig. 7d).

En la Tabla 2 presentamos las cantidades relativas de polímero unido a magnetita (masa de polímero por unidad de masa de magnetita), el grosor del recubrimiento y las características de redispersabilidad de las partículas compuestas obtenidas para cantidades relativas iniciales de monómero y magnetita. En los casos 1:4 y 4:1 no se puede apreciar el recubrimiento. En el primero, por la pequeña cantidad de polímero presente. En el segundo por su exceso, que impide observar las partículas individuales.

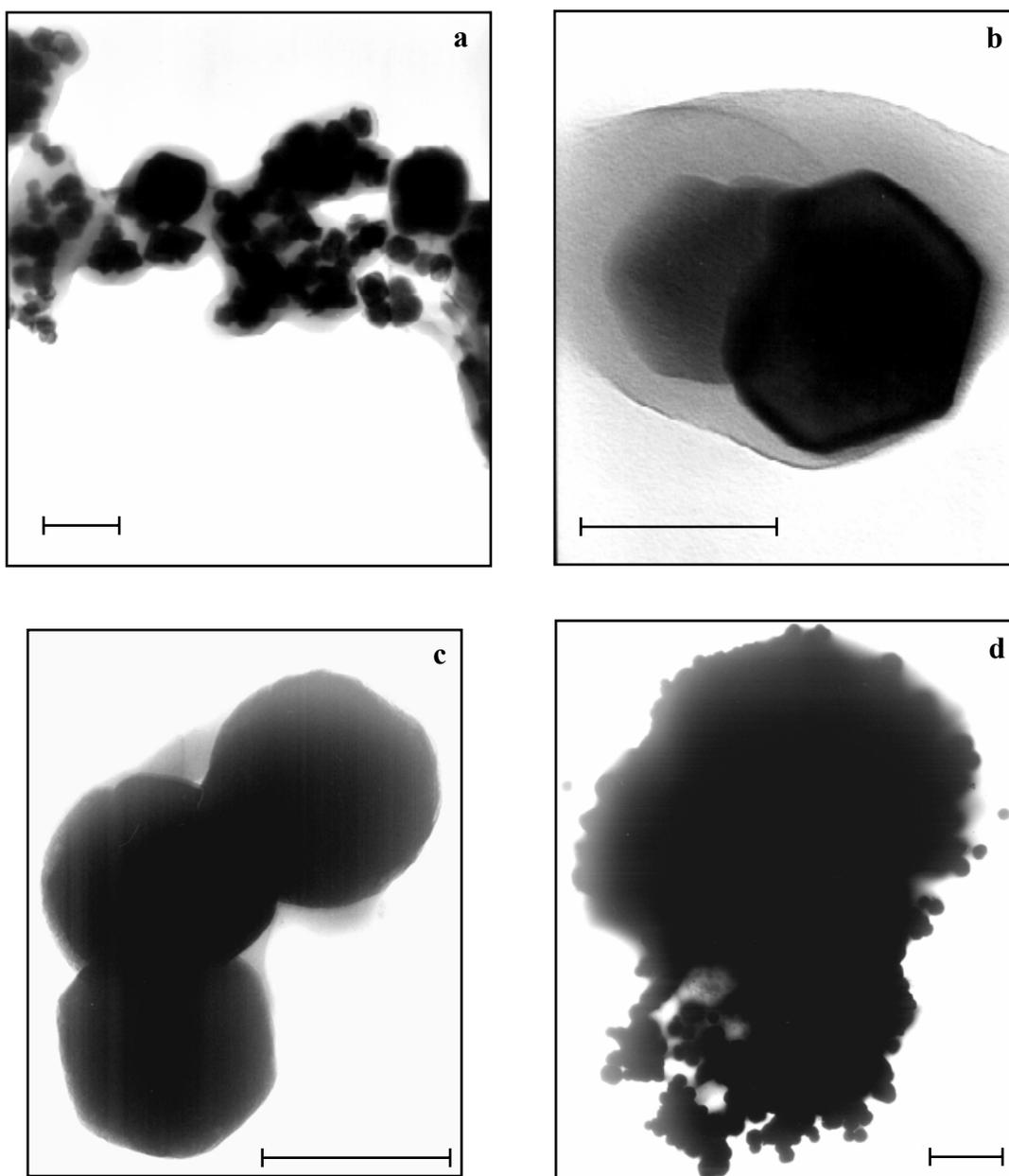


Fig. 7: Microfotografía electrónica de transmisión de las partículas compuestas.
Proporción de peso inicial de monómero:magnetita de: 4:3 (a y b), 1:4 (c) y 4:1 (d).
Longitud de barras: 200 nm (a), 100 nm (b y c) y 2 μm (d).

En la Tabla 2, la cantidad de polímero unido a las partículas se obtuvo por diferencia de pesada entre las partículas de magnetita recubiertas y las partículas de magnetita desnudas; el grosor del recubrimiento polimérico se dedujo de las microfotografías T.E.M.. Finalmente, el ensayo de redispersabilidad fue realizado

cualitativamente, mediante observación visual simple de la turbidez tras la sonicación de la suspensión sedimentada. Como se ve, la cantidad de PE-2-CA incorporada a las partículas aumenta cuando la proporción de monómero:magnetita aumenta. Respecto al grosor del recubrimiento polimérico, nótese cómo un exceso del monómero inicialmente añadido no da lugar necesariamente a un recubrimiento polimérico más eficaz de la magnetita. La pobre redispersabilidad alcanzada cuando la proporción monómero:magnetita está por debajo de 4:3 es un indicio de la formación de capas de polímero que son virtualmente imposibles de destruir mediante métodos no químicos. Por motivos obvios (basta con ver las fotografías) no pudieron realizarse medidas de tamaño de las partículas compuestas obtenidas de las proporciones 4:1 y 1:4.

Tabla 2: Características de las diferentes partículas compuestas obtenidas.

Proporción de pesos inicial monómero:magnetita	Peso relativo del recubrimiento polimérico	Grosor del recubrimiento (nm)	Redispersabilidad
1:4	0.0288 ± 0.0008	–	Muy buena
2:4	0.183 ± 0.001	40 ± 20	Muy buena
3:4	0.193 ± 0.001	50 ± 30	Muy buena
1:1	0.1263 ± 0.0009	90 ± 50	Muy buena
4:3	0.602 ± 0.001	46 ± 19	Buena
4:2	1.418 ± 0.003	62 ± 15	Difícil
4:1	1.487 ± 0.005	–	Nula

Respecto al tamaño, se realizaron medidas sobre 100 partículas compuestas de cada proporción, para obtener los histogramas de la Fig. 8. El diámetro medio y su desviación típica se obtuvieron ajustando al histograma una

distribución logarítmica. Los resultados obtenidos fueron $d_{p, 2:4} = 120 \pm 20$ nm,

$d_{p\ 3:4} = 140 \pm 30$ nm, $d_{p\ 4:4} = 170 \pm 50$ nm, $d_{p\ 4:3} = 130 \pm 20$ nm y $d_{p\ 4:2} = 145 \pm 15$ nm. Se observa claramente en las Figs. 7 y 8 cómo son los núcleos de magnetita los encargados de determinar la forma de las partículas compuestas (esférica) y la reducción de tamaño respecto al de las partículas de polímero (96).

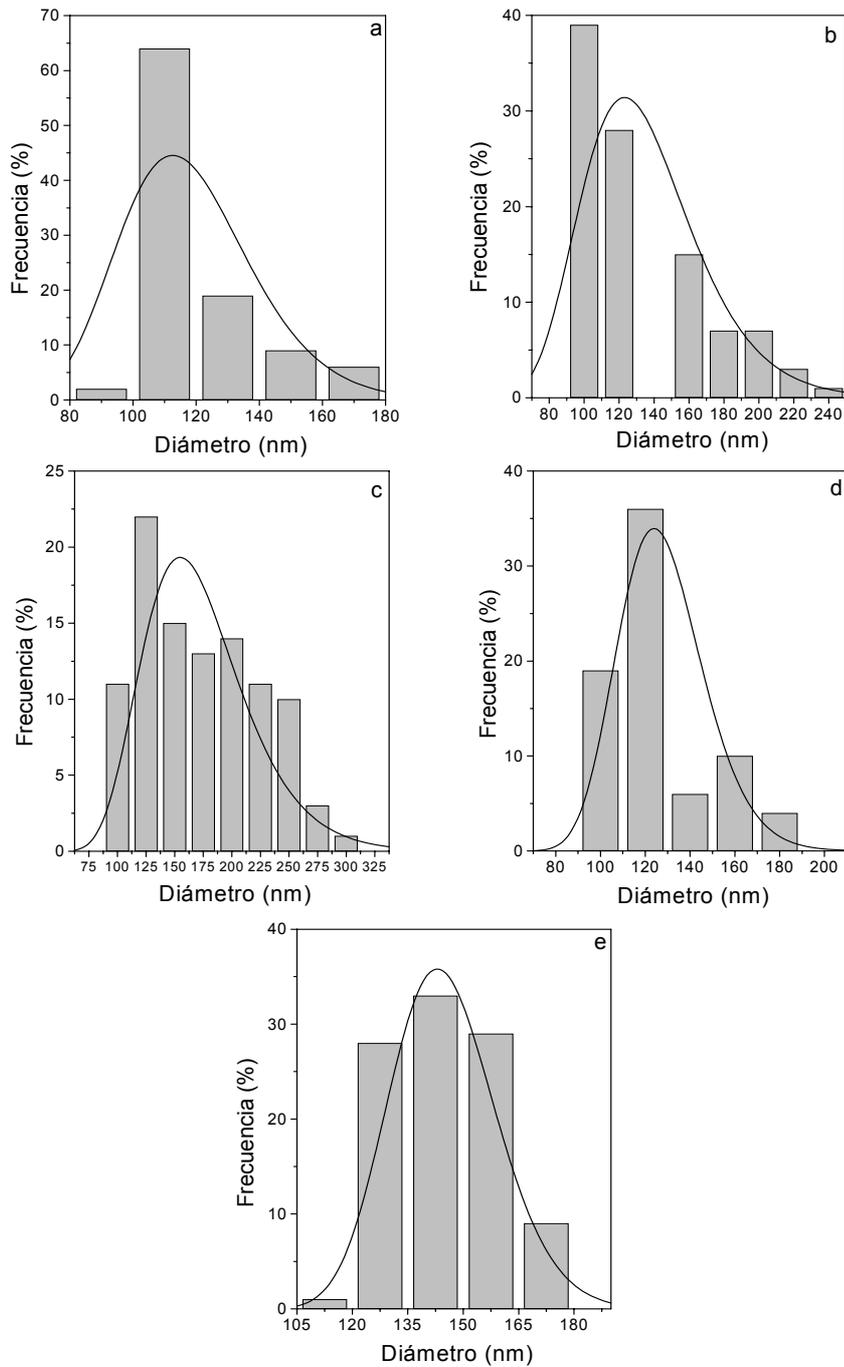


Fig. 8: Histograma de frecuencias relativas de diámetros de las partículas compuestas obtenidas en las proporciones: 2:4 (a), 3:4 (b), 4:4 (c), 4:3 (d) y 4:2 (e). Las curvas corresponden a una distribución de tamaños logarítmica.

2.2. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA.

2.2.1. Superficie específica.

a) Fundamentos teóricos.

En la industria farmacéutica, es relevante la determinación del área superficial para la caracterización de materiales durante su desarrollo, formulación y manufacturación. Esta magnitud aporta información sobre los espacios vacíos en las superficies de las partículas individuales o agregados de partículas. Esto es importante porque factores como la actividad química, la adsorción, la disolución y la biodisponibilidad de un fármaco pueden depender de la superficie del sólido. Ciertas propiedades de los materiales, como la capacidad de flujo de un polvo o la velocidad de disolución de un sólido, pueden estar relacionadas con el tamaño de partícula y el área superficial.

Las medidas más reproducibles del área superficial se obtienen mediante la adsorción en monocapa de un gas inerte sobre la superficie de un sólido a temperatura reducida y la subsiguiente desorción de este gas a temperatura ambiente. Las isothermas de adsorción obtenidas mediante esta técnica se interpretan utilizando las ecuaciones desarrolladas por Brunauer, Emmett y Teller, lo que se conoce con el nombre de método B.E.T. (97).

Todo gas inerte condensable puede utilizarse en las medidas B.E.T., aunque se prefieren el nitrógeno y el criptón. El nitrógeno se utiliza como gas adsorbato en la mayoría de las muestras que poseen un área superficial de aproximadamente $1.0 \text{ m}^2/\text{g}$ o más, mientras que los materiales con áreas superficiales menores deben ser analizados utilizando criptón. La menor presión de vapor del criptón provoca la adsorción de una mayor cantidad de gas en el

sólido, dando lugar a unos resultados más exactos para valores bajos de área superficial.

El modo en el que un material adsorbe un gas se asemeja a una isoterma de adsorción. El tipo de isoterma más común y útil para las medidas B.E.T. es la isoterma tipo II (Fig. 9). El punto de inflexión de esta isoterma generalmente indica el recubrimiento monocapa del adsorbato.

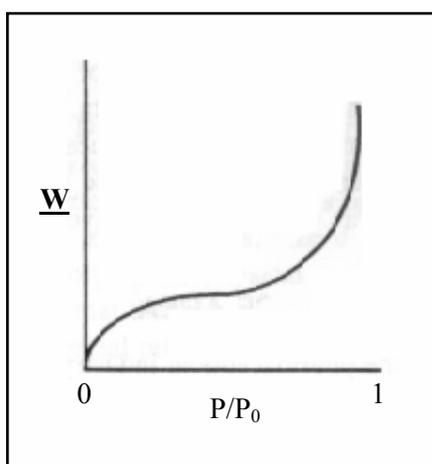


Fig. 9: Isotherma de adsorción tipo II. W : Peso adsorbido; P/P_0 : Presión relativa.

La saturación se produce a $P/P_0 \geq 1$.

La ecuación B.E.T. del área superficial está basada en la teoría de Langmuir de la cinética de adsorción superficial en monocapa de un gas. Langmuir teorizó que la colisión de una molécula de gas con un sólido es inelástica y las moléculas de gas se mantienen en contacto con el sólido antes de retornar a la fase gaseosa, produciéndose la adsorción. Brunauer, Emmett y Teller extendieron la teoría de Langmuir a la adsorción de multicapas moleculares. Establecieron una relación entre la velocidad de condensación de las moléculas de un gas sobre una capa adsorbida y la velocidad de evaporación desde esa capa para un número infinito de capas. La forma lineal de esta ecuación se conoce como ecuación B.E.T.:

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C-1}{V_m C} \left(\frac{P}{P_0} \right) \quad (2)$$

Donde V es el volumen de gas adsorbido a la presión parcial de adsorbato, P ; V_m es el volumen de gas adsorbido en una monocapa; P_0 es la presión de saturación del adsorbato a la temperatura experimental; y C es la constante de B.E.T., que relaciona exponencialmente los calores de adsorción y la condensación del adsorbato.

Para obtener una mayor exactitud en la determinación de la superficie específica (S), se prefiere realizar medidas B.E.T. multipunto, en las que se obtiene una gráfica de $P/V(P_0-P)$ frente a P/P_0 utilizando varias concentraciones de adsorbato y midiendo el volumen adsorbido. Como la ecuación B.E.T. corresponde a una línea recta, en la que:

$$\text{Pendiente} = \frac{C-1}{V_m C} \quad (3)$$

$$\text{Ordenada en el origen} = \frac{1}{V_m C} \quad (4)$$

La monocapa de gas adsorbido (V_m) y la constante B.E.T. se calculan a partir de la pendiente y la ordenada en el origen:

$$V_m = \frac{1}{\text{pendiente} + \text{ordenada}} \quad (5)$$

$$C = \frac{\text{pendiente}}{\text{ordenada}} + 1 \quad (6)$$

El área superficial total (S_t) de la muestra se calcula a partir de:

$$S_t = \frac{V_m N_0 A_{CS}}{M} \quad (7)$$

Donde N_0 es el número de Avogrado, A_{CS} es el área de la sección transversal de la molécula de adsorbente y M es el peso molecular de este.

La superficie específica (S) del sólido se obtiene dividiendo el área superficial total (S_t) entre la masa de la muestra pulverizada (m):

$$S = \frac{S_t}{m} \quad (8)$$

Algunas consideraciones utilizadas en la teoría B.E.T. han sido cuestionadas para muestras reales. Una de tales consideraciones señala que todos los lugares de adsorción son energéticamente equivalentes, lo cual no ocurre en muchas superficies. El modelo B.E.T. ignora las interacciones laterales de adsorbato en la superficie y asume que el calor de adsorción para la segunda capa y superiores es igual al calor de fusión. Esta consideración no es válida para presiones altas y de aquí la utilización de presiones parciales de adsorbato inferiores a 0.35. A pesar de esto, el método B.E.T. ha demostrado ser una representación exacta del área superficial para la mayoría de las muestras.

b) Metodología experimental y resultados.

Antes de medir la superficie específica de nuestras partículas, es conveniente lograr la limpieza de los gases y vapores preadsorbidos en la superficie del sólido, utilizando para ello una corriente de gas nitrógeno. En el caso de la magnetita, con objeto de minimizar el tiempo necesario para la eliminación de impurezas de la superficie utilizamos temperaturas elevadas (80 °C). Sin embargo, para evitar la alteración del polímero y de las partículas compuestas a altas temperaturas, se empleó el método de la repetición de ciclos (98), que implica la adsorción y desorción repetida de un adsorbato a una presión relativa de aproximadamente 0.3. Generalmente, con la realización de 3 a 6 ciclos obtenemos una superficie limpia. No hay que olvidar que la utilización de temperaturas elevadas puede modificar las

propiedades del producto (p.ej.: deshidratación, conversión en otras formas farmacéuticas y descomposición).

La medida de la superficie específica se realizó empleando el aparato Quantasorb Jr. de Quantachrome (U.S.A.), que posee un detector de conductividad térmica para determinar la cantidad de gas desorbido de la muestra. El gas adsorbato utilizado se mezcla con helio como gas transportador inerte no condensable en las concentraciones requeridas para el análisis. Para nuestras medidas disponíamos de tres tanques de concentraciones del 10 %, 20 % y 30 % de nitrógeno en helio. La masa de muestra empleada fue 0.2 g (polímero), 0.8 g (magnetita) y 0.3 g (partículas compuestas). Los experimentos se repitieron al menos tres veces con muestras diferentes en todos los casos.

Tras la limpieza de la muestra, ésta es enfriada hasta el punto de ebullición del gas adsorbato, mediante la inmersión del soporte de la muestra en un vaso Dewar con nitrógeno líquido, en presencia de un flujo de la mezcla N₂-He deseada. El vaso Dewar de nitrógeno líquido se retira entonces de la célula de la muestra y la cantidad de gas previamente adsorbido se mide al desorberse cuando se calienta la muestra a temperatura ambiente. El volumen de gas desorbido se transforma en superficie específica (m²/g) de la muestra empleando la ecuación B.E.T.

Al analizar los datos, debemos considerar una serie de parámetros para asegurar la validez de los resultados. El coeficiente de correlación debe ser lo más próximo a 1 y si no se obtiene este valor, puede precisarse más material para el análisis. La constante C es una medida de la afinidad del adsorbato por el material; para el nitrógeno tiene un valor que podrá variar desde 3 a 1000, dependiendo de la isoterma de adsorción del material. Para constantes C bajas, se requerirán altas presiones de adsorbato para obtener un coeficiente de correlación bueno. Si es posible, la identificación del tipo de isoterma de adsorción puede aportar información sobre la no linealidad de la adsorción sobre una muestra.

La superficie específica obtenida para la magnetita fue 3.70 ± 0.26 m²/g, mucho mayor que la del polímero (0.50 ± 0.22 m²/g) y la de las partículas compuestas (0.71 ± 0.07 m²/g). Esta reducción del área superficial de los núcleos de magnetita al ser recubiertos por el polímero es una prueba más de la eficacia del recubrimiento (96). Además, los valores bajos de superficie específica correspondientes al polímero y a las partículas compuestas pueden explicarse porque muy a menudo (en la mayoría de las partículas poliméricas y compuestas), existe una tendencia a la agregación tras el secado desarrollado en la realización de esta determinación (ver Fig. 5). Como consecuencia de esto, decrece la superficie expuesta a la adsorción de nitrógeno y los valores de superficie específica son inferiores a los esperados. Otra explicación es la naturaleza menos porosa del polímero.

2.2.2. Difractometría de rayos X.

a) Fundamentos teóricos.

La difracción de rayos X representa la caracterización de la estructura interna de un cristal y la evaluación de su tipo de red. Cuenta con una serie de aplicaciones en los sistemas farmacéuticos (99), algunas de las cuales indicamos a continuación:

- Análisis cualitativo.

La difracción de rayos X es ampliamente utilizada para la identificación de fases sólidas. El patrón de rayos X de toda forma cristalina de un compuesto es único, lo que hace a esta técnica particularmente útil para la identificación de las diferentes formas polimórficas del compuesto (p.ej.: un fármaco). Como la disolución o secado posterior algunas veces genera una estructura no deseada, es también importante confirmar las estructuras

cristalinas en cada etapa de una formulación durante el proceso de desarrollo. La técnica también puede ser utilizada para identificar las formas solvatadas y no solvatadas (anhidras) de un compuesto con la condición de que las redes cristalinas de las dos sean diferentes. Sin embargo, esta técnica tiene menor utilidad en la identificación de materiales no cristalinos (amorfos).

- Grado de cristalinidad.

La difracción de rayos X se emplea con frecuencia para determinar el grado de cristalinidad de los productos farmacéuticos, en particular de los polímeros. Muchos polímeros exhiben propiedades asociadas con materiales cristalinos (p.ej.: evolución con el tiempo del calor latente al enfriar el polímero fundido) y no cristalinos (p.ej.: patrón de rayos X difuso). Este comportamiento puede explicarse mediante el modelo de los dos estados, según el cual los materiales poliméricos están constituidos por pequeñas, aunque perfectas, regiones cristalinas (cristalitos) que están embebidas dentro de una matriz continua. Los métodos de rayos X asumen implícitamente el modelo de los dos estados de cristalinidad.

- Cinética de reacciones en estado sólido.

Es posible llevar a cabo este estudio ya que el patrón del reactivo es diferente al del producto de la reacción.

- Análisis cuantitativo.

Si lo que tenemos es una mezcla de sólidos cristalinos, cada uno de los componentes tendrá un patrón de difracción característico, independiente de los otros componentes de la mezcla. Tras la realización de correcciones de absorción apropiadas, la intensidad de los picos de cada uno de los

componentes será proporcional a la fracción de peso de ese componente en la mezcla. Este análisis podrá realizarse con un estándar interno o sin él.

b) Metodología experimental y resultados.

Centrémonos en la aplicación de la difracción de rayos X en el *análisis cualitativo*, ya que con este fin hemos utilizado esta técnica en nuestra investigación.

Para obtener datos reproducibles y fiables, es importante cuidar la preparación de la muestra. Los puntos críticos son el tamaño cristalino, la orientación preferida de la muestra en el soporte y, la coplanaridad de la muestra y el soporte superficial. Al depositar una muestra pulverizada en un soporte de rayos X, la distribución de orientaciones del cristal puede no ser al azar, dándose lo que se llama orientación preferida de la muestra. La manera en que la muestra se deposita sobre el soporte afecta a la orientación de los cristales. Los soportes comúnmente utilizados son platos rectangulares de aluminio o vidrio, que contienen una ventana rectangular en la que se empaqueta el polvo.

Realizamos un difractograma de rayos X, empleando el método de Debye-Scherrer, en el Departamento de Mineralogía y Petrología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada por cortesía del Dr. Martín Ramos. El dispositivo empleado fue un difractómetro Philips PW1710 (Holanda), utilizando una longitud de onda de 1.5405 Å (Cu-K α). La Fig. 10 muestra los difractogramas obtenidos para la magnetita y las partículas compuestas. Al comparar ambos difractogramas con el patrón ASTM de la magnetita (Fig. 11) se comprueba la perfecta coincidencia de las líneas de estos difractogramas con las del patrón, lo que permite identificar las muestras como magnetita y observar la elevada cristalinidad de ésta (tamaño de grano \approx 300 Å). Además, al comparar los difractogramas entre sí se

observa cómo el recubrimiento polimérico provoca unos picos menos acentuados que en el caso de la magnetita sola.

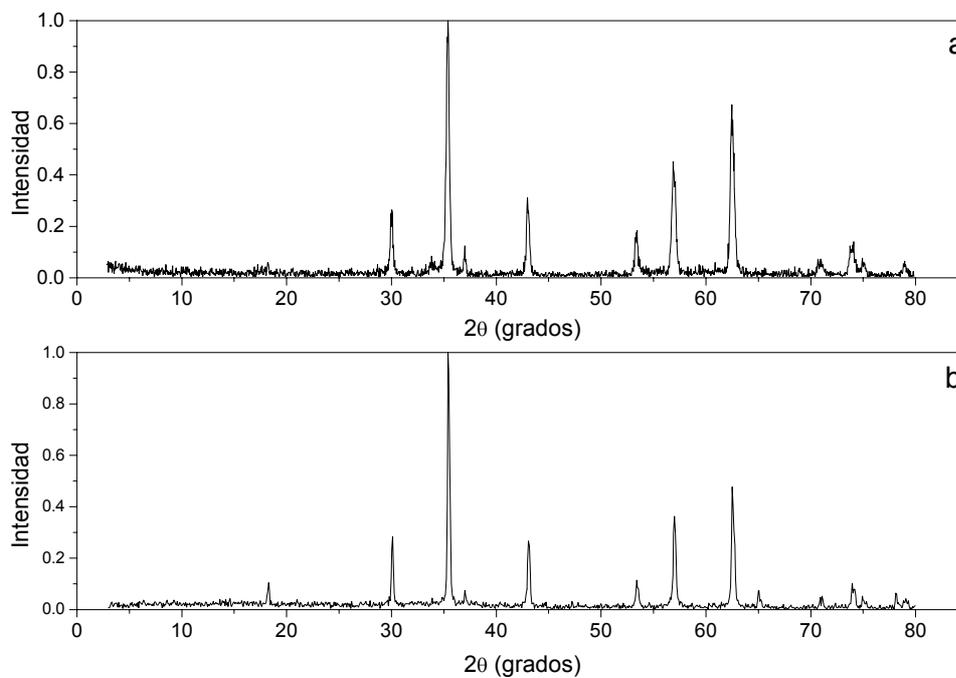
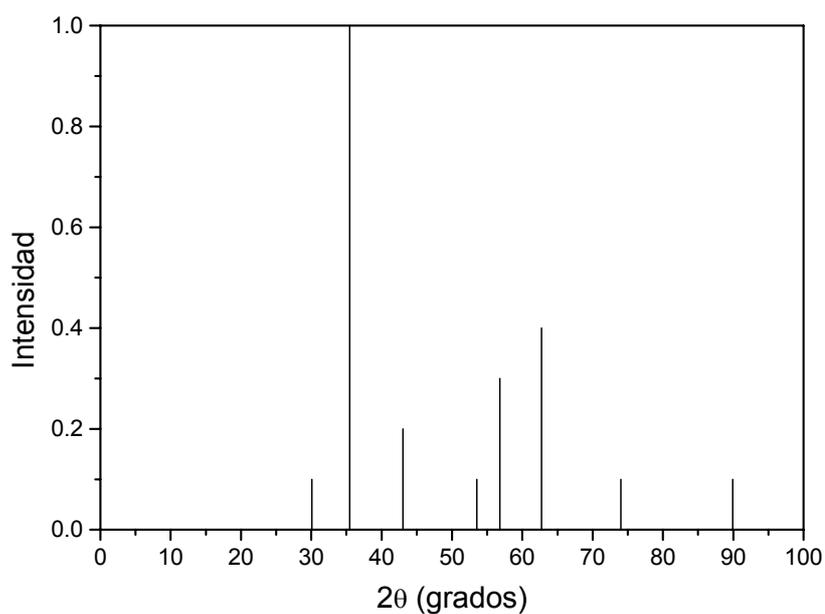


Fig. 10: Difractogramas de rayos X de la magnetita (a) y las partículas compuestas



(b). La intensidad está expresada en unidades normalizadas.

Fig. 11: Patrón de difracción de rayos X de la magnetita. La intensidad está expresada en unidades normalizadas.

2.2.3. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier.

a) Fundamentos teóricos.

La radiación infrarroja se encuentra localizada en el espectro electromagnético entre la zona del visible y la zona del microondas. Una molécula orgánica absorbe y convierte la radiación infrarroja entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} (zona de gran interés en Química Orgánica) en energía de vibración molecular. Esta absorción es cuantificable y el espectro aparece en forma de bandas porque un cambio simple de energía vibracional es acompañado por diversos cambios de energía rotacional. Las posiciones de las bandas en el espectro de infrarrojos se suelen presentar en función del número de ondas ($\bar{\nu}$), y las intensidades de las bandas pueden expresarse como transmitancia (T) o absorbancia (A).

Hay dos tipos de vibraciones moleculares (100): La vibración de elongación y la vibración de flexión. Sólo aquellas vibraciones que provocan un cambio rítmico en el momento dipolar de la molécula se observan en el infrarrojo. Esto es debido a que la alternancia del campo eléctrico, producido por el cambio en la distribución de cargas que acompaña a una vibración, acopla la vibración de la molécula con el campo eléctrico oscilante de la radiación electromagnética. En general, los grupos funcionales que tienen un dipolo intenso dan lugar a absorciones fuertes en el infrarrojo.

El conjunto de vibraciones fundamentales (frecuencias de absorción) raramente se observará debido a la existencia de factores que aumentan el número de bandas (la presencia de armónicos y los tonos de combinación) y factores que reducen el número de bandas (frecuencias fundamentales fuera

de la región de 400 a 4000 cm^{-1} , bandas fundamentales demasiado débiles para ser observadas, ausencia de un cambio en el momento dipolar, etc.).

b) Metodología experimental.

Para la preparación de la muestra, tomamos una pequeña cantidad de ésta (0.5 – 1.0 mg) y la mezclamos con aproximadamente 100 mg de bromuro potásico pulverizado y seco. Realizamos la mezcla en un mortero de ágata y la prensamos a 10000 – 15000 kPa para obtener un disco transparente. Como consecuencia de esta manipulación, es de esperar la aparición de bandas a 3448 cm^{-1} y 1639 cm^{-1} debidas a la humedad (100).

Para la obtención del interferograma se utilizó un espectrómetro de infrarrojos (Nicolet 20 SXB, USA), con una resolución de 2 cm^{-1} . La técnica (100) implica la división de una radiación que contiene todas las longitudes de onda (en nuestro caso: 4000 – 400 cm^{-1}) en dos rayos. Uno tiene un camino óptico fijo y el otro variable (mediante un espejo móvil). La superposición de ambos rayos dará lugar a un patrón de interferencias que por transformada de Fourier se convierte en un punto en el dominio de la frecuencia. La transformación de Fourier a sucesivos puntos a lo largo de esta variación da lugar a un espectro de infrarrojos completo. El paso de esta radiación a través de una muestra expone al compuesto a una banda amplia de energías, generándose un completo espectro de infrarrojos.

c) Interpretación del espectro.

Como no dependemos del espectro de infrarrojos para la identificación, no se requiere un análisis detallado de éste. Sólo la utilización del espectro de infrarrojos en conjunción con otras técnicas (espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear) permitirá determinar la estructura molecular.

No hay reglas establecidas para la interpretación de espectros de infrarrojos. Sin embargo, existen ciertos requisitos previos a la interpretación del espectro (100):

- El espectro debe tener una resolución y una intensidad adecuadas, y será el de un compuesto razonablemente puro.
- El espectrofotómetro debe estar calibrado.
- El método de manipulación de la muestra debe especificarse.

La frecuencia o longitud de onda de absorción depende de las masas relativas de los átomos, de las constantes de fuerza de los enlaces, de la geometría de los átomos y del entorno. Una molécula por simple que sea puede generar un espectro extremadamente complejo, que es característico de la molécula entera (excepto en el caso de los enantiómeros). No es posible realizar un tratamiento preciso de las vibraciones de una molécula compleja, por lo que el espectro de infrarrojos debe interpretarse a partir de la comparación empírica y la extrapolación a estudios de moléculas sencillas, ya que determinados grupos de átomos dan lugar a bandas de igual o similar frecuencia independientemente de la estructura del resto de la molécula. La persistencia de estas bandas características permite la obtención de información estructural, mediante simple inspección y referencia a tablas de la absorción característica de grupos funcionales. Toda conclusión alcanzada tras examinar una banda debe confirmarse cuando sea posible mediante el examen de otras zonas del espectro.

En un espectro de IR se distinguen 3 zonas características (100):

- La región de los grupos funcionales (4000 cm^{-1} a 1300 cm^{-1}). De forma general, si no hay absorción en esta zona puede considerarse que la molécula carece de grupos funcionales.
 - La zona de la “huella dactilar” (1300 cm^{-1} a 900 cm^{-1}). La absorción en esta región es única para toda especie molecular.
-

- La región entre 900 cm^{-1} y 650 cm^{-1} . La ausencia de absorción en esta zona generalmente indica una estructura no aromática.

En la Fig. 12 se recoge el espectro IR de nuestros tres tipos de partículas. Su análisis constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento (96), dado que permite la identificación de los grupos funcionales del polímero en las partículas compuestas. Sin embargo, las bandas son menos intensas como consecuencia de la menor cantidad de polímero presente en éstas. Las bandas observadas son:

- A: Banda debida a la humedad que adquieren las muestras como consecuencia de su proceso de manipulación. En las partículas poliméricas se sitúa a 3491 cm^{-1} .
 - B: Grupo de tres bandas que corresponden a la vibración de estiramiento del enlace C-H. En el polímero, a 2990 cm^{-1} se localiza la perteneciente a la vibración de elongación asimétrica del grupo CH_3 ($\nu_{AS}\text{ CH}_3$), a 2943 cm^{-1} observamos la perteneciente a la vibración de elongación asimétrica del CH_2 ($\nu_{AS}\text{ CH}_2$) y a 2907 cm^{-1} la correspondiente a la vibración de elongación simétrica del CH_3 ($\nu_S\text{ CH}_3$).
 - C: Banda perteneciente a la vibración molecular del enlace $\text{C}\equiv\text{N}$. En el polímero se localiza a 2251 cm^{-1} .
 - D: Banda que corresponde a la vibración molecular del enlace $\text{C}=\text{O}$ del polímero, aparece a 1747 cm^{-1} para las partículas poliméricas.
 - E: Banda debida a la humedad adquirida durante el proceso de manipulación de la muestra. En el polímero se sitúa a 1626 cm^{-1} .
-

- F: Grupo de tres bandas que corresponden a la vibración molecular de flexión del CH₃. En las partículas poliméricas, aparece a 1471 cm⁻¹ la banda correspondiente a la vibración de flexión simétrica del CH₂ (δ_S CH₂), a 1444 cm⁻¹ aparece la banda correspondiente a la vibración de flexión asimétrica del CH₃ (δ_{AS} CH₃) y a 1372 cm⁻¹ aparece la banda perteneciente a la vibración de flexión simétrica del CH₃ (δ_S CH₃).

 - G: Banda correspondiente a la vibración de flexión y elongación del grupo C-CO-C; aparece a 1255 cm⁻¹ y confirma que la banda carbonílica observada a 1747 cm⁻¹ corresponde a un éster.

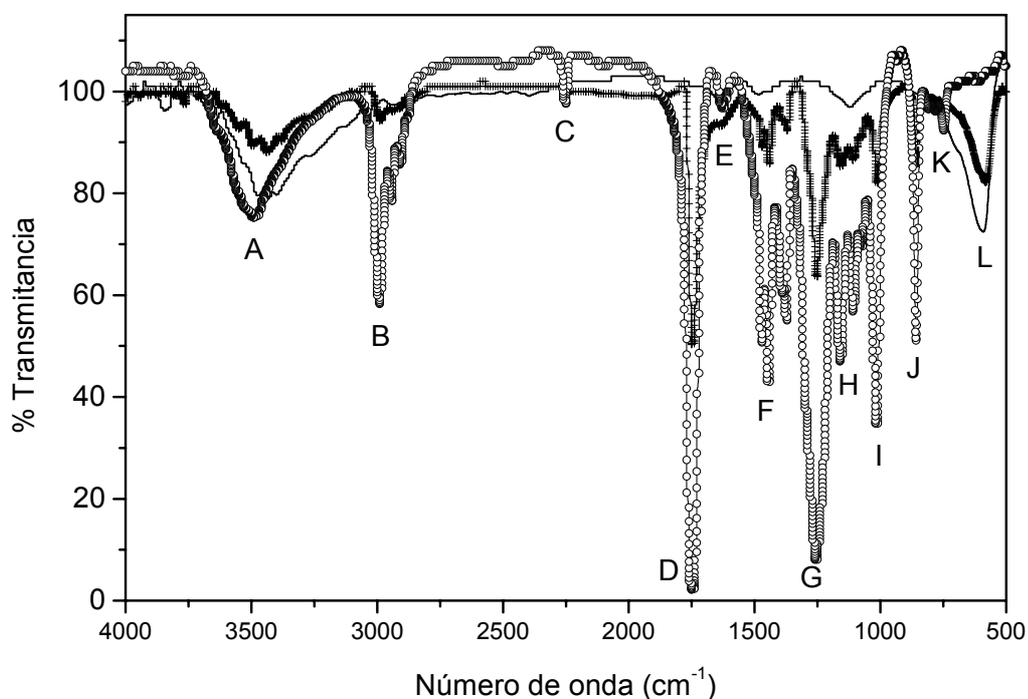
 - H: A 1158 cm⁻¹ y 1109 cm⁻¹ en las muestras que contienen polímero, aparece una pareja de bandas que corresponde a la vibración de elongación y flexión del grupo C-CO-C, y que resulta de la vibración de elongación y flexión de la cadena C-C-C presente en este grupo.

 - I: A 1015 cm⁻¹ aparece una banda correspondiente a un éster de alcohol primario.

 - J: En las muestras que contienen polímero, a 858 cm⁻¹ aparece una banda media característica de un alcano.

 - K: Banda perteneciente a la vibración de oscilación del CH₂ (ρ CH₂), se observa a 747 cm⁻¹ y es propia de una cadena larga de CH₂.
-

- L: Única banda ausente en el espectro de las partículas poliméricas. Aparece a 591 cm^{-1} y es una banda ancha y débil



característica de la absorción en la magnetita (101).

Fig. 12: Espectro de infrarrojos de la magnetita (-), de las partículas compuestas (+) y de las partículas poliméricas (o).

2.2.4. Resonancia magnética nuclear.

a) Fundamentos teóricos.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) se basa en la medida de la absorción de la radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias, aproximadamente de 4 a 900 MHz. En contraste con la absorción ultravioleta, visible e infrarroja, en el proceso de absorción están implicados los núcleos de determinados isótopos en vez de los electrones exteriores. Además, es necesario colocar el analito en un intenso campo magnético, con el fin de que aparezcan los estados de energía de los núcleos

que hagan posible la absorción. La frecuencia de radiación requerida para la absorción en espectroscopía de RMN depende del isótopo y de su entorno químico; el número de picos de absorción para un núcleo en un determinado entorno químico está determinado por la posiciones espaciales de los núcleos vecinos, y la intensidad de los picos de absorción es proporcional al número de núcleos (102).

La RMN es una técnica útil en la determinación de la estructura molecular. En algunos casos basta con el espectro de RMN para la identificación de la estructura de un compuesto desconocido, mientras que en otras aplicaciones la información estructural obtenida de la RMN complementa a otros métodos estructurales o químicos. La RMN es también una herramienta útil para el estudio de las cinéticas de reacción y el equilibrio químico, y para el análisis cualitativo de mezclas de compuestos orgánicos. En la investigación farmacéutica (103) ha sido utilizada para la determinación de la estructura de los compuestos, la investigación de la quiralidad de los principios activos, la determinación del metabolismo celular y el estudio de proteínas.

b) RMN de protones (^1H -RMN).

❖ Metodología experimental.

El análisis de la muestra de partículas poliméricas no lo realizamos en estado sólido, para evitar que la interacción dipolo-dipolo produzca un ensanchamiento de las líneas y la pérdida de resolución. La preparación rutinaria de una muestra para ^1H -RMN (102) en un instrumento de 300 MHz implica la disolución de 2 mg del compuesto en 0.4 mL de disolvente en un tubo cilíndrico de 5 mm de diámetro externo. El disolvente ideal no poseerá protones y será inerte, de bajo punto de ebullición y barato. Hemos utilizado como disolvente el cloroformo deuterado (CDCl_3), el cual no tiene

resonancias en la región de interés, aunque da lugar a un pequeño pico puntiagudo a $\delta = 7.26$ ppm que no interferirá seriamente.

En nuestro análisis hemos utilizado un espectrómetro de impulsos o de transformada de Fourier (BRUKER AM-300) que permite la obtención de espectros de alta resolución. En este aparato la muestra se coloca en el campo magnético de un imán superconductor y se irradia con impulsos periódicos de energía de radiofrecuencia que atraviesan la muestra perpendicularmente al campo magnético. Esta excitación con impulsos provoca una señal en el dominio del tiempo que decae en el intervalo entre impulsos. Esta señal se convierte entonces en una señal en el dominio de la frecuencia mediante una transformación de Fourier.

La frecuencia de la radiación de radiofrecuencia que se absorbe por un núcleo determinado se ve afectada fuertemente por su entorno molecular, esto es, por los núcleos y electrones vecinos. Como consecuencia de ello, incluso las moléculas más simples proporcionan abundante información espectral que puede servir para elucidar sus estructuras químicas. Podemos destacar dos efectos del entorno en los espectros RMN: el desplazamiento químico (δ), originado por los pequeños campos magnéticos que se generan debido al movimiento de los electrones alrededor de los núcleos, es adimensional y expresa el desplazamiento relativo en ppm; y el desdoblamiento espín-espín, que se produce cuando el momento magnético de un núcleo interacciona con los momentos magnéticos de núcleos adyacentes; se expresa comúnmente en Hz.

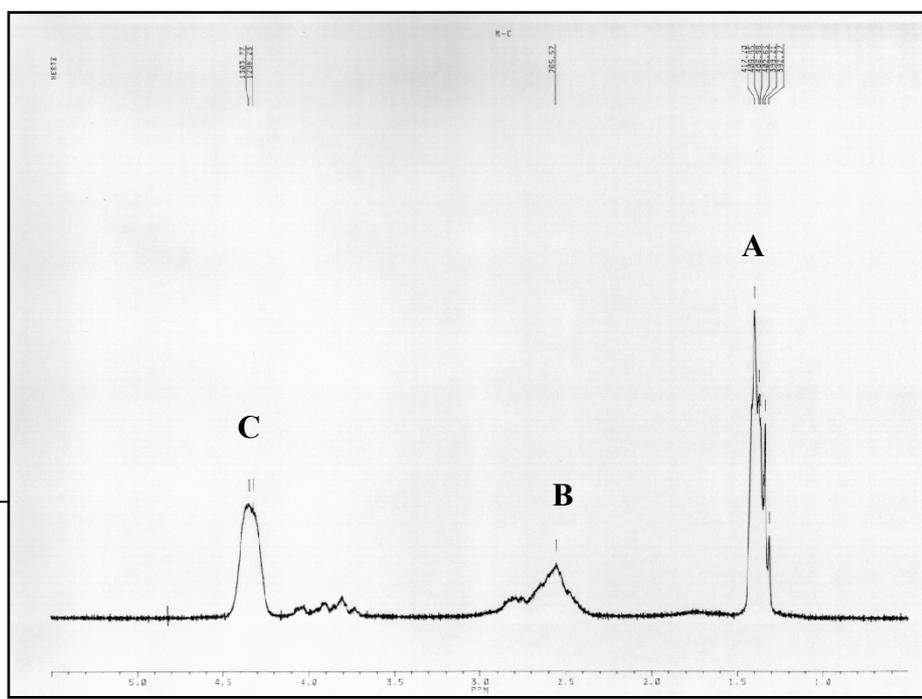
❖ Interpretación del espectro.

El espectro de RMN de protones de un compuesto es su huella dactilar y la identificación se logra mediante comparación con espectros simples o

con los desplazamientos químicos aproximados de protones de determinados grupos funcionales asociados al tetrametilsilano (TMS) (104).

El primer paso es determinar si los picos que se encuentran cerca son producidos por protones de diferentes desplazamientos químicos o son parte de un patrón multiplete. El espectro está constituido por líneas individuales y grupos de líneas llamadas multipletes, que surgen por interacciones a través de enlace entre momentos magnéticos de núcleos vecinos. La información contenida en un espectro RMN incluye los desplazamientos químicos, las constantes de acoplamiento espín-espín y, algunas veces, señales relativas a las constantes de acoplamiento. Los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento son extremadamente sensibles a la estructura molecular y constituyen la base para la aplicación de la RMN a la identificación de la estructura molecular.

La Fig. 13 recoge el espectro ^1H -RMN de las partículas poliméricas; en él pueden destacarse tres picos claramente definidos que se interpretan como sigue: La banda *A* ($\delta = 1.4$ - 1.3 ppm) corresponde a los protones del carbono adyacente localizado en posición α con respecto al grupo éster de la molécula. La banda *B* ($\delta = 2.5$ - 2.6 ppm) es generada por los hidrógenos de los grupos metilenos que constituyen la cadena principal del polímero. Por último, la banda *C* ($\delta = 4.3$ - 4.4 ppm) es producida por el grupo metileno localizado en la cadena de sustitución del polímero. Destaca la gran similitud



de espectro con el correspondiente al poli(isobutilcianoacrilato) (105).

Fig. 13: Espectro de ^1H -RMN del poli(etil-2-cianoacrilato).

c) RMN de carbono 13 (^{13}C -RMN).

❖ Metodología experimental.

Para la obtención de espectros de ^{13}C -RMN es preciso disponer de instrumentos suficientemente sensibles que permitan la detección de las débiles señales del núcleo del ^{13}C . La baja intensidad de la señal se relaciona directamente con la poca abundancia natural del isótopo y la pequeña relación giromagnética, que es aproximadamente la cuarta parte de la del protón. Estos factores se combinan para hacer que la ^{13}C -RMN sea unas 6000 veces menos sensible que la ^1H -RMN. Los instrumentos que permiten el tratamiento de los datos mediante transformada de Fourier, facilitan la obtención de estos espectros.

En relación con la capacidad para dilucidar estructuras orgánicas y bioquímicas, la ^{13}C -RMN tiene algunas ventajas sobre la de protón (102). En primer lugar, la ^{13}C -RMN proporciona información acerca del esqueleto de las moléculas más que sobre su periferia. Además, el intervalo de desplazamiento químico para el ^{13}C en la mayor parte de los compuestos orgánicos es alrededor de 200 ppm, comparado con las 10 a 15 ppm para el protón. Como consecuencia, hay menos solapamiento de picos en los espectros de ^{13}C que en los espectros de protones. No se observa el desacoplamiento homonuclear espín-espín entre átomos de carbono, debido a que en muestras con abundancia isotópica natural la probabilidad de que dos átomos de ^{13}C sean adyacentes es pequeña. Además, no ocurre el acoplamiento de espín heteronuclear entre ^{13}C y ^{12}C , debido a que el número cuántico de espín de éste último es cero. Por último, existen excelentes métodos para el acoplamiento de la interacción entre los átomos de ^{13}C y los

protones. Con el desacoplamiento, el espectro para un tipo particular de carbono, por lo general, presenta una sola línea.

La preparación de la muestra siguió la misma metodología que la empleada en la ^1H -RMN y para la obtención del espectro también utilizamos el mismo aparato (BRUKER AM-300). Esta vez sí se observará un pico pronunciado del CDCl_3 a $\delta = 77$ ppm, que no debe interferir en el análisis.

❖ Interpretación del espectro.

Para la interpretación del espectro hemos seguido la misma rutina que en la interpretación del espectro de protones, por lo que hemos utilizado recopilaciones de espectros de ^{13}C -RMN y una tabla que relacionaba la estructura a la que pertenecía el átomo de carbono que originaba el pico con el desplazamiento químico observado (106).

En la Fig. 14 se representa el espectro de ^{13}C -RMN de las partículas de polímero. La banda *A* (13 ppm) pertenece al carbono presente en el grupo metilo de la cadena lateral del polímero. La banda *B* (34 ppm) pertenece al carbono tetrasustituido de la columna vertebral del polímero. La banda *C* (43 ppm) pertenece al carbono metilénico de la columna vertebral de este compuesto. La *D* (64 ppm) es característica del grupo metileno de la cadena lateral. La banda *E* es característica del disolvente (77 ppm). La banda observada a 115 ppm (*F*), pertenece al carbono presente en el grupo ciano. La *G* (166 ppm) es característica del carbono presente en el grupo éster. Este espectro es de nuevo similar al correspondiente al poli(isobutilcianoacrilato) (105).

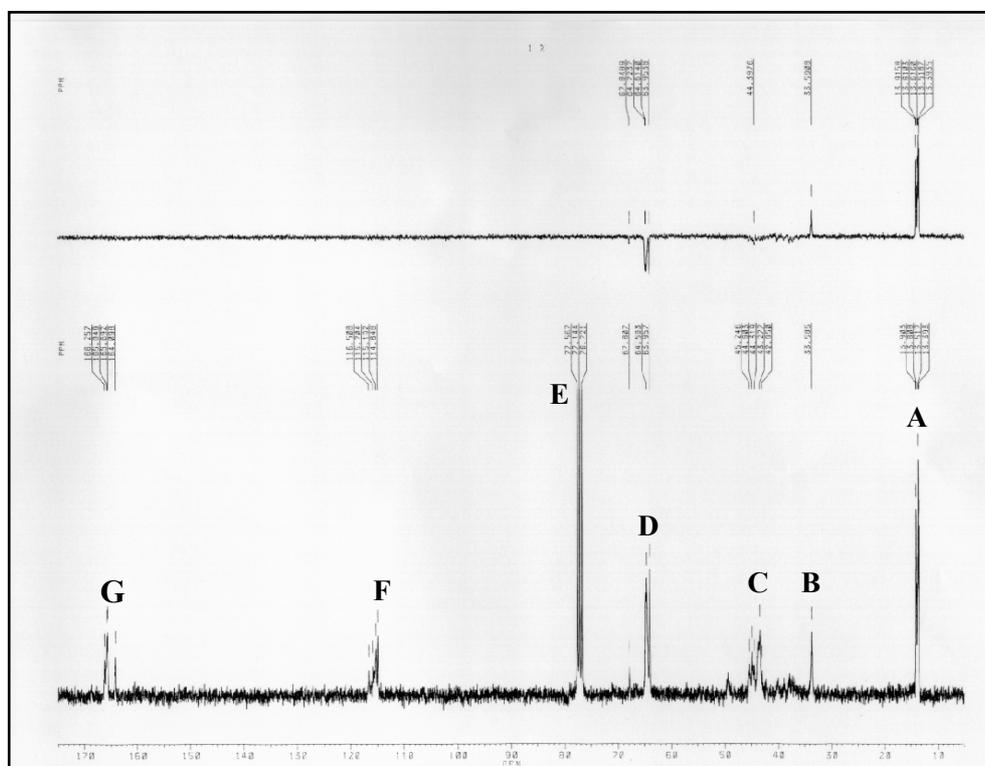


Fig. 14: Espectro de ^{13}C -RMN del poli(etil-2-cianoacrilato).

2.2.5. Espectrometría de masas de ión secundario.

a) Fundamentos teóricos.

La espectrometría de masas es una técnica analítica de gran especificidad y sensibilidad que se utiliza para identificar compuestos, cuantificar materiales conocidos y dilucidar las propiedades estructurales y físicas de los iones. Entre el amplio abanico de técnicas, destaca la espectrometría de masas de ión secundario (SIMS) por ser el más desarrollado de los métodos de análisis de superficies en cuanto a la determinación de la composición atómica y molecular. Mediante la separación de átomos o moléculas cargadas según su relación masa/carga (m/z) determinaremos las masas moleculares relativas de compuestos orgánicos y

biopolímeros, obteniendo además información estructural. Los pesos moleculares de los componentes se determinan basándose en la relación m/z de los iones obtenidos de una muestra (107).

La espectrometría de masas de ión secundario “líquida” (LSIMS) es una técnica de ionización intermedia, en cuanto a la cantidad de energía interna utilizada. Se basa en hacer incidir sobre una muestra un haz de iones (108), induciendo una ionización escasa o nula ya que sólo introduce en la fase gaseosa iones que estaban ya presentes en la disolución. Unos pocos microlitros de muestra previamente disuelta en una matriz líquida apropiada (109-111) son depositados en un pequeño receptáculo de acero inoxidable al final de una sonda que es insertada en el espectrómetro de masas. Las señales obtenidas mediante la utilización de una matriz líquida son más intensas y duraderas que las generadas mediante la espectrometría de masas de ión secundario “sólida” (SIMS).

La muestra es bombardeada con un haz primario de iones de elevada energía (generalmente, Cs^+ de 10 a 50 keV). El impacto sobre los átomos de la capa superficial de la muestra líquida provoca su expulsión, por lo que entran en estado gaseoso y son ionizados dando lugar a haces de iones secundarios mediante protonización o desprotonización. Los iones generados tienden a ser estables y exhiben escasa fragmentación. A pesar de que estos iones positivos y negativos pueden generarse al mismo tiempo, se elige una polaridad y los seleccionados son extraídos de la fuente de iones. A continuación, se aceleran por la diferencia de potencial próxima al analizador y se analiza su masa. Las moléculas que no se ionizan son eliminadas mediante bombeo y no se detectarán. El espectro de masas es complejo y está caracterizado por picos correspondientes a grupos de iones de la matriz, a iones del analito, a iones representantes de impurezas y a iones de otros modificadores de la matriz (por ejemplo, el ácido trifluoroacético) que fueron añadidos en un intento de incrementar la abundancia del ión analito. Los picos iónicos pseudomoleculares positivos observados son aductos formados por cationes de origen salino [por ejemplo, $(\text{M}+\text{H})^+$, $(\text{M}+\text{K})^+$ y $(\text{M}+\text{Na})^+$], mientras que los iones pseudomoleculares negativos típicos observados son $(\text{M}-\text{H})^-$.

b) Metodología experimental y resultados.

Para la determinación del peso molecular de las partículas de PE-2-CA, hemos utilizado el espectrómetro de masas de alta resolución Micromass modelo Autospec-Q de triple sector (EBE) y analizador cuadrupolar para la realización de experiencias MS/MS, con rango de medida hasta 5000 Da. Este aparato fue utilizado para la realización de la técnica LSIMS+ por bombardeo de Na^+ , ya descrita. La calibración del aparato se realizó utilizando una muestra de polietilenglicol de espectro conocido y la matriz en la que se diluyó la muestra de polímero estaba constituida por una disolución de nitrobenzilalcohol (NOBA). Una vez disuelta la muestra, se inyectaron unos pocos microlitros y se procedió a la obtención del espectro de masas (Fig. 15).

La Fig. 16 se obtiene agrupando los picos obtenidos en 8 señales (haciendo media con los valores de peso molecular y sumando las cuentas/s) y restando el peso atómico del sodio. Debemos destacar que cada uno de los picos así obtenidos se diferencia en torno a 125 Da, lo que corresponde al peso molecular del monómero y, por lo tanto, se deduce que cada uno de los picos/polímeros se diferencia del anterior en que presenta una unidad de monómero más en su estructura. De esta forma se observa que el polímero más abundante es el constituido por 7 monómeros y el peso molecular medio de las partículas de polímero es 861 ± 12 Da.

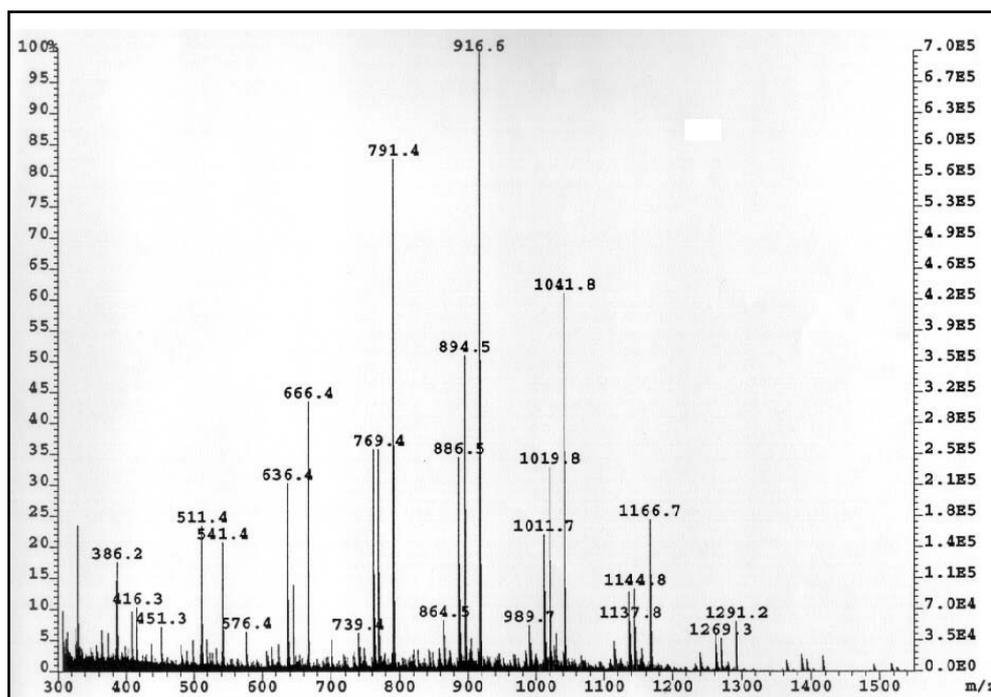


Fig. 15: Espectro de masas del poli(etil-2-cianoacrilato). Eje x : relación m/z (Da), eje y (derecha): iones secundarios (cuentas/s), y eje y (izquierda): frecuencia (%).

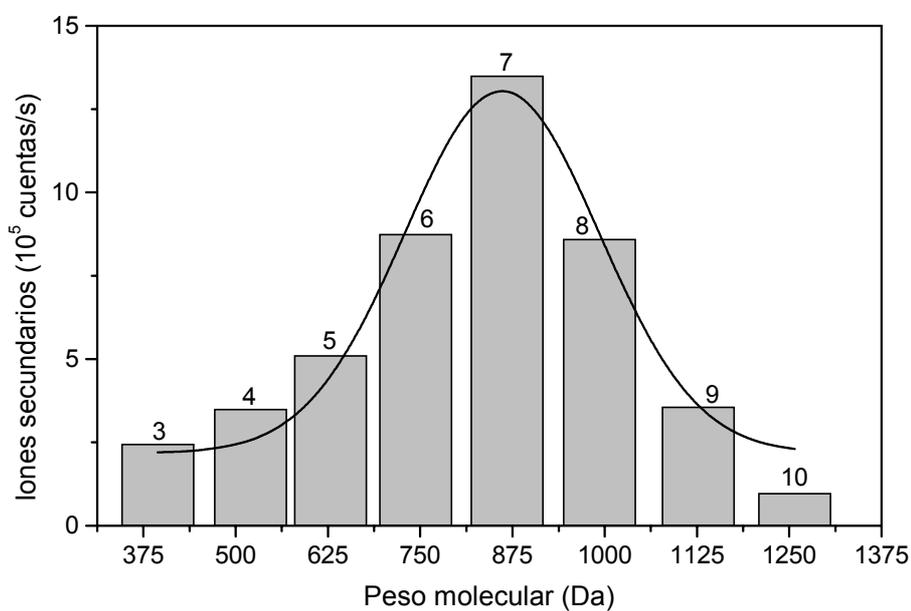


Fig. 16: Espectro de masas del poli(etil-2-cianoacrilato) corregido. La curva corresponde a una distribución de pesos moleculares gaussiana y los números sobre cada columna indican el número de monómeros que constituye cada polímero.

2.2.6. Propiedades magnéticas.

a) Fundamentos teóricos.

Las propiedades magnéticas macroscópicas de los materiales son consecuencia de los momentos magnéticos asociados con sus átomos individuales. En un átomo, cada electrón tiene momentos magnéticos que se originan de dos fuentes distintas. Una de estas fuentes está relacionada con el movimiento orbital del electrón alrededor del núcleo; el electrón, siendo una carga en movimiento, puede ser considerado como una pequeña espira de corriente que genera un campo magnético muy pequeño y tiene un momento magnético a lo largo de su eje de rotación. El otro momento magnético se origina del espín del electrón y, por tanto, el momento magnético neto de un átomo es justamente la suma de los momentos magnéticos de cada uno de los electrones constituyentes, incluyendo tanto las contribuciones orbitales como de espín y tomando en consideración la cancelación de los momentos. Entre los distintos tipos de magnetismo se incluyen el diamagnetismo, el paramagnetismo y el ferromagnetismo; junto a éstos, el antiferromagnetismo y el ferrimagnetismo son considerados subclases del ferromagnetismo (112).

- Diamagnetismo: es una forma muy débil de magnetismo que no es permanente y persiste sólo mientras el campo externo está presente. Está asociado a átomos cuyo momento magnético neto es nulo y se debe a un cambio en el movimiento orbital de los electrones debido al campo magnético aplicado. La permeabilidad magnética relativa (μ_r) es ligeramente menor que la unidad y la susceptibilidad magnética (χ) es negativa. Recuérdense las ecuaciones de estas magnitudes: la susceptibilidad χ es una magnitud característica de cada material (que, en general, depende de la temperatura, la orientación de la muestra respecto al campo aplicado e incluso del valor de éste) y que relaciona

la imanación M (momento magnético por unidad de volumen) y el campo magnético H :

$$M = \chi \cdot H \quad (9)$$

La relación entre la inducción magnética B y el campo H en un medio imanado es:

$$B = \mu_0 (H + M) \quad (10)$$

siendo μ_0 la permeabilidad magnética del vacío. Aplicando la Ec. 9:

$$B = \mu_0 (1 + \chi) H = \mu_0 \mu_r H = \mu H \quad (11)$$

que constituye la definición de permeabilidad magnética relativa (μ_r) y absoluta (μ).

- Paramagnetismo: es característico de aquellos átomos o moléculas que tienen momentos magnéticos permanentes que no interaccionan entre sí y que en ausencia de campo externo están orientados al azar, de modo que una porción cualquiera de material no posee imanación neta permanente. Estos dipolos atómicos son libres para girar y se producirá paramagnetismo cuando, mediante rotación, se alineen de forma preferente con un campo externo. La susceptibilidad es positiva y depende de la temperatura; la permeabilidad será ligeramente mayor que la unidad.
- Ferromagnetismo: en estos materiales las interacciones de acoplamiento hacen que los momentos magnéticos netos de espín de átomos adyacentes se alineen unos con otros aun en ausencia de un campo magnético aplicado. Esta alineación mutua de los espines se presenta en volúmenes relativamente grandes del cristal denominados

dominios. La máxima imanación posible (magnetización de saturación) corresponde a la situación en que todos los dipolos magnéticos en una muestra sólida están mutuamente alineados con el campo externo. Estos materiales presentan una permeabilidad magnética relativa en torno a 10^5 y una susceptibilidad magnética positiva y muy grande, ambas dependientes de H y de la temperatura.

- Antiferromagnetismo: fenómeno de acoplamiento entre los momentos magnéticos que produce un alineamiento antiparalelo, de modo que no mostrarán imanación espontánea distinta de cero. Estos materiales tienen: $\mu_r > 1$ y χ_m positiva.

- Ferrimagnetismo: la interacción de intercambio entre momentos magnéticos en estos materiales favorece también la alineación antiparalela, pero los momentos no son idénticos en módulo, por lo que no se cancelan completamente. Su comportamiento será por ello parecido al de los ferromagnéticos.

La magnetita es un material iónico ferrimagnético con estructura cristalina cúbica holoédrica del tipo de las espinelas inversas y que pertenece al grupo de las ferritas blandas (112). Su fórmula puede escribirse como $\text{Fe}^{2+}\text{O}^{2-}(\text{Fe}^{3+})_2(\text{O}^{2-})_3$ en la cual los iones Fe existen en los estados de valencia +2 y +3 en una proporción 1:2. Para cada uno de los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} existe un momento magnético que corresponde a 4 y 5 magnetones de Bohr, respectivamente. Además, los iones O^{2-} son magnéticamente neutros. Entre los iones Fe^{2+} y Fe^{3+} se producen interacciones de acoplamiento de los espines en las direcciones antiparalelas, similares a las que se producen en el caso del antiferromagnetismo. Sin embargo, se produce un momento ferrimagnético neto debido a que los momentos de espín no se cancelan completamente.

b) Metodología experimental y resultados.

Las propiedades magnéticas de las partículas de magnetita quedan muy bien definidas mediante la determinación de la curva de primera imanación y el ciclo de histéresis. Estas determinaciones se realizaron utilizando un equipo magnetómetro-susceptibilímetro Manics DSM-8 del Centro de Instrumentación Científica de la UGR.

Cualquier material ferromagnético o ferrimagnético (112, 113) a temperaturas inferiores a la temperatura de Curie está formado por pequeñas regiones tridimensionales en las cuales todos los momentos magnéticos están alineados en la misma dirección. Estas regiones se denominan dominios y cada uno está magnetizado hasta la saturación. Los dominios adyacentes están separados por paredes de dominio, a través de las cuales la dirección de imanación cambia gradualmente. La densidad de flujo (B) y la intensidad del campo magnético (H) no son proporcionales en el caso de los materiales ferromagnéticos y ferrimagnéticos. Si el material está inicialmente no imanado, entonces B varía en función de H según se muestra en la Fig. 17. La curva empieza en el origen, y a medida que aumenta H , la inducción B empieza a aumentar lentamente y después más rápidamente hasta que al final alcanza un nivel determinado y se hace independiente de H . Este valor máximo de B es la densidad de flujo de saturación (B_s) y la imanación correspondiente es la imanación de saturación (M_s). Según la ecuación $B = \mu H$, la permeabilidad (μ) es la pendiente de la curva B frente a H , y se puede apreciar en la Fig. 17 que cambia con H . En algunas ocasiones, la pendiente de B frente a H (a $H = 0$) se especifica como una propiedad del material, denominada permeabilidad inicial (μ_i), tal como se indica en la Fig. 17.

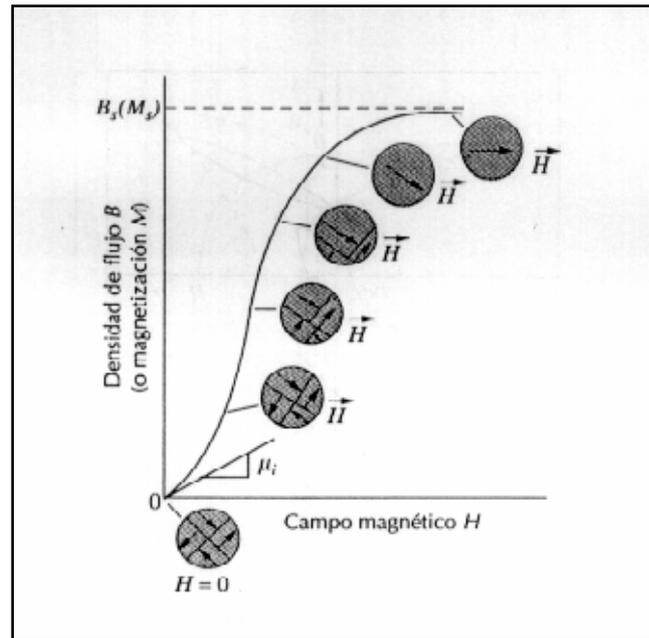


Fig. 17: Comportamiento de B frente a H de un material ferromagnético o ferrimagnético que estaba inicialmente desmagnetizado. Se representan las configuraciones de los dominios durante varios estadios de la imanación.

A medida que se aplica el campo H , los dominios cambian de forma y tamaño debido al movimiento de los límites de dominio. Las estructuras típicas de los dominios están representadas de forma esquemática en varios puntos de la curva de la Fig. 17. Inicialmente, los momentos de los dominios constituyentes están orientados al azar de tal manera que no existe un campo de momento neto B (o M). A medida que se aplica el campo externo, los dominios que están orientados en direcciones favorables al campo aplicado (o casi alineados con él) crecen a expensas de aquellos que no están favorablemente orientados. Este proceso continúa al aumentar la intensidad del campo hasta que la muestra macroscópica se convierte en un solo dominio, el cual está casi completamente alineado con el campo. La saturación se alcanza cuando este dominio gira y se orienta con el campo H .

La determinación del modo de variación de la imanación de la muestra con el campo externo aplicado es la herramienta adecuada para caracterizar (a nivel

macroscópico) el comportamiento magnético de nuestras partículas. En la Fig. 18 representamos la curva de primera imanación o curva $M-H$ de las partículas de magnetita y de las partículas compuestas. Esta determinación se llevó a cabo a temperatura ambiente (25 °C) ya que a esta temperatura se realiza la preparación de las suspensiones. Como se puede observar, el recubrimiento polimérico reduce la imanación de la muestra, pero el comportamiento de la magnetita y de las partículas compuestas es muy similar. Así, la susceptibilidad inicial es $\chi_i = 5.36 \pm 0.05$ para la magnetita y $\chi_i = 0.61 \pm 0.03$ para las partículas compuestas. La permeabilidad inicial es $\mu_i = 6.36 \pm 0.05$ para la magnetita y $\mu_i = 1.61 \pm 0.03$ para las compuestas. De igual modo, la imanación de saturación es 414.4 ± 1.4 y 58.6 ± 0.3 kA/m, respectivamente.

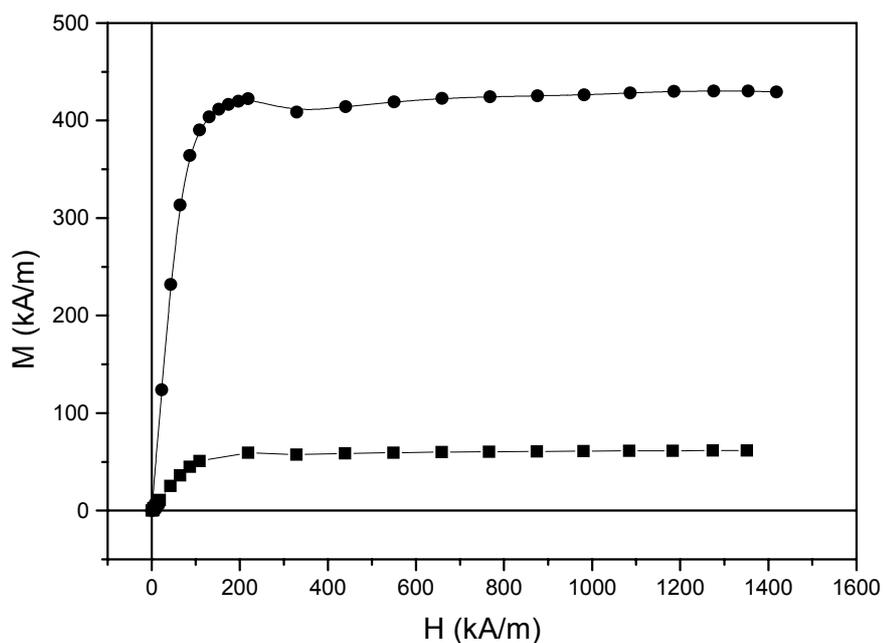


Fig. 18: Curva de primera imanación de las partículas de magnetita (●) y de las partículas compuestas (■).

A partir de la saturación, punto S de la Fig. 19, a medida que el campo H se reduce, la curva no invierte su camino original, sino que se produce un efecto de histéresis en el que el campo B va retrasado con respecto al campo aplicado H ,

es decir, disminuye más lentamente. Cuando el campo H es cero (punto R de la curva), existe un campo residual B que se denomina remanencia, o densidad de flujo remanente, B_r ; el material permanece imanado en ausencia de un campo externo H .

El comportamiento de histéresis y la imanación permanente pueden explicarse por el movimiento de las paredes de los dominios. Al invertir la dirección del campo desde la saturación (punto S de la Fig. 19), el proceso mediante el cual cambia la estructura de los dominios se invierte. En primer lugar, existe rotación del dominio único con el campo invertido. Más tarde, los dominios con los momentos magnéticos alineados con el nuevo campo crecen a expensas de los primeros. Para esta explicación es crucial la resistencia al movimiento de las paredes de los dominios que ocurre en respuesta al aumento del campo magnético en la dirección opuesta; esto explica el desfase entre B y H , es decir, la histéresis. Cuando el campo aplicado se hace nulo, todavía existe una fracción neta de dominios orientados en la dirección inicial, lo cual explica la existencia de la remanencia B_r .

Para reducir a cero el campo B dentro de la muestra (punto C de la Fig. 19), se debe aplicar un campo H de magnitud a $-H_c$ en la dirección opuesta a la del campo original; H_c se denomina coercitividad, o bien, algunas veces fuerza coercitiva. Al continuar aplicando el campo en la dirección contraria a la del campo original, tal como se indica en la figura, finalmente se alcanza la saturación en la dirección opuesta, correspondiendo al punto S'. Una segunda inversión del campo hasta el punto de la saturación inicial (punto S) completa el ciclo de histéresis simétrico y también produce una remanencia negativa ($-B_r$) y una coercitividad positiva ($+H_c$). La curva B frente a H de la Fig. 19 representa un ciclo de histéresis hasta saturación. Desde luego, no es necesario aumentar el campo H hasta la saturación antes de invertir su dirección; además, es posible invertir la dirección del campo en cualquier punto a lo largo de la curva y generar otros ciclos de histéresis.

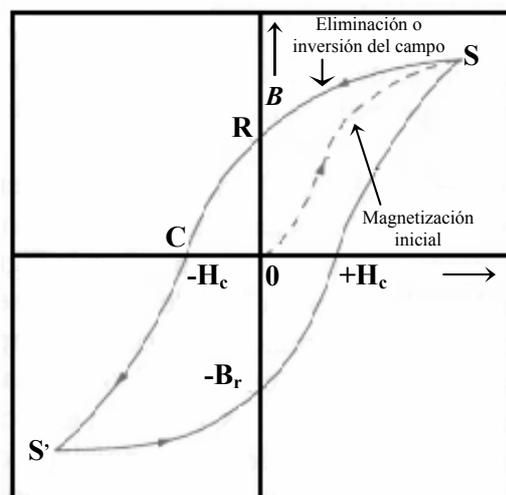


Fig. 19: Densidad de flujo magnético frente a la intensidad del campo magnético de un material ferromagnético para la saturación en ambas direcciones (puntos S y S'). La curva de histéresis viene representada por la curva sólida; la curva discontinua indica la primera imanación. La remanencia B_r y la fuerza coercitiva H_c también se indican.

La obtención del ciclo de histéresis de nuestra muestra es la herramienta adecuada para completar la caracterización (a nivel macroscópico) del comportamiento magnético de las partículas. En la Fig. 20 representamos la curva de histéresis de las partículas de magnetita y de las partículas compuestas. Esta determinación se realizó en idénticas condiciones que la experiencia anterior (a 25 °C). Las características de histéresis determinan el carácter marcadamente blando de nuestros materiales, no pudiéndose observar el área relativa del ciclo de histéresis debido a la insuficiente sensibilidad del aparato utilizado. Los materiales magnéticos blandos se caracterizan por tener una alta permeabilidad inicial y una baja fuerza coercitiva, pudiendo alcanzar la saturación con un campo aplicado relativamente pequeño (es decir, son fácilmente magnetizables y desmagnetizables) y con pérdidas de energía pequeñas. Nuevamente se observa que el recubrimiento polimérico reduce las propiedades magnéticas de la muestra, aunque el comportamiento de la magnetita y de las partículas compuestas es muy similar. Nuestras partículas compuestas cumplen pues con el requisito que buscábamos: su superficie es comparable a la del polímero, pero tienen la

propiedad de ser imanables, con lo que constituyen un vehículo ideal para el transporte de fármacos.

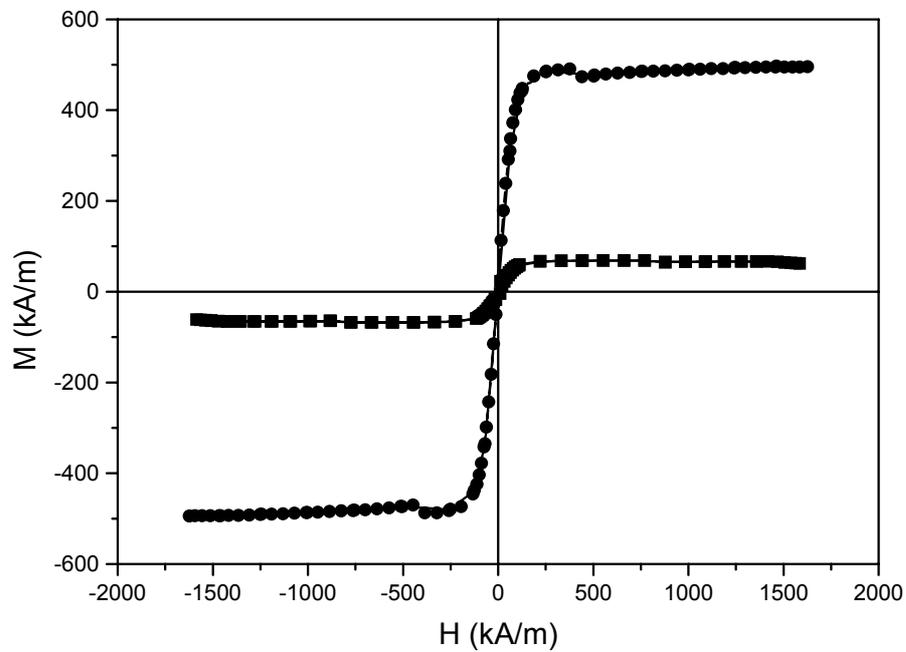


Fig. 20: Curva de histéresis de las partículas de magnetita (●) y de las partículas compuestas (■).

Capítulo 3.

PROPIEDADES ELÉCTRICAS SUPERFICIALES

3.1. INTRODUCCIÓN.

Consideremos una partícula sólida esférica de 1 cm de diámetro. Su superficie S y su volumen V son, respectivamente, $3.14 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ y $5.24 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3$, y la relación superficie/volumen será $S/V \approx 600 \text{ m}^{-1}$. La división de la partícula en N partículas esféricas de radio 100 nm tal que su volumen total sea igual al de la esfera original, sin embargo, provocará que la superficie sea de 15.7 m^2 y la relación $S/V \approx 3 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$. Este sencillo ejemplo explica que la principal contribución a las propiedades de un sistema, formado mediante la dispersión de esas N partículas en 1 L de agua, vendrá dada por las superficies e interfases de las partículas. En particular, el estado eléctrico de la superficie de las partículas puede ser determinante: si cada una de ellas tiene un potencial superficial de 100 mV (en torno al orden de magnitud típico de las partículas coloidales en medio acuoso), la fuerza electrostática repulsiva entre dos de estas partículas dispersas en agua y localizadas a una distancia entre superficies de 10 nm es $F^{EL} \approx 2.12 \cdot 10^{-12} \text{ N}$. Esta fuerza tiene que compararse con la fuerza de otras interacciones que deben o pueden existir entre ellas. Así, su atracción gravitatoria a la misma distancia será $F^G \approx 6.3 \cdot 10^{-15} \text{ N}$, si su densidad es 10^3 kg/m^3 ; y la atracción de van der Waals $F^{LW} \approx 8 \cdot 10^{-13} \text{ N}$, utilizando los valores típicos de la constante de Hamaker (114). Estos ejemplos muestran que, en la mayoría de los casos, las interacciones electrostáticas son las principales responsables de las propiedades macroscópicas de las suspensiones.

En este contexto, los fenómenos electrocinéticos y las técnicas asociadas a ellos demuestran su importancia. Son manifestaciones de las propiedades eléctricas de la interfase, y de aquí que merezcan atención por sí mismas. Además, son una fuente de información importante (única, en muchos casos) de estas propiedades eléctricas, por poder ser determinadas experimentalmente.

Como describiremos, la electroforesis (como los demás fenómenos electrocinéticos) constituye una poderosa técnica para obtener información directa

sobre el estado eléctrico de la interfase. En este trabajo hemos investigado la movilidad electroforética (μ_e) de los tres tipos de partículas, como método de evaluación de la calidad y eficiencia del recubrimiento. Esto es posible dado que el comportamiento eléctrico superficial de la magnetita y del polímero poli(etil-2-cianoacrilato) son claramente diferentes, como veremos. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que una partícula de magnetita recubierta adecuadamente de polímero se pueda diferenciar de una no recubierta, analizando su comportamiento en electroforesis. Idealmente, la partícula compuesta debería incluso mostrar un potencial zeta idéntico al del polímero.

Dada la sensibilidad de la electroforesis a las características de la interfase, esta técnica puede ser útil para analizar el proceso de degradación del polímero que recubre a la magnetita en las partículas compuestas sintetizadas. Analizaremos la evolución temporal de la movilidad de estas últimas, como método de seguimiento de la degradación del polímero en agua.

Por otro lado, en el curso de esta investigación encontramos que las suspensiones de magnetita arrojaban a veces resultados un tanto erráticos en su movilidad electroforética. Parecía existir algún tipo de dependencia temporal de μ_e cuyo estudio no aparecía recogido en la bibliografía. Por ello, se investigó sistemáticamente este efecto del tiempo sobre la movilidad. Los resultados encontrados se detallan también en este capítulo.

3.2. DESCRIPCIÓN CLÁSICA DE LA DOBLE CAPA ELÉCTRICA.

Admitiremos como un hecho experimental que la mayoría de los sólidos adquieren una carga eléctrica superficial cuando se dispersan en un disolvente polar, en particular, en una disolución de electrolito. Los orígenes de esta carga son diversos (114-117):

1. Adsorción preferente de iones en disolución. Este es el caso de la adsorción de tensioactivo iónico. Las entidades cargadas deben tener una elevada afinidad por la superficie, para evitar la repulsión electrostática por los iones ya adsorbidos.
2. Adsorción/desorción de iones de la red. Un ejemplo típico son las partículas de yoduro de plata en disoluciones Ag^+ o I^- : los iones de la red cristalina pueden encontrar fácilmente un camino entre los espacios del cristal y pasar a formar parte de la superficie. Por ello, se denominan *iones determinantes del potencial*.
3. Disociación o ionización de grupos superficiales. Este es el mecanismo mediante el cual la mayoría de los polímeros de látex adquieren carga. Así, los grupos ácidos como el sulfato o el carboxilo son responsables de la carga negativa de las redes de polímero aniónico. Cuando el pH está por encima del pK_a de disociación de estos grupos, la mayoría de ellos estarán ionizados, generando la carga negativa. En el caso de los óxidos, los grupos superficiales anfóteros MOH pueden generar carga positiva o negativa, dependiendo del pH; los iones H^+ y OH^- serán, por lo tanto, los *iones determinantes del potencial* para los óxidos.
4. Red de carga incompleta: sustitución isomórfica. Este es el mecanismo típico, casi exclusivo, de adquisición de carga por los minerales de arcilla: parte de los cationes Si^{4+} y Al^{3+} de la estructura ideal son sustituidos por otros iones de menor carga y, prácticamente, el mismo tamaño. Como consecuencia de esto, el cristal podrá estar cargado negativamente y esta carga estructural habrá de ser compensada por cationes superficiales, fácilmente intercambiables en disolución (118).

Cualquiera que sea el mecanismo (y hay situaciones en las que participa más de uno de ellos), la carga neta superficial debe estar compensada por iones en torno a la partícula de modo que se mantenga la electroneutralidad del sistema. La

carga superficial y su contracarga compensadora en disolución forman la doble carga eléctrica (DCE). A pesar de utilizarse la palabra “doble”, su estructura puede ser muy compleja, no totalmente resuelta en la mayoría de los casos, y puede contener tres o más capas, que se extienden a lo largo de distancias variables desde la superficie del sólido.

Cerca de la superficie o sobre ella, se pueden encontrar cargas responsables de la carga superficial σ_0 . En su proximidad inmediata, podrían localizarse los iones capaces de sufrir adsorción específica: la distancia al sólido será del orden de un radio iónico, dado que se puede suponer que han perdido su capa de hidratación, al menos en la dirección de la superficie del sólido. Llamemos σ_i a la carga superficial en un determinado plano de átomos, localizados a una distancia β_i desde el sólido (Fig. 21). Si aceptamos que la interfase tiene una geometría plana, y que x es la distancia externa normal a esta, podemos decir que la región entre $x = 0$ y $x = \beta_i$ está libre de carga, y podemos identificar un condensador cuyas placas son la superficie y el plano β_i . Si C_i es su capacidad específica (por unidad de área):

$$\psi_0 - \psi_i = \frac{\sigma_0}{C_i} \quad (12)$$

donde ψ_0 es el potencial en la superficie del sólido. Los iones responsables de ψ_i no sólo desarrollarán interacciones electrostáticas con la superficie: de hecho, a menudo superan la repulsión eléctrica y son capaces, por ejemplo, de aumentar la carga positiva de una superficie de carácter ya positivo. Es habitual decir que las interacciones desconocidas son de naturaleza química, a pesar de que este no es, estrictamente hablando, siempre el caso. Hay una amplia variedad de situaciones, desde la formación de uniones químicas (covalentes) a interacciones más débiles como la atracción de van der Waals, los enlaces por puentes de hidrógeno, las fuerzas hidrófobas-hidrófilas, etc. (116). Debido a la ausencia habitual de

información sobre la parte más interna de la atmósfera iónica, el tratamiento a menudo no está exento de hipótesis y suposiciones más o menos realistas.

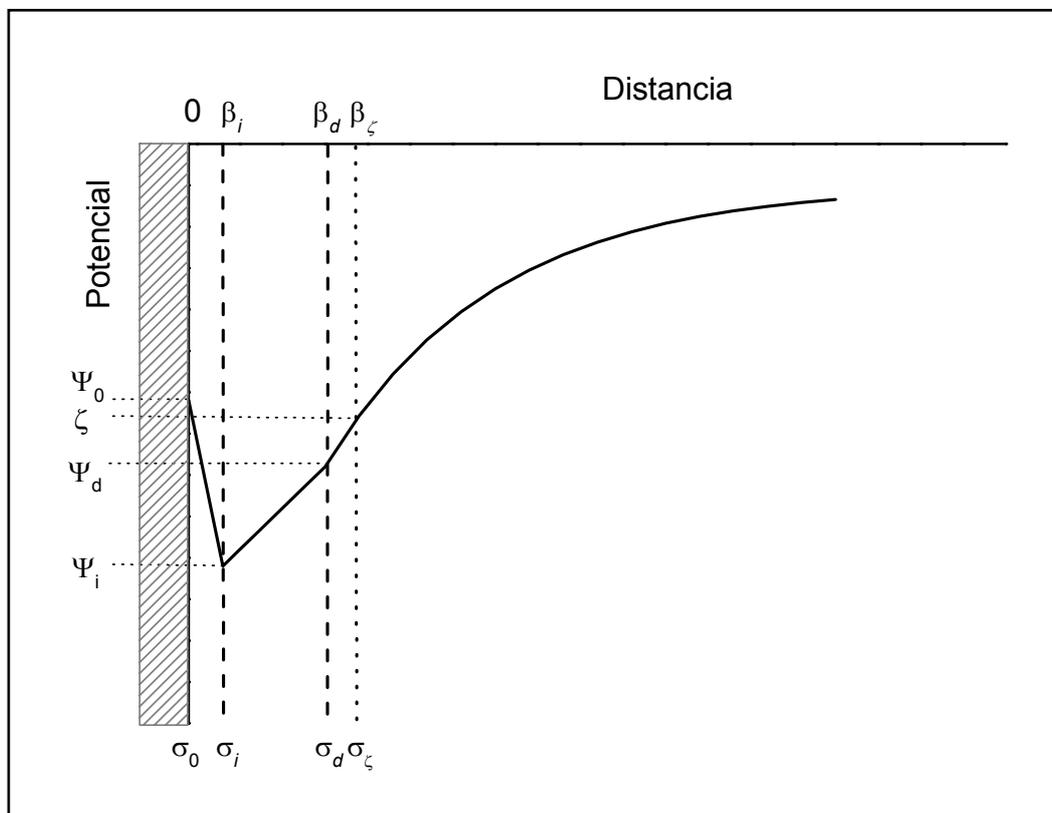


Fig. 21: Representación esquemática de la distribución de potencial en una interfase cargada negativamente.

A partir del plano $x = \beta_d$ se localizan los iones que sólo poseen interacciones electrostáticas con la superficie y además, están sujetos a colisiones con las moléculas del disolvente: de hecho están distribuidos en un cierto volumen cuya densidad de carga es $\rho(x)$, aunque en la práctica se introduce una densidad superficial de carga difusa σ_d , localizada en $x = \beta_d$, de acuerdo con la expresión:

$$\sigma_d = \int_{\beta_d}^{\infty} \rho(x) dx \quad (13)$$

para una interfase plana, o:

$$\sigma_d = \frac{1}{(a + \beta_d)^2} \int_{\beta_d}^{\infty} r^2 \rho(r) dr \quad (14)$$

para una interfase esférica de radio a , siendo r la coordenada radial con origen en el centro de la partícula.

Debido a la electroneutralidad:

$$\sigma_0 = -\sigma_i - \sigma_d \quad (15)$$

Con el objetivo de familiarizarnos con la nomenclatura (desafortunadamente, hay casi tantos criterios como autores en lo concerniente a los símbolos utilizados para los diferentes potenciales), mencionaremos:

1. La distribución volúmica de carga que se extiende desde $x = \beta_d$ se denomina *capa difusa* o *parte difusa de la doble capa*.
2. La región entre $x = 0$ y $x = \beta_d$ se denomina a menudo *capa de Stern*, *parte interna de la doble capa* o *parte densa de la doble capa*.
3. El plano $x = \beta_i$ es el *plano interior de Helmholtz* (PIH) y a $x = \beta_d$ se le llama *plano exterior de Helmholtz* (PEH). El PEH identifica el comienzo de la capa difusa.

La capa difusa puede describirse matemáticamente de una manera simple: la condición de equilibrio para los iones en esta capa puede escribirse (119):

$$-ez_i \nabla \psi - k_B T \nabla \ln n_i = 0, \quad i = 1, \dots, N \quad (16)$$

donde el primer término corresponde a la fuerza electrostática sobre los iones i (carga ez_i , concentración n_i) y el segundo es la fuerza termodinámica. La integración de la Ec. 16 bajo la condición $n_i = n_i^0(\infty)$ para $\psi = 0$, da lugar a la distribución de Boltzmann:

$$n_i(\vec{r}) = n_i^0(\infty) \exp[-ez_i\psi(\vec{r})/k_B T], \quad i = 1, \dots, N \quad (17)$$

donde $n_i^0(\infty)$ es la concentración de los iones i lejos de la partícula, k_B es la constante de Boltzmann, y T es la temperatura absoluta. Finalmente, la ecuación de Poisson nos dará la relación entre el potencial y las concentraciones iónicas:

$$\nabla^2\psi(\vec{r}) = -\frac{1}{\epsilon_{rs}\epsilon_0}\rho(\vec{r}) = -\frac{1}{\epsilon_{rs}\epsilon_0}\sum_{i=1}^N ez_i n_i^0(\infty) \exp\left[-\frac{ez_i\psi(\vec{r})}{k_B T}\right] \quad (18)$$

siendo $\epsilon_{rs}\epsilon_0$ la permitividad eléctrica del medio de dispersión. La Ec. 18 (ecuación de Poisson-Boltzmann) es el punto de partida de la descripción de Gouy-Chapman de la capa difusa.

Debe estar claro que no hay una solución general a esta ecuación en derivadas parciales, excepto en determinados casos, tales como (119, 120):

1. Una interfase plana, con potencial bajo. En este caso:

$$\psi = \psi_d e^{-\kappa x} \quad (19)$$

donde κ^{-1} es la longitud de Debye, y claramente es una medida del espesor de la capa difusa. Su valor es:

$$\kappa^{-1} = \left\{ \frac{\varepsilon_{rs} \varepsilon_0 k_B T}{\sum_{i=1}^N e^2 z_i^2 n_i^0(\infty)} \right\}^{1/2} \quad (20)$$

Para hacerse una idea de los valores típicos de κ^{-1} , es útil la siguiente fórmula práctica para un electrolito 1:1 ($N = 2$, $z_1 = 1$, $z_2 = -1$) en agua a 25 °C como disolvente: $\kappa^{-1} = 0.308 c^{-1/2}$ nm, si c es la concentración molar de electrolito; $n_1 = n_2 = 10^3 N_A c$ para un electrolito 1:1.

2. Una interfase plana, en un electrolito simétrico z -valente ($z_1 = -z_2 = z$) para un potencial arbitrario ψ_d :

$$y(x) = 2 \ln \left[\frac{1 + e^{-\kappa x} \tanh(y_d / 4)}{1 - e^{-\kappa x} \tanh(y_d / 4)} \right] \quad (21)$$

donde y es el potencial adimensional:

$$y = \frac{ze\psi}{k_B T} \quad (22)$$

y puede darse una expresión similar para y_d .

3. Una interfase esférica (radio a) a potenciales bajos (aproximación de Debye):

$$\psi(r) = \psi_d \left(\frac{a}{r} \right) e^{-\kappa(r-a)} \quad (23)$$

mientras que deben aplicarse soluciones numéricas o expresiones analíticas aproximadas en otros casos. Esto se ilustra en la Fig. 22, donde se comparan

las Ecs. 19 y 21 para la interfase plana; y en la Fig. 23, donde la solución aproximada (Ec. 21), se representa junto a resultados numéricos (121).

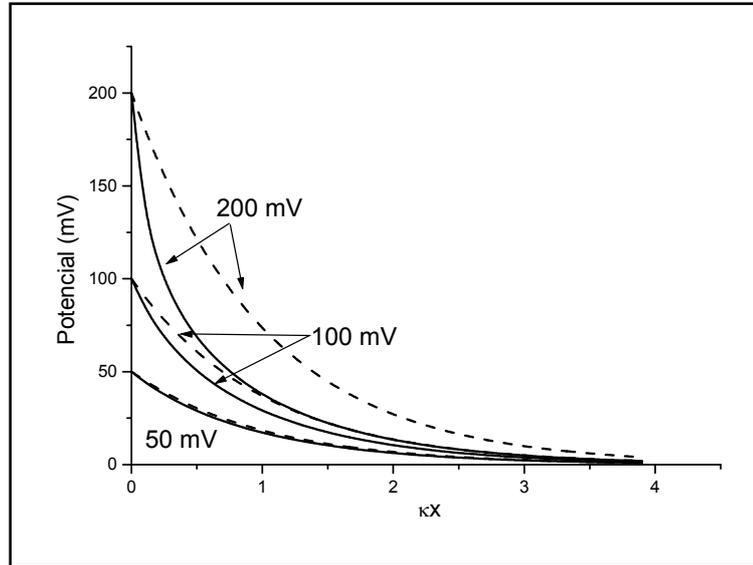


Fig. 22: Distribución del potencial en una interfase plana, calculado mediante la fórmula aproximada de Debye-Hückel [Ec. 19, (---)] y el cálculo completo [Ec. 21, (-)], para los valores de ψ_d indicados. Electrolitos monovalentes.

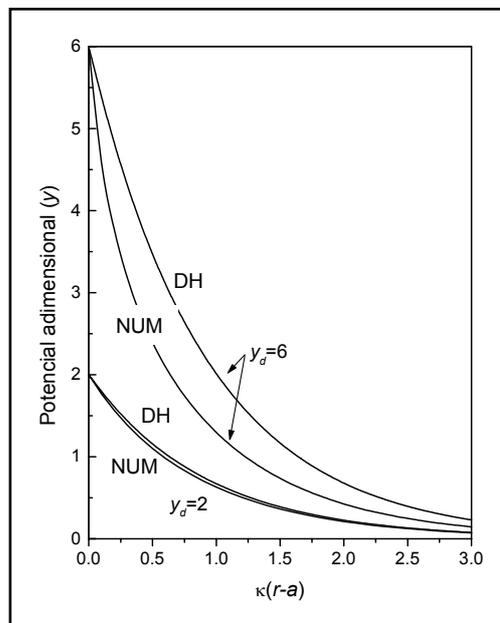


Fig. 23: Potencial adimensional en torno a una partícula esférica en función de la distancia reducida a la superficie, para electrolitos monovalentes. *DH*: aproximación de Debye-Hückel; *NUM*: cálculo totalmente numérico (121).

3.3. FENÓMENOS ELECTROKINÉTICOS.

POTENCIAL ZETA.

Supongamos que se aplica un campo eléctrico paralelamente a la interfase sólido/disolución de la Fig. 21, y que la superficie sólida está fija en nuestro sistema de coordenadas. De lo expuesto anteriormente, debe haber quedado claro que el líquido adyacente al sólido tiene una carga eléctrica neta, opuesta a la de la superficie. Parte de los iones de este líquido probablemente estarán unidos fuertemente a la superficie mediante fuerzas atractivas de corto alcance y pueden considerarse inmóviles (esto es una aproximación; tales iones pueden ser móviles y, en tal caso, no es raro que su movilidad tenga un valor próximo al del núcleo de la disolución); lo mismo se admitirá con respecto al líquido en esta región. Sin embargo, los iones y el líquido externo podrán ser desplazados por el campo externo: de hecho la fuerza eléctrica actuará sobre los iones (principalmente, contraiones) y arrastrará líquido en su movimiento. Se producirá un movimiento relativo entre el sólido y el líquido: este es el fundamento del fenómeno electrocinético.

El potencial existente en el límite entre las fases móvil e inmóvil es conocido como *potencial electrocinético* o *potencial zeta* (ζ). La localización exacta (distancia β_ζ en la Fig. 21) del también llamado *plano de cizalladura* o *plano de deslizamiento* es un tema de investigación y, de hecho, incluso la existencia de este plano y del mismo potencial zeta son estrictamente una abstracción (122), ya que se basan en la aceptación de que la viscosidad del medio líquido varía discontinuamente desde infinito en la capa de Stern, a un valor finito en la atmósfera difusa. Una posible forma de salvar, al menos formalmente, esta incertidumbre es suponer una variación gradual de la

viscosidad η desde la superficie hasta el inicio de la parte difusa (120, 122), pero la verificación experimental cuantitativa de tal variación no es accesible. Como todos los tratamientos del fenómeno electrocinético se basan en la existencia del potencial zeta, admitiremos el modelo de la variación de la viscosidad como razonablemente aceptable. Esto significa que las técnicas electrocinéticas nos darán información sobre el potencial zeta, donde quiera que este localizado. Tratar de extraer más información es peligroso y muy dependiente del modelo de doble capa elegido (120).

Los avances recientes de la teoría de los fenómenos electrocinéticos (123-128) nos han permitido relacionar los efectos electrocinéticos observados no sólo con el potencial zeta, sino también con otros parámetros de la doble capa y con la existencia de una capa de Stern con iones capaces de moverse bajo la acción de campos externos. Este número creciente de parámetros a determinar requiere para su estimación una investigación experimental bien planificada y, a menudo, experimentos utilizando diferentes técnicas electrocinéticas.

3.3.1. Electroforesis: teoría elemental.

Los diferentes fenómenos electrocinéticos pueden distinguirse mediante las fases móvil-inmóvil, la naturaleza del campo aplicado y la magnitud que debe ser determinada experimentalmente. Comentaremos brevemente la técnica de la electroforesis, por ser la que hemos empleado en nuestra investigación.

Sea una partícula esférica de radio a en presencia de un campo eléctrico que, lejos de la partícula, es \vec{E}_∞ . Se considera que la partícula no es conductora y tiene una permitividad eléctrica mucho menor que la del medio de dispersión. Por el momento, también aceptaremos que la concentración de

electrolito es muy baja y que a es también muy pequeño, por lo que se da la siguiente desigualdad entre el grosor de la doble capa (Ec. 20) y el radio:

$$\kappa^{-1} \gg a \quad \text{o} \quad \kappa a \ll 1 \quad (24)$$

es decir, estamos en la aproximación de la doble capa gruesa (o de Hückel). Debido a que la atmósfera de iones se extiende a lo largo de estas grandes distancias, la densidad de carga en su interior será muy pequeña y, por lo tanto, el campo aplicado no provocará casi ningún movimiento de líquido en torno a la partícula. Como resultado, las únicas fuerzas que actuarán sobre ésta son las fuerzas de arrastre de Stokes (\vec{F}_S) y la electrostática (\vec{F}_E). Como la partícula se mueve a velocidad constante (velocidad electroforética, \vec{v}_e), la fuerza neta debe ser nula:

$$\begin{aligned} \vec{F}_S &= -6\pi\eta a \vec{v}_e \\ \vec{F}_E &= Q\vec{E}_\infty \\ \vec{F}_S + \vec{F}_E &= 0 \end{aligned} \quad (25)$$

En estas ecuaciones, η es la viscosidad del medio de dispersión, y Q es la carga total superficial de la partícula. De la Ec. 25:

$$\vec{v}_e = \frac{Q}{6\pi\eta a} \vec{E}_\infty \quad (26)$$

Si recordamos que el potencial en la superficie (129), bajo la condición de la Ec. 24, es:

$$V(a) = \frac{1}{4\pi\epsilon_r\epsilon_0} \frac{Q}{a} \quad (27)$$

la identificación de $V(a)$ con el potencial zeta (ζ), da lugar a:

$$\bar{v}_e = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_{rs} \epsilon_0}{\eta} \zeta \bar{E}_\infty \quad (28)$$

o la movilidad electroforética (μ_e):

$$\mu_e = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_{rs} \epsilon_0}{\eta} \zeta \quad (29)$$

a la que se conoce como fórmula de Hückel.

Consideremos la situación opuesta, para la que también existe una solución analítica, correspondiente a la doble capa delgada:

$$\kappa^{-1} \ll a \quad \text{o} \quad \kappa a \gg 1 \quad (30)$$

En este caso, los iones de la doble capa apantallan la carga superficial en una distancia corta, lo que significa que, como hemos descrito antes, se pierde la electroneutralidad en esta región. El campo provocará, por lo tanto, movimientos del líquido cargado que afectarán al propio movimiento de la partícula: la solución en este caso es más complicada pero todavía posible.

Hasta el momento seguimos aceptando una partícula esférica con un potencial superficial constante (ζ); otra suposición importante es que la conductividad superficial de la doble capa eléctrica es lo suficientemente pequeña como para tener una influencia despreciable en la distribución del potencial inducido por el campo. El problema se resuelve mejor si se utiliza un sistema de referencia centrado en la esfera. Como en el laboratorio, el líquido no se mueve lejos de la partícula, la utilización de un sistema de coordenadas fijo a la partícula generará una velocidad del líquido igual a $-\bar{v}_e$ a grandes distancias.

La Fig. 24 es un esquema de la situación descrita. Admitiendo la situación de doble capa, la velocidad tangencial del líquido a una distancia r de la superficie de la partícula [lo suficientemente grande cuando se compara con el grosor de la doble capa, pero pequeña cuando se compara con el radio de la partícula ($a \gg r - a \gg \kappa^{-1}$)], puede estimarse si se conoce para una interfase plana, y además es mucho más sencillo que el problema general. De hecho, la distribución de la velocidad tangencial del líquido con respecto a una interfase sólida plana con un potencial igual a ζ , bajo la acción de un campo tangencial E_t (115, 117, 123) es:

$$v_t(x) = -\frac{\varepsilon_{rs}\varepsilon_0}{\eta} [\zeta - \psi(x)]E_t \quad (31)$$

donde $x = r - a$, y $\psi(x)$ es la distribución del potencial de la doble capa en equilibrio. La Ec. 31 describe la distribución x de la velocidad electroosmótica, y para distancias que exceden el grosor de la doble capa, cuando $\psi(x) \rightarrow 0$, la velocidad se denomina velocidad electroosmótica (\vec{v}_s):

$$\vec{v}_s = -\frac{\varepsilon_{rs}\varepsilon_0}{\eta} \zeta \vec{E}_t \quad (32)$$

Utilizando la Ec. 32 para cualquier porción casi plana de la doble capa de nuestra partícula esférica, podríamos escribir:

$$\vec{v}_s(\theta) = -\frac{\varepsilon_{rs}\varepsilon_0}{\eta} \zeta \vec{E}_t(\theta) \quad (33)$$

donde $\vec{v}_s(\theta)$ es la velocidad tangencial del líquido próximo a la superficie de la partícula, fuera de la doble capa plana y en una posición caracterizada por el ángulo θ con la dirección del campo, donde el campo tangencial es $\vec{E}_t(\theta)$.

Teniendo en cuenta que el potencial $\delta\psi(\vec{r})$ debido al campo externo en torno a la esfera viene dado por (129, 130):

$$\delta\psi(\vec{r}) = -E_{\infty}r \cos\theta - \frac{E_{\infty}a^3}{2r^2} \cos\theta \quad (34)$$

el campo tangencial será:

$$E_t(\theta) = -\frac{1}{r} \frac{\partial\delta\psi}{\partial\theta} \Big|_{r=a} = -\frac{3}{2} E_{\infty} \sin\theta \quad (35)$$

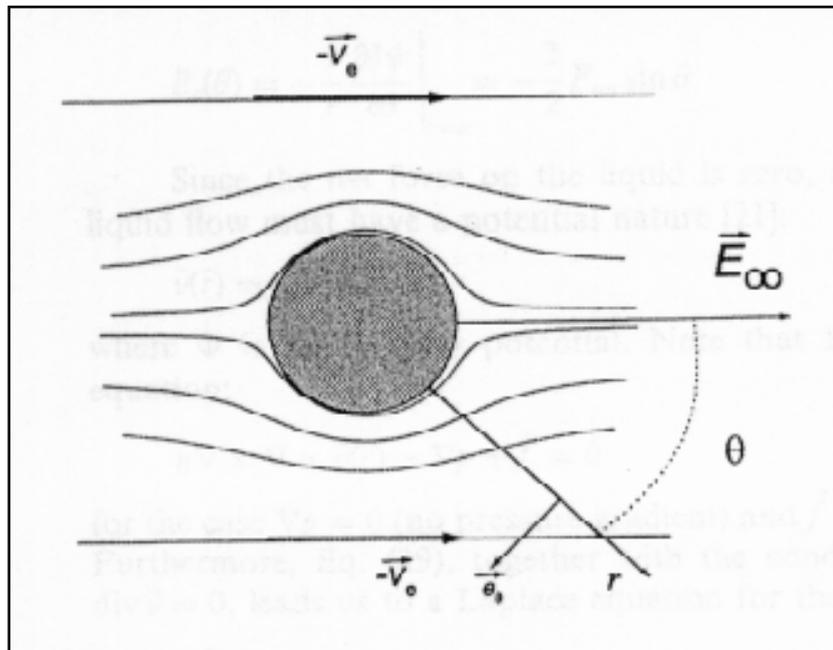


Fig. 24: Esquema del flujo de líquido en torno a una partícula esférica cargada negativamente. Lejos de la interfase, el líquido se mueve con una velocidad constante $-\vec{v}_e$.

Por otro lado, fuera de la doble capa, la fuerza eléctrica neta sobre el líquido es cero y, como no se aplica gradiente de presión, el flujo de líquido debe tener una naturaleza potencial (131):

$$\vec{v}(\vec{r}) = -\nabla\phi(\vec{r}) \quad (36)$$

donde ϕ es el potencial de velocidad. Como se trata de un fluido incompresible ($\nabla \cdot \vec{v} = 0$), el potencial de velocidad obedece la ecuación de Laplace:

$$\nabla^2 \phi = 0 \quad (37)$$

La velocidad normal del líquido (la componente radial de $\nabla \phi$) debe ser cero en la superficie de la partícula:

$$\nabla_r \phi \Big|_{r=a} = 0 \quad (38)$$

Las Ecs. 37 y 38 tienen versiones formalmente idénticas para el potencial eléctrico:

$$\begin{aligned} \nabla^2 \delta\psi &= 0 \\ \nabla_r \delta\psi \Big|_{r=a} &= 0 \end{aligned} \quad (39)$$

por lo tanto, el potencial de velocidad en el exterior de la doble capa debe tener una dependencia de la posición similar a la de $\delta\psi$ (Ec. 34):

$$\phi = -\vec{v}_\infty \cdot \vec{r} - \frac{1}{2} \frac{a^3}{r^3} \vec{v}_\infty \cdot \vec{r} \quad (40)$$

donde \vec{v}_∞ es la velocidad uniforme del líquido lejos de la partícula (al igual que \vec{E}_∞ era el campo externo uniforme). Utilizando las Ecs. 33, 35 y 40:

$$-\frac{1}{r} \frac{\partial \phi}{\partial \theta} \Big|_{r=a} = -\frac{3}{2} v_\infty \sin \theta = v_s = -\frac{\epsilon_{rs} \epsilon_0}{\eta} \zeta \left[-\frac{3}{2} E_\infty \sin \theta \right] \quad (41)$$

por lo tanto, la velocidad del líquido lejos de la partícula podrá ser:

$$\vec{v}_\infty = -\frac{\epsilon_{rs}\epsilon_0}{\eta}\zeta\vec{E}_\infty \quad (42)$$

La Ec. 42 es conocida como la ecuación de Smoluchowski para la electroósmosis.

Volviendo al laboratorio, la velocidad electroforética de la partícula será $\vec{v}_e = -\vec{v}_\infty$:

$$\vec{v}_e = \frac{\epsilon_r\epsilon_0}{\eta}\zeta\vec{E}_\infty \quad (43a)$$

y, de aquí, se obtiene la fórmula de Smoluchowski para la movilidad electroforética:

$$\mu_e = \frac{\epsilon_r\epsilon_0}{\eta}\zeta \quad (43b)$$

A partir de toda esta deducción, estará claro que la Ec. 43b es válida para cualquier geometría a condición de que (132, 133):

1. La partícula dispersa adquiera carga superficial, que se compensa mediante un exceso de carga de signo opuesto en el medio.
 2. La partícula sea rígida y de forma arbitraria, con potencial eléctrico superficial uniforme (ζ) con respecto al líquido lejos de la interfase.
-

3. Las dimensiones de la partícula sean tales que el radio de curvatura de la interfase en cualquier posición sea mucho mayor que el grosor de la doble capa.
4. La partícula no sea conductora.
5. Los efectos de la conductancia superficial sean despreciables.
6. La constante dieléctrica y la viscosidad del medio sean independientes de la posición (ver, sin embargo, las Refs. 133-136).
7. El campo aplicado, a pesar de estar deformado por la presencia de la partícula, se suma vectorialmente al campo local en equilibrio de la doble capa.

3.3.2. Electroforesis: tratamientos más elaborados.

Henry (137) fue el primer autor que eliminó la restricción 3 anterior, y resolvió el problema para esferas (también para cilindros infinitos) de cualquier radio a , es decir, cualquier valor κa , aunque para pequeños potenciales zeta, ya que se acepta que la Ec. 23 determina la distribución de potencial en la doble capa en equilibrio. Restringiéndonos al caso de la esfera, la ecuación de Henry para partículas no conductoras es:

$$\mu_e = \frac{2}{3} \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \zeta f(\kappa a) \quad (44)$$

donde:

$$f(\kappa a) = 1 + \frac{(\kappa a)^2}{16} - 5 \frac{(\kappa a)^3}{48} + \dots \quad (45)$$

Una fórmula aproximada para $f(\kappa a)$ ha sido publicada por Ohshima (130).

Una contribución crucial para entender y evaluar la movilidad electroforética y, en general, la física del fenómeno electrocinético se debió a Overbeek (133, 138); Booth (139-141) también elaboró una teoría que siguió líneas similares, para esferas en ambos casos. Estos autores, fueron los primeros en considerar que durante la migración electroforética la doble capa pierde su simetría original, y se polariza: la distribución del potencial fuera del equilibrio no es la simple adición del creado por el campo externo en torno a la esfera no conductora y el de la doble capa eléctrica en equilibrio (142). El problema matemático es mucho más complejo, y hasta la aparición de los ordenadores sólo estaban disponibles teorías aproximadas (bajo ζ , gran κa : ver Refs.: 133, 138-141). Los primeros tratamientos (numéricos) del problema, válidos para valores arbitrarios del radio, el potencial zeta, o las concentraciones iónicas, fueron elaborados por Wiersema y cols. (143) y O'Brien y White (144).

Como no es relevante describir estos tratamientos, simplemente mostraremos algunos resultados en la Fig. 25. La validez de la fórmula de Smoluchowski para valores elevados κa y potenciales zeta de bajos a moderados es claramente apreciable; también es evidente que el tratamiento de Henry es válido para ζ bajo, independientemente del grosor de la doble capa.

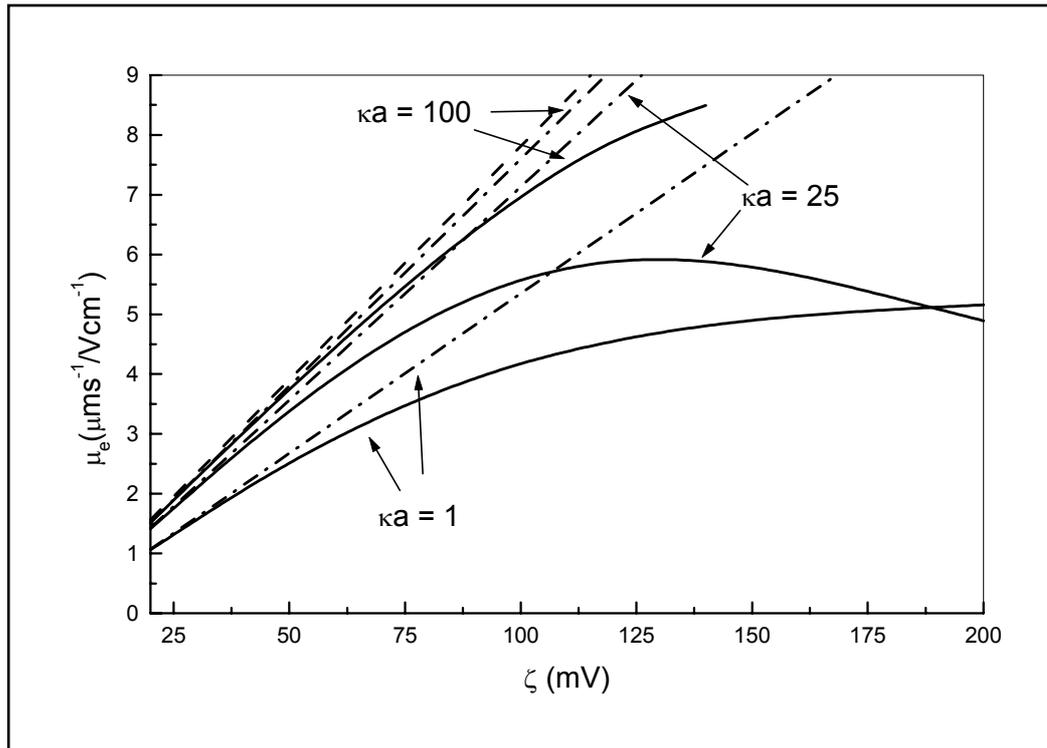


Fig. 25: Movilidad electroforética vs. potencial zeta para partículas esféricas de radio $a = 100$ nm y para $\kappa a = 1, 25$ y 100 en disoluciones de KCl. Línea discontinua (---): ecuación de Smoluchowski; líneas discontinuas-punteadas (-·-): fórmula de Henry (137); líneas continuas (-): teoría de O'Brien y White (144).

3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

La determinación de las movilidades electroforéticas de las distintas suspensiones se llevó a cabo utilizando un dispositivo Malvern Zetasizer 2000 (Malvern Instruments, Inglaterra), basado en el análisis de la

autocorrelación de la luz láser dispersada por las partículas en movimiento. Este aparato permite determinar μ_e con errores del 5 % o menores, y la temperatura es mantenida constante (hasta ± 0.2 °C) utilizando un módulo Peltier.

Las suspensiones estudiadas tenían una concentración de partículas aproximada del 0.1 %. Antes de preparar la suspensión se fijaba la concentración de electrolito deseada y se ajustaba, en su caso, el pH con HNO₃ o KOH. Debido a la laboriosidad del ajuste de ciertos pH, la preparación de las suspensiones se realizó cuando estos eran estables, ya que las diferentes partículas habrían estado demasiado tiempo en disolución antes de medir, con el consiguiente riesgo (fenómenos de oxidación y de degradación, principalmente) para la estabilidad de sus propiedades eléctricas superficiales, como posteriormente comentaremos. Las medidas se realizaban a 25 °C, 24 horas después (excepto en los estudios de estabilidad), comprobando y reajustando, si procedía, previamente el pH. Los datos presentados son el promedio de 15 determinaciones, cambiando la muestra cada tres.

3.5. EFECTO DEL pH Y DE LA FUERZA IÓNICA SOBRE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA.

Debido a que las propiedades de los óxidos son extremadamente sensibles a las variaciones del pH, y esto no es esperable en el caso del polímero debido a la naturaleza de los grupos responsables de su carga (grupos de ácido acrílico libres), primero centraremos nuestro estudio en el efecto del pH sobre la movilidad electroforética (μ_e) y el potencial zeta (ζ) de las partículas.

La Fig. 26 muestra ambos parámetros en función del pH en presencia de KNO_3 10^{-3} M, para las partículas con una relación monómero/magnetita 4:3. La teoría de O'Brien y White (144) se utilizó para convertir los valores de μ_e a potencial ζ . Como puede observarse, las partículas de magnetita presentan un punto isoeléctrico o pH de potencial zeta zero bien definido en las proximidades del $\text{pH} = 7$. Este resultado concuerda con las determinaciones previas de otros autores (145), pero no se observa en las partículas de polímero, que presentan una carga superficial neta negativa en todo el intervalo de pH estudiado (de 4 a 9). Sólo a pH inferiores a 4 los datos sugieren la presencia del pH de potencial zeta cero. Esto es debido al menor grado de disociación de los grupos acrílicos libres a este pH (146). Estas grandes diferencias entre el comportamiento electrocinético de los núcleos y el polímero convierten a la electroforesis en una herramienta muy útil para comprobar cualitativamente la eficacia del recubrimiento. De hecho, la Fig. 26 muestra claramente que las partículas compuestas presentan un comportamiento casi idéntico a las de polímero puro. El recubrimiento polimérico oculta muy eficazmente el núcleo magnético, haciendo que la superficie de las partículas compuestas sea indistinguible de la de las partículas de polímero (96).

Para confirmar los resultados descritos, realizamos la determinación de la movilidad en función de la concentración de KNO_3 a $\text{pH} = 5$, siguiendo la misma metodología. Los resultados de este análisis se representan en la Fig. 27, y de nuevo la similitud entre la electrocinética del polímero y de las partículas compuestas, y las diferencias respecto a la magnetita se observan claramente (96).

También empleamos la determinación electroforética, siguiendo la misma rutina, para comprobar de forma independiente las características del recubrimiento cuando cambia la cantidad inicial de monómero en el medio de polimerización. La Fig. 28 muestra los resultados obtenidos: es clara la evolución de la movilidad electroforética de las partículas compuestas hacia

la de las partículas poliméricas, al aumentar la proporción del peso de monómero, principalmente en relaciones por encima de 1:1. Estos resultados justifican la selección de las partículas con proporción de monómero y magnetita 4:3 para la realización de nuestros experimentos, ya que se puede considerar que el recubrimiento es óptimo y, además, el número de núcleos magnéticos recubiertos es elevado (96).

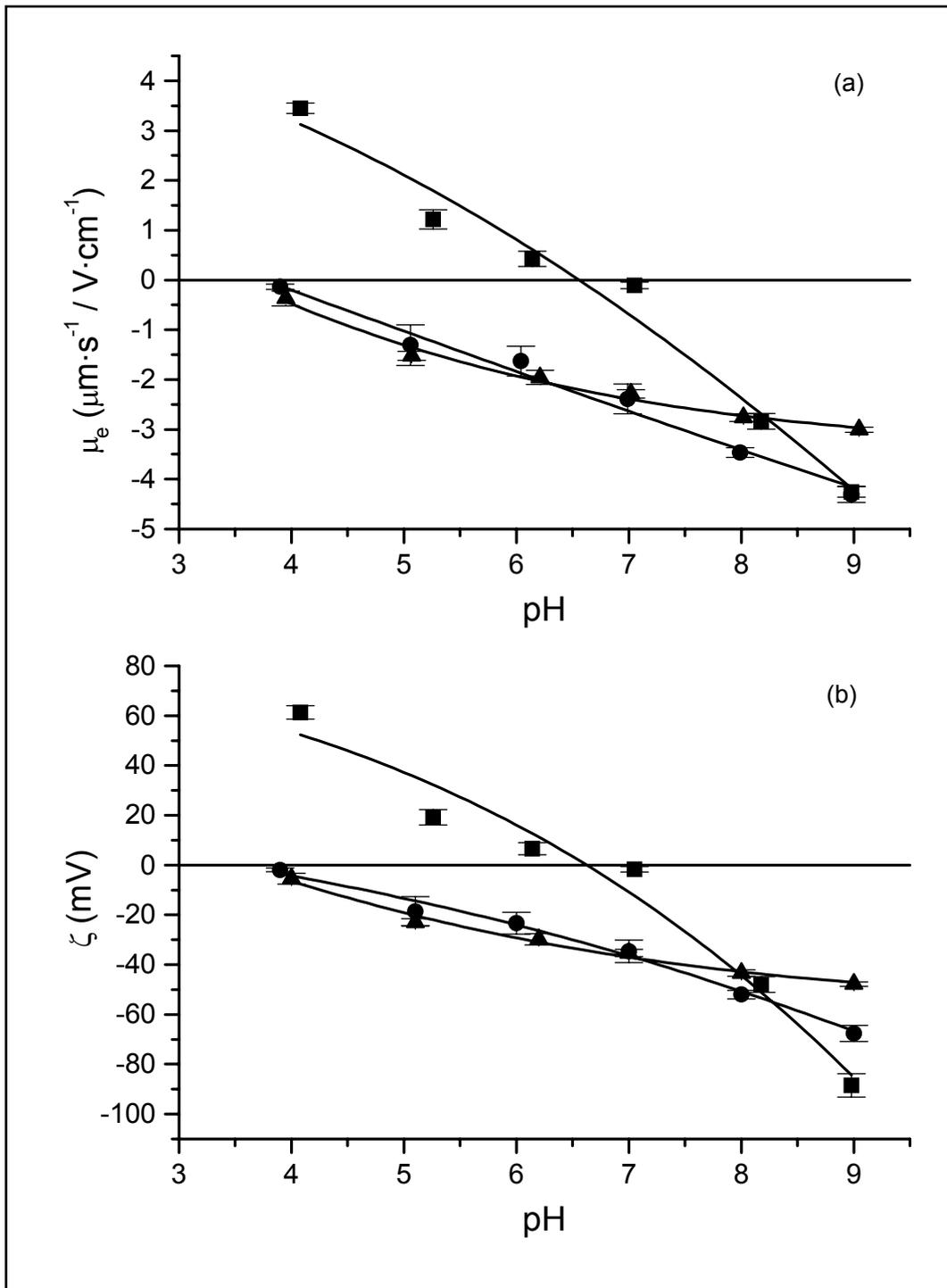


Fig. 26: Movilidad electroforética (a) y potencial zeta (b) de magnetita (■), poli(etil-2-cianoacrilato) (●) y partículas compuestas (▲) en función del pH, en presencia de KNO_3 10^{-3} M.

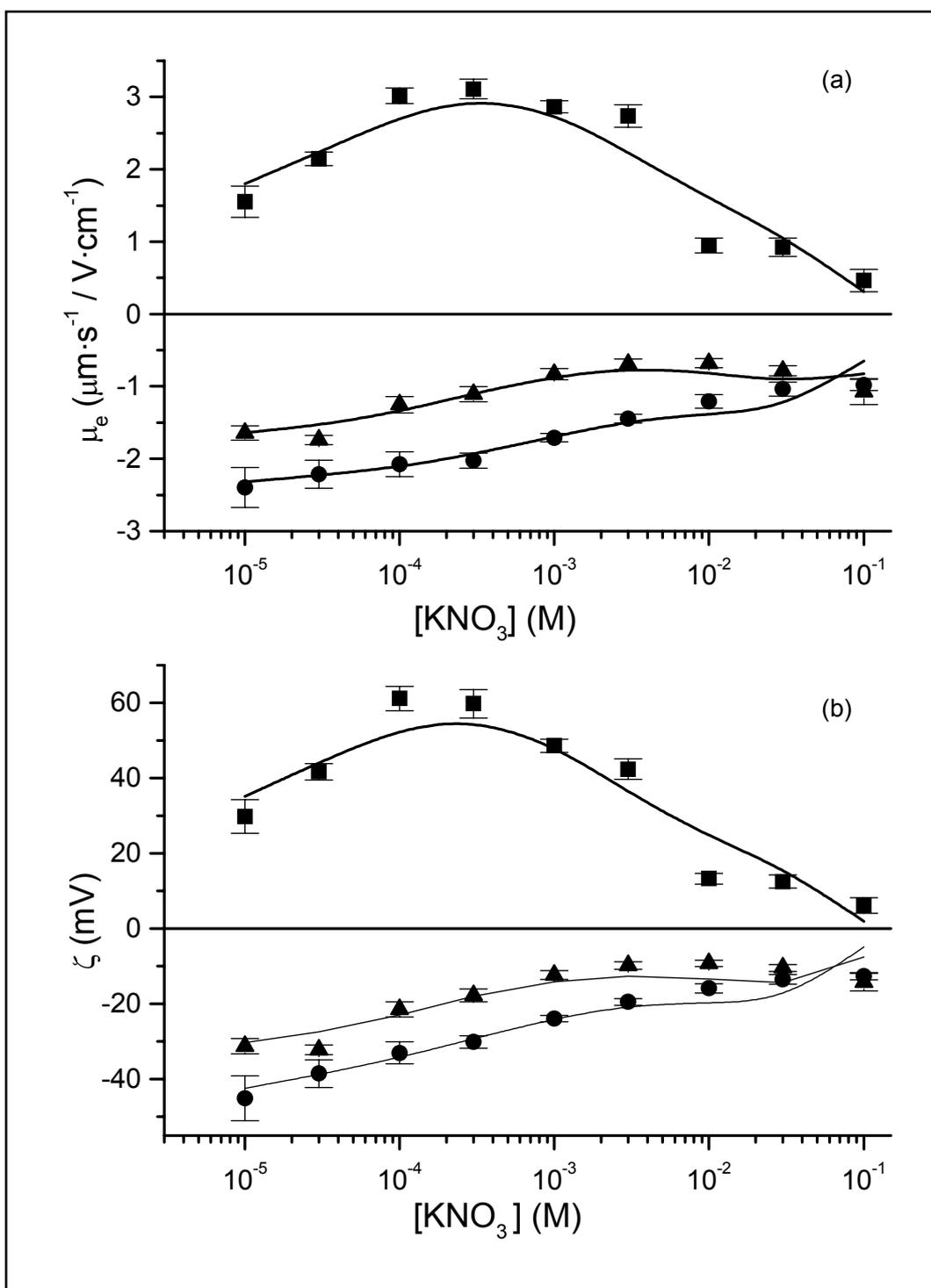


Fig. 27: Movilidad electroforética (a) y potencial zeta (b) de magnetita (■), poli(etil-2-cianoacrilato) (●) y partículas compuestas (▲) en función de la concentración de KNO₃, a pH = 5.

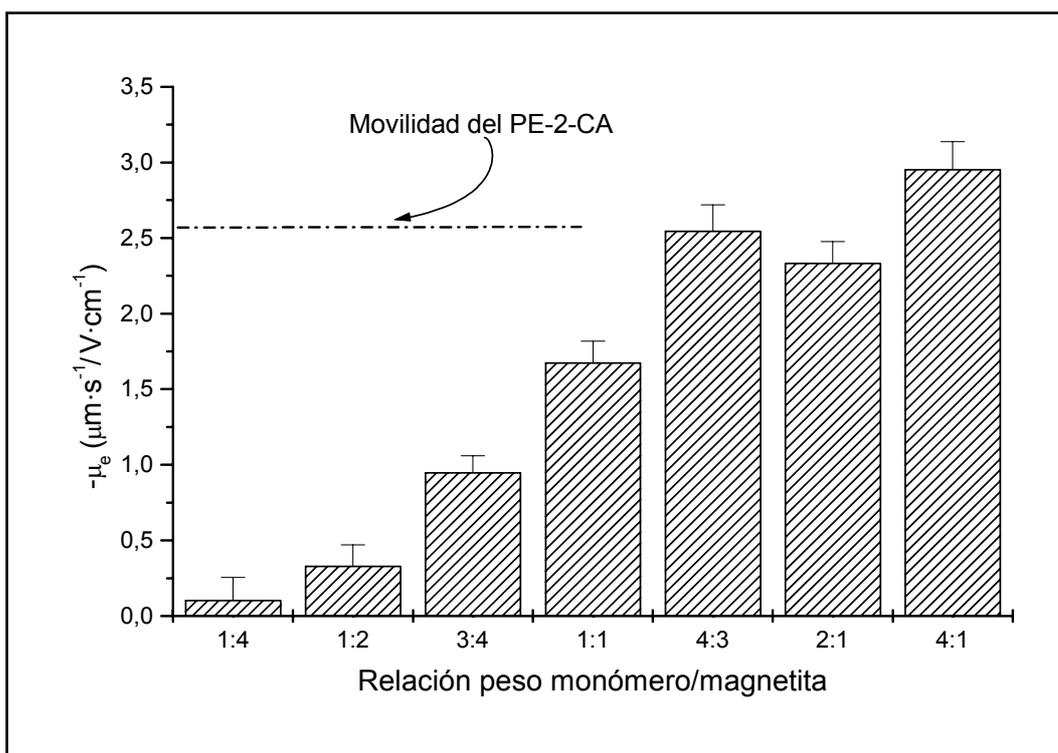


Fig. 28: Histograma de las movilidades electroforéticas de las partículas compuestas, para diferentes pesos relativos de monómero y magnetita en la suspensión inicial.

3.6. ESTABILIDAD DE LAS PROPIEDADES ELÉCTRICAS SUPERFICIALES.

3.6.1. Estabilidad del recubrimiento polimérico.

La electroforesis parecía también útil como método para comprobar la velocidad a la que el polímero se degrada (liberando formaldehído, porciones ácidas y etanol) y deja zonas cada vez mayores de magnetita expuesta a la disolución. Se ha demostrado que la degradación del polímero en agua (73), como trataremos más adelante, es debida a un ataque inicial de los iones hidroxilo, dando lugar a la reacción reversible de Knövenagel, con la formación de formaldehído (hidrólisis de las uniones carbón-carbón); y a una

reacción de hidrólisis tipo ester con la formación de porciones ácidas (ácido policianoacrílico, principalmente), responsables de la acidificación del medio. Como se muestra en la Fig. 29, este es un proceso lento al pH de estos experimentos ($\text{pH} = 5$) ya que son necesarias unas 200 horas para que las movilidades de las partículas compuestas se aproximen a las de la magnetita en agua. Por otro lado, la degradación del recubrimiento polimérico provoca a partir del segundo día un marcado descenso del pH del medio, desde 5 hasta 4.4, como consecuencia de la generación de fragmentos ácidos. Es interesante destacar cómo la electrocinética hace intuir la velocidad de degradación, un aspecto fundamental cuando se analiza el mecanismo por el cual el fármaco transportado por las partículas es liberado en el lugar deseado (96).

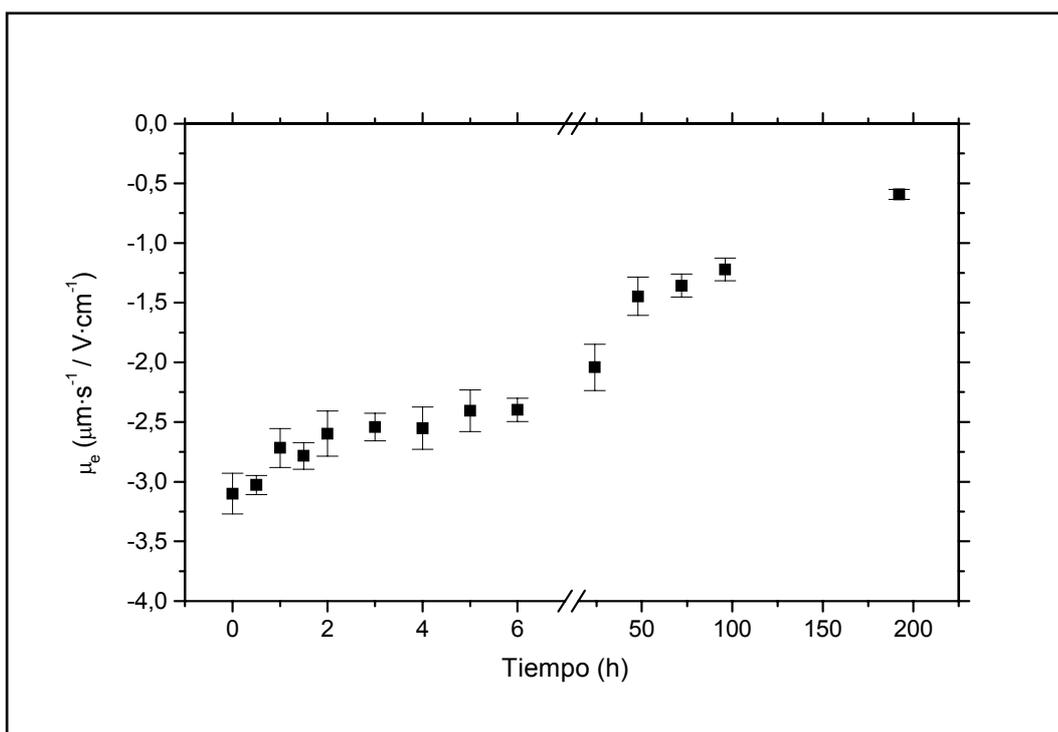


Fig. 29: Evolución en el tiempo de la movilidad electroforética de las partículas compuestas en agua.

3.6.2. Magnetita.

Por otro lado, también hemos analizado el efecto del envejecimiento superficial sobre las propiedades electrocinéticas de la magnetita. Debido a la elevada superficie específica de estas partículas, el contacto entre la superficie y el medio de dispersión acuoso involucra una superficie muy elevada y, por lo tanto, la interfase es muy reactiva, principalmente mediante oxidación, pero también mediante la formación de complejos con los iones en disolución, lo cual de hecho puede alterar significativamente la densidad superficial de carga (117, 147). En nuestro sistema coloidal nos centraremos en el proceso de oxidación, que puede transformar la superficie de un material en otro diferente tras el envejecimiento. Como consecuencia, la reproducibilidad de las medidas electrocinéticas y su interpretación puede ser dudosa, a menos que se tomen las precauciones apropiadas.

Debido a su similitud estructural, la magnetita y la maghemita (γ - Fe_2O_3) son fácilmente ínter convertibles. Ambos son compuestos basados en redes fcc (cúbicas centradas en las caras) de átomos de oxígeno: en la magnetita, los iones Fe^{2+} ocupan huecos octaédricos, mientras que los iones Fe^{3+} están distribuidos entre los huecos octaédricos y los tetraédricos. La oxidación de la magnetita puede dar lugar a maghemita en la que todos los cationes son Fe^{3+} y ocupan espacios tetraédricos y octaédricos de una manera aleatoria (148). De hecho, la maghemita es químicamente más estable que la magnetita, y esta última se transforma fácilmente en la anterior (149, 150).

Hemos realizado una investigación electrocinética de este proceso de envejecimiento. Para ello analizamos los efectos de la fuerza iónica y del pH sobre la movilidad electroforética de la magnetita sintética, con especial énfasis en la evolución con el tiempo de las propiedades de la interfase. Las técnicas electrocinéticas son muy sensibles a la contaminación superficial progresiva mediante oxidación. Como la maghemita es la forma más estable, los resultados se compararán con los obtenidos para la maghemita comercial

(Maghemita, pureza > 99 %, Sigma-Aldrich Química, S. A., España). La electroforesis puede detectar la presencia de incluso pequeñas impurezas superficiales que pueden hacer imposible obtener información sobre las propiedades superficiales primitivas de los óxidos de hierro de (normalmente) máxima pureza comercial.

Las propiedades electrocinéticas, en función del pH y de la fuerza iónica, se determinaron siguiendo la misma metodología descrita anteriormente. En la Fig. 30 se representa la evolución temporal de las determinaciones de la movilidad electroforética en función del pH, siempre en KNO_3 10^{-3} M, a lo largo de diversos días tras la preparación de las suspensiones. Es destacable cómo el punto isoeléctrico cambia desde $\text{pH} \approx 6.5$ a $\text{pH} \approx 5.5$ en sólo 7 días. Esta curva continúa cambiando en pos de valores más negativos durante más de tres semanas. Estos efectos de envejecimiento son menos importantes por encima del punto isoeléctrico, y podemos decir que se obtiene un valor muy reproducible de μ_e cuando el pH se fija a un valor por encima de 7, para cualquier tiempo desde el que la suspensión fue almacenada. La magnetita sintética a pH básico parece ser un buen material de referencia para la electroforesis (151).

En la Fig. 30 hemos incluido la curva de μ_e frente a pH de la maghemita comercial: la curva es bastante similar a la de la magnetita entre los días 7 y 14. Esta es una confirmación cualitativa del proceso químico de oxidación característico de la magnetita: como ya se ha mencionado (148, 152) la etapa final de la oxidación de magnetita es la maghemita. Esto quiere decir que la evolución de la movilidad observada en la Fig. 30 debe ser el resultado de la transformación de magnetita en maghemita debida a la oxidación. De acuerdo con las Refs. 152 y 153, el punto isoeléctrico de un óxido metálico decrece con la carga del catión. Como en la magnetita coexisten el Fe^{2+} y el Fe^{3+} , mientras que en la maghemita sólo existe Fe^{3+} en

la estructura cristalina, se espera un descenso del punto isoeléctrico tras la oxidación, lo que puede explicar nuestros resultados.

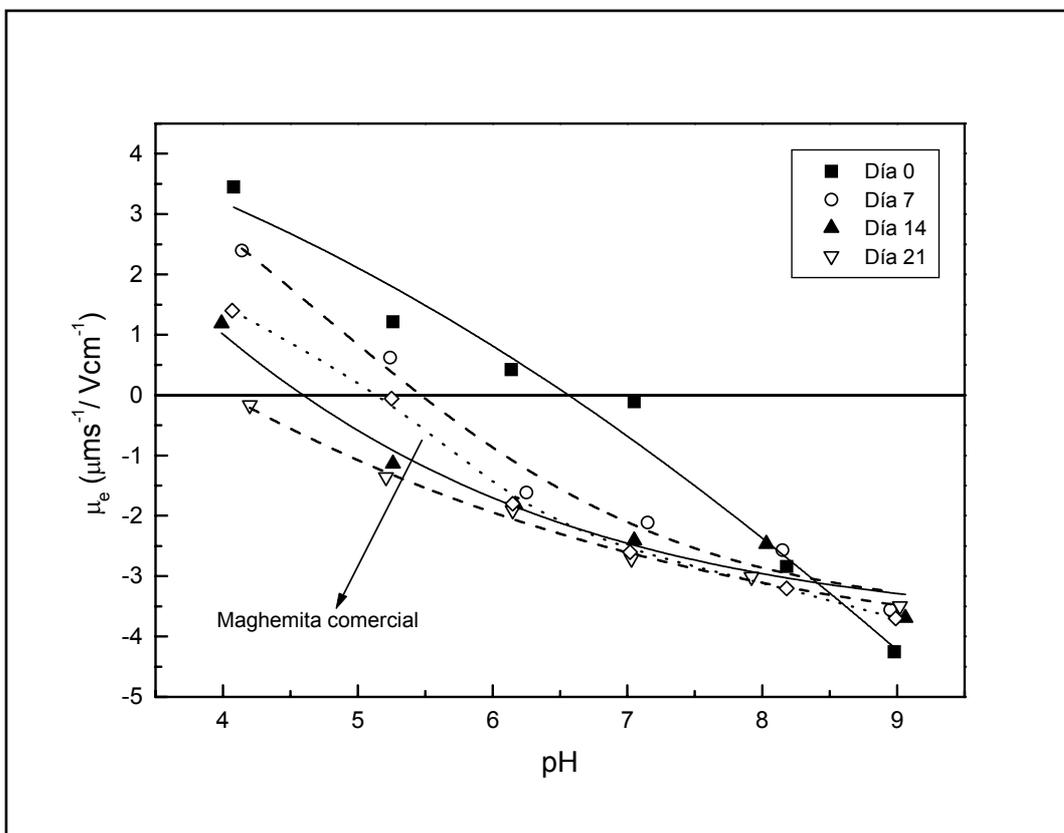


Fig. 30: Evolución con el tiempo de la μ_e de la magnetita en función del pH, en presencia de KNO_3 10^{-3} M.

En la Fig. 31 representamos la curva de μ_e frente a la concentración iónica de KNO_3 , y se confirma la tendencia de μ_e a disminuir con el transcurso del tiempo desde la preparación de las suspensiones, que ya se observó con el pH, es decir, se confirma la existencia de un envejecimiento de las suspensiones. A bajas concentraciones de KNO_3 , este efecto es muy claro ya que μ_e se hace cada vez más negativa. Sin embargo, a altas concentraciones ($> 10^{-2}$ M), la gran cantidad de iones adsorbidos en la superficie de la magnetita parecen retardar este proceso.

Por lo tanto, podemos decir que la magnetita es intrínsecamente inestable en agua, desde el punto de vista de sus propiedades eléctricas superficiales, por lo que el potencial zeta y la movilidad electroforética deben aportar información siempre sobre las características de envejecimiento del material (además de la fuente, método de preparación, etc.) (151).

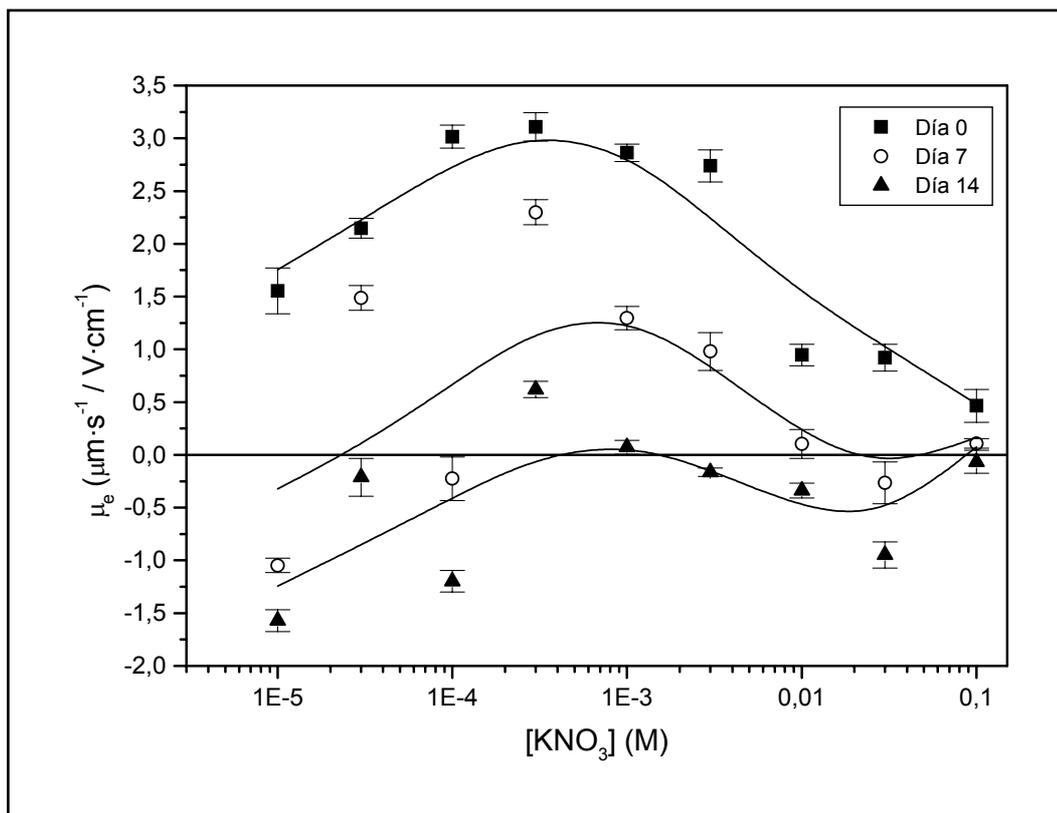


Fig. 31: Evolución con el tiempo de la μ_e de la magnetita en función de la fuerza iónica, a pH = 5.

Capítulo 4.
TERMODINÁMICA SUPERFICIAL

4.1. INTRODUCCIÓN.

En este capítulo pretendemos la identificación y cuantificación de las interacciones en la interfase partícula/medio acuoso, usando una teoría termodinámica de la tensión superficial o energía libre de los sólidos. Con este fin usaremos un modelo termodinámico que incluye las interacciones de van der Waals y ácido-base entre las partículas, o entre ellas y el medio de dispersión. El modelo permite caracterizar el sólido mediante tres componentes de su energía libre superficial: γ_s^{LW} (Lifshitz-van der Waals, representativa de las interacciones no polares o dispersivas de la interfase), γ_s^+ (aceptor de electrones o ácido de Lewis) y γ_s^- (donante de electrones o base de Lewis). Estas dos últimas contribuciones (polares) contienen información sobre interacciones de corto alcance, a las que se suele llamar fuerzas de solvatación, estructurales o, en caso de medio acuoso, fuerzas de hidratación.

Se estimará así la importancia de las contribuciones no electrostáticas al balance total de la energía de interacción entre las partículas de los sistemas analizados. Para llevar a cabo esta estimación, se utilizarán datos experimentales de los ángulos de contacto formados por líquidos seleccionados con nuestros tres tipos de sistemas (núcleo magnético, recubrimiento polimérico y partícula compuesta).

Se prestará en este capítulo especial atención al análisis comparativo de la energía libre superficial de los diferentes tipos de materiales puros: partículas compuestas, magnetita (núcleo) y poli(etil-2-cianoacrilato) (recubrimiento). Finalmente, se realizará una estimación del mecanismo de formación del recubrimiento polimérico en los núcleos magnéticos.

4.2. INTERACCIONES SUPERFICIALES.

La principal interacción interfacial a tener en cuenta entre partículas coloidales cargadas, inmersas en un medio acuoso, es la interacción electrostática (*EL*), que nos da idea del alcance e intensidad de la repulsión eléctrica. Pero, además, existen otras interacciones entre las moléculas que constituyen las distintas fases en disolución y que pueden adquirir valores significativos. De entre ellas vamos a considerar, como más significativas, dos:

- Las interacciones dispersivas, denominadas así debido a su relación con fenómenos de dispersión de luz en el visible y ultravioleta. Son también conocidas como interacciones electrodinámicas o Lifshitz-van der Waals (*LW*) y estarán siempre presentes, al igual que sucede con la interacción gravitatoria. El modelo clásico DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) las considera, junto con la interacción electrostática, responsables de la energía total de interacción entre partículas.
- Otras interacciones no dispersivas (fuerzas de solvatación, estructurales y de hidratación) denominadas en general, interacciones no-DLVO: electrón-donante/electrón-aceptor, o ácido-base de Lewis (*AB*). El modelo teórico que nos permitirá analizarlas es el desarrollado por van Oss y cols. (154).

4.2.1. Interacciones dispersivas.

Van der Waals fue el primer autor que sugirió que en los líquidos y gases no ideales, existe entre átomos y moléculas una interacción de naturaleza diferente de la electrostática, a la que posteriormente se denominó interacción de van der Waals. Más adelante, numerosos investigadores analizaron la naturaleza de esta forma de interacción: Keesom (155), Debye (156) y London (157). Según estos

autores, cuando dos átomos o moléculas se encuentran en el vacío, se pueden considerar tres contribuciones diferentes a la interacción de van der Waals:

- a) Interacciones entre dipolos permanentes o fuerzas de orientación, descritas por Keesom. La energía es proporcional a la cuarta potencia del momento dipolar (μ):

$$V_{Keesom} = -\frac{\mu^4}{k_B T l^6} \quad (46)$$

siendo k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y l la distancia interatómica (158).

- b) Interacciones entre dipolos permanentes y dipolos inducidos en otros átomos o moléculas (fuerzas de inducción de Debye). La energía de Debye es proporcional a la polarizabilidad (α) y al cuadrado del momento dipolar (μ):

$$V_{Debye} = -\frac{\alpha \mu^2}{l^6} \quad (47)$$

- c) Interacciones producidas entre dipolos instantáneos originados por fluctuaciones de carga eléctrica y dipolos inducidos (fuerzas de dispersión de London). La energía de London es proporcional a la energía característica ($h\nu$) y al cuadrado de la polarizabilidad (α):

$$V_{London} = -\frac{3}{4} \frac{\alpha^2 h\nu}{l^6} \quad (48)$$

Como vemos, el conjunto de estas fuerzas dispersivas entre átomos o pequeñas moléculas disminuye muy rápidamente con la distancia entre partículas (l), dada su dependencia con l^{-6} en el vacío.

Las interacciones de London son universales y aparecen entre cualquier par de átomos o moléculas en fase condensada, siendo en este caso su contribución muy superior (159) a las de Keesom y Debye, que requieren que haya dipolos permanentes (160, 161). En efecto, Chaudhury (162) demostró que, macroscópicamente, las interacciones en fase condensada son principalmente de dispersión (London-van der Waals), siendo la contribución neta de las otras dos formas del orden del 2-3 % del total de la energía de interacción dispersiva. En todo caso, se ha demostrado, usando el planteamiento de Lifshitz (163), que para sistemas macroscópicos, las interacciones van der Waals-Keesom y van der Waals-Debye se pueden tratar de igual forma que las interacciones van der Waals-London (161). Por eso, todas ellas se pueden agrupar dentro del conjunto de interacciones electrodinámicas, denominadas genéricamente interacciones Lifshitz-van der Waals (*LW*).

Debe recordarse que aunque las interacciones dispersivas son débiles en comparación con las electrostáticas responsables del alcance iónico o del covalente, se ha podido comprobar que afectan de forma considerable a un variado conjunto de fenómenos relacionados con los sistemas de partículas coloidales, tales como adhesión, adsorción, agregación de partículas en suspensión o estructura de macromoléculas condensadas, como polímeros o proteínas (164). Resumiendo, las características esenciales de estas interacciones son:

1. Pueden ser efectivas entre 0.2 y 10 nm de distancia.
 2. Pueden ser tanto atractivas como repulsivas: en general son atractivas, pero (como ya indicó Hamaker) para partículas de materiales diferentes inmersas en un líquido, pueden ser repulsivas.
 3. Son fuerzas no aditivas, pues la interacción dispersiva entre dos sistemas físicos se ve afectada por la presencia de otros cercanos.
-

Matemáticamente, es posible obtener mediante un término global, la contribución a la tensión superficial de todas las interacciones de tipo dispersivo. Se realiza mediante la teoría de Lifshitz de la atracción entre sistemas macroscópicos (165, 166) y se denomina componente LW o Lifshitz-van der Waals (γ^{LW}) a la componente de la tensión superficial o energía libre superficial asociada a estas interacciones.

4.2.2. Interacciones no-DLVO.

Hay una serie de fenómenos, relacionados con la estabilidad coloidal, que no se pueden explicar sólo mediante la interacción electrostática entre dobles capas eléctricas y las fuerzas de van der Waals. Así, por ejemplo, el hinchamiento espontáneo de arcillas secas cuando están en contacto con agua (167). Tampoco se explica por qué las dispersiones de sílice no coagulan en el punto isoeléctrico en el seno de disoluciones salinas concentradas (168). En nuestro grupo de investigación se han encontrado comportamientos similares en suspensiones ZnS (169) o de látex de etilcelulosa (170), y en general aparecen en la bibliografía numerosas observaciones de esta naturaleza en los últimos años (171, 172).

Por eso, ha sido necesario introducir las denominadas fuerzas no-DLVO (cuyo alcance es del orden de pocos nanómetros), entre las que se incluyen la repulsión “hidrófila”, la atracción “hidrófoba”, los enlaces de hidrógeno, los enlaces π , o la presión osmótica en suspensiones muy concentradas de polímeros. De todo este conjunto de fuerzas, las más conocidas son las que tienen su origen en la solvatación de las superficies (por lo que se denominan “estructurales”), pudiendo ser atractivas (efecto “hidrófobo”), repulsivas (efecto “hidrófilo”) e incluso oscilatorias. Son interacciones de tipo polar y pueden llegar incluso a alcanzar un valor dos órdenes de magnitud superior a las interacciones EL y LW . Analizaremos a continuación los aspectos físicos fundamentales de estas fuerzas no-DLVO.

A diferencia de las teorías sobre las fuerzas de van der Waals y de interacción entre dobles capas, que son teorías del continuo basadas en las propiedades macroscópicas del medio líquido (por ejemplo, su constante dieléctrica, densidad o índice de refracción), las fuerzas no-DLVO actúan a pequeñas distancias de la interfase, y los valores de estas magnitudes son diferentes de los que adquieren en el seno del líquido. Por tanto, el potencial de interacción entre moléculas situadas a esas distancias, puede ser muy distinto del esperado en teorías del continuo [así, la densidad en el caso de los líquidos contenidos entre dos paredes muy próximas entre sí es oscilatoria, con una periodicidad del orden de magnitud del tamaño molecular (164)].

Si consideramos un modelo líquido formado por moléculas esféricas, su solvatación (o estructuración) en torno a una molécula de soluto o incluso del propio disolvente vendrá determinada, principalmente, por la geometría de las moléculas y su capacidad de empaquetamiento. Cuando las interfases presentes son líquido-líquido o sólido-líquido, se presentan claras oscilaciones de densidad, pero en el caso de una interfase líquido-vapor, tales oscilaciones no existen, como ha demostrado Israelachvili (164).

Si se trata de dos interfases separadas una distancia determinada, el efecto es aún más notable. Sólo con consideraciones geométricas, sin tener en cuenta interacciones atractivas entre las moléculas de disolvente y las paredes, las moléculas se ven forzadas a acomodarse entre las dos superficies, siguiendo un cierto ordenamiento, que origina la fuerza oscilatoria de solvatación. Este comportamiento ha sido estudiado en los trabajos del grupo de Israelachvili (173-175).

La situación es mucho más compleja en los sistemas físicos reales, pues las moléculas de líquido no son esféricas; interaccionan mediante potenciales anisótropos y, además, las interfases no son estrictamente lisas (desde un punto de vista atómico). En el caso de existir interacción atractiva entre la superficie y las moléculas de líquido adyacentes, el empaquetamiento molecular descrito será más

denso, y la fuerza resultante entre las fases sólidas, aunque oscilatoria, tiene una componente repulsiva de largo alcance. Si, por el contrario, la interacción superficie-líquido es más débil que la interacción líquido-líquido, la fuerza de solvatación oscilatoria tiene una componente monótona atractiva.

La capacidad del agua para formar enlaces de hidrógeno, parece estar relacionada con las repulsiones hidrófilas y atracciones hidrófobas. En el primer caso, la intensidad de la repulsión vendría dada por la energía necesaria para romper los enlaces entre las moléculas de agua y la superficie sólida. De igual forma, si la superficie es hidrófoba, el enlace de hidrógeno entre la misma y las moléculas de agua será muy débil o inexistente. La orientación de las moléculas en las proximidades de tal superficie es desfavorable desde el punto de vista entrópico. Las moléculas de agua, prefieren entonces enlazarse entre sí y “salir” de la región donde se da esta restricción, produciéndose así una reducción de la energía libre superficial del sistema y una atracción neta entre las superficies sólidas.

A la componente de la tensión superficial de estas interacciones no dispersivas, se le engloba en un término general que se suele denominar ácido-base (γ^{AB}).

4.2.3. Contribuciones a la energía libre superficial. Teoría de van Oss, Good y cols.

1. Tensión superficial.

Para poder predecir el valor que adquieren las interacciones ya descritas en este capítulo [Lifshitz-van der Waals (LW) y ácido-base (AB)] es necesario hacer previamente una caracterización termodinámica de la superficie. Para ello, consideraremos el proceso reversible de acercar dos sistemas físicos en el vacío, formados por un sólido o líquido, I , hasta formar una fase continua (entran en contacto superficies iguales unitarias) (176). Se denomina *energía libre de*

cohesión ($\Delta G_{C,1}$) a la variación de energía libre que tiene lugar en el proceso, y *trabajo de cohesión* al opuesto de esta magnitud; a partir de ella podremos definir la tensión superficial (o energía libre superficial) del material 1 (γ_1) de la forma:

$$\Delta G_{C,1} = -W_{C,1} = -2\gamma_1 \quad (49)$$

indicando el factor 2 que al unir las dos superficies de los sistemas físicos desaparecen dos interfases.

Si se considera un proceso también reversible, igual al anterior, pero con dos sistemas físicos de materiales diferentes, 1 y 2 , se habla de adhesión, siendo $\Delta G_{A,12}$ la energía libre de adhesión y $W_{A,12}$ el trabajo de adhesión. En este caso, se destruyen las interfases 1 -vacío y 2 -vacío, pero se crea la 1 - 2 . Se define entonces la tensión interfacial (γ_{12}) mediante:

$$\Delta G_{A,12} = -W_{A,12} = \gamma_{12} - \gamma_1 - \gamma_2 \quad (50)$$

conocida como ecuación de Dupré (177).

Cuando se unen dos sistemas físicos como los descritos, de materiales diferentes 1 y 3 , en un medio líquido 2 ; desaparecen las interfases 1 - 2 y 3 - 2 , y se crea la interfase 1 - 3 , con lo que la ecuación de Dupré queda de la forma:

$$\Delta G_{123} = \gamma_{13} - \gamma_{12} - \gamma_{23} \quad (51)$$

Esa variación de energía libre será una medida de la energía de interacción entre los sistemas 1 y 3 en el medio 2 . Si 1 y 3 son el mismo material, 1 , en el medio 2 :

$$\Delta G_{121} = -2\gamma_{12} \quad (52)$$

Este es el caso de interacción entre partículas idénticas en suspensión en un medio líquido.

La energía libre interfacial está relacionada con las fuerzas de interacción que las superficies de las fases I y 2 se ejercen entre sí (cohesión) o con la otra fase (adhesión). La caracterización termodinámica superficial de nuestros sistemas físicos, nos permitirá determinar los valores de energía libre superficial e interfacial y, a partir de ellos, evaluar la naturaleza y alcance de las interacciones de origen no electrostático en la interfase.

2. Modelo de van Oss, Good y Chaudhury.

Las investigaciones más recientes acerca de la tensión superficial y sus componentes, han sido realizadas por van Oss (178, 179), van Oss y Good (180), van Oss y cols. (154, 181-184). La ecuación que constituye la base para el desarrollo de su modelo es la que expresa la tensión superficial total de cualquier fase, como suma de dos contribuciones o componentes, que son las asociadas a interacciones Lifshitz-van der Waals (LW) y ácido-base (AB):

$$\gamma_1 = \gamma_1^{LW} + \gamma_1^{AB} \quad (53)$$

El siguiente paso es postular una regla de combinación para calcular la contribución del carácter ácido y básico a las energías libres de adhesión a través de la interfase o a la energía interna de cohesión de una fase.

La Ec. 53 se puede hacer extensiva a la energía libre de la interfase $I/2$:

$$\gamma_{12} = \gamma_{12}^{LW} + \gamma_{12}^{AB} \quad (54)$$

A continuación, se expresará matemáticamente cada uno de los dos sumandos de la tensión superficial de la Ec. 54. Utilizando la regla de Good-Girifalco (158, 185), el primer término γ_{12}^{LW} queda de la forma:

$$\gamma_{12}^{LW} = \left(\sqrt{\gamma_1^{LW}} - \sqrt{\gamma_2^{LW}} \right)^2 = \gamma_1^{LW} + \gamma_2^{LW} - 2\sqrt{\gamma_1^{LW}\gamma_2^{LW}} \quad (55)$$

La obtención del segundo sumando (γ_{12}^{AB}) no puede hacerse mediante la regla anterior, pues como ya indicó Fowkes (179) no es aplicable a las interacciones AB , que son esencialmente asimétricas. Se postula entonces (y esta es la contribución esencial de estos autores) la siguiente regla de combinación para la componente AB de la tensión interfacial:

$$\gamma_{12}^{AB} = 2\left(\sqrt{\gamma_1^+\gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^+\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^+\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^-\gamma_2^+}\right) = 2\left(\sqrt{\gamma_1^+} - \sqrt{\gamma_2^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_1^-} - \sqrt{\gamma_2^-}\right) \quad (56)$$

donde γ_i^+ y γ_i^- representan, respectivamente, la contribución electrón-aceptor (ácido de Lewis) y electrón-donante (base de Lewis) a la tensión superficial de la fase i . La Ec. 56 para una fase queda de la forma:

$$\gamma_i^{AB} = 2\sqrt{\gamma_i^+\gamma_i^-} \quad (57)$$

Sustituyendo la Ec. 57 en la Ec. 53:

$$\gamma_i = \gamma_i^{LW} + 2\sqrt{\gamma_i^+\gamma_i^-} \quad (58)$$

Sustituyendo las Ecs. 55 y 56 en la Ec. 54, y teniendo en consideración la Ec. 58, se obtiene:

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 2\sqrt{\gamma_1^{LW}\gamma_2^{LW}} - 2\sqrt{\gamma_1^+\gamma_2^-} - 2\sqrt{\gamma_1^-\gamma_2^+} \quad (59)$$

que expresa la tensión interfacial entre las fases 1 y 2 .

Es usual hacer una clasificación de las sustancias en función de los valores que adquieren las componentes ácido y base de Lewis: bipolares, si las moléculas se comportan como ácidos y bases de Lewis simultáneamente; monopolares, cuando una de esas dos componentes (ácido o base) es despreciable o nula frente a la otra; y apolares si se anulan ambas componentes.

Como se puede observar, si una sustancia es monopolar, no existe el término γ_i^{AB} , y la tensión superficial total (γ_i) es entonces igual al término LW . No obstante, tales sustancias pueden interactuar fuertemente con materiales bipolares y materiales monopolares de polaridad opuesta, a pesar de la aparente naturaleza apolar de su tensión superficial.

Ambas interacciones LW y AB entre dos cuerpos idénticos o entre dos diferentes en el vacío, son siempre atractivas. No obstante, cuando están inmersos en un líquido, puede surgir una interacción repulsiva. Con respecto a la interacción LW , solamente aquella que tiene lugar entre dos materiales diferentes 1 y 3 , inmersos en un líquido 2 , puede ser repulsiva (159, 186-188), siempre que la componente apolar del líquido (γ_2^{LW}), cumpla: $\gamma_1^{LW} < \gamma_2^{LW} < \gamma_3^{LW}$ (183, 189).

En cuanto a la componente AB , la interacción neta entre dos cuerpos polares en un medio líquido puede ser repulsiva, siempre y cuando los dos cuerpos sean del mismo material (179) y se verifique que los valores de γ^+ y $\bar{\gamma}$ del líquido estén comprendidos entre los valores de γ^+ y $\bar{\gamma}$ del material polar.

El punto importante que queremos resaltar por su significación en la determinación de la energía total de interacción entre dos partículas

coloidales, es que el conocimiento de γ_i^{LW} y γ_i^\pm para las fases implicadas permite calcular dicha energía. En efecto, la energía libre de interacción (por unidad de superficie) entre dos partículas de material 1 inmersas en la fase 2 será:

$$\Delta G_{121} = -2\gamma_{12} = -2\left(\sqrt{\gamma_1^{LW}} - \sqrt{\gamma_2^{LW}}\right)^2 - 4\left(\sqrt{\gamma_1^+\gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^+\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^+\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^-\gamma_2^+}\right) \quad (60)$$

Nótese que un valor positivo de ΔG_{121} implicaría una repulsión neta entre las superficies (*presión de hidratación* o interacción *hidrófila*). Teniendo en cuenta que ΔG_{121}^{LW} es siempre negativo, el carácter atractivo o repulsivo de la interacción, representado por el valor de ΔG_{121} , dependerá de la contribución ácido-base ΔG_{121}^{AB} . En medio acuoso, la componente *AB* de la energía de cohesión del agua, debido a sus enlaces por puentes de hidrógeno es 102 mJ/m^2 , valor lo suficientemente elevado como para imponer un efecto atractivo neto entre superficies de partículas apolares o débilmente polares (efecto *hidrófobo*).

En otras ocasiones, como sucede en especial con las superficies *monopolares* (183) ($\gamma = \gamma^{LW}$; $\gamma^{AB} = 0$, usualmente $\gamma^+ = 0$ y $\gamma^- \neq 0$), el elevado valor del carácter básico de estas superficies las hace muy hidrófilas, existiendo fuertes interacciones repulsivas (*presión de hidratación*), por la presencia del factor $(\gamma_1^- \gamma_2^+)^{1/2}$, y por tanto se verifica que $|\Delta G_{121}^{AB}| > |\Delta G_{121}^{LW}|$.

Desde este punto de vista, el modelo de van Oss propone una interpretación de las interacciones de *solvatación*, según la cual, dichas interacciones tienen su origen en intercambios *AB* (ácido-base de Lewis) entre la superficie de las partículas dispersas y el medio de dispersión (agua, generalmente). En ambos casos, la componente *AB* del cambio de energía libre de Gibbs asociado a dicha interacción, sería la fuerza termodinámica responsable de la misma.

4.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

La tensión superficial de un líquido y la tensión interfacial entre dos líquidos son dos magnitudes a las que se puede tener acceso experimental de forma directa. Sin embargo, en el caso de los sólidos, es necesario recurrir a medidas de otras magnitudes para poder obtener a partir de ellas los valores de las tensiones superficiales. Junto con la técnica de penetración de líquidos en capa fina, la técnica de medida de ángulos de contacto es la más importante y habitual. Ambas han sido descritas con detalle en trabajos anteriores (169, 190, 191). Sin embargo, nos centraremos en una breve descripción de la técnica de medida de ángulos de contacto, ya que es la que hemos utilizado en nuestra investigación.

El sistema físico al que se va a aplicar esta técnica está constituido por una superficie sólida, una gota de líquido depositada sobre ella y el aire. Mediante la medida del ángulo de contacto (θ) entre la fase líquida y la gaseosa que la rodea (interfase líquido-gas), se obtendrán los valores de las componentes de la tensión superficial del sólido. La aplicación de este método está restringida a los casos en los que la superficie del sólido sea plana, homogénea y rígida a escala macroscópica.

La definición termodinámica del ángulo de contacto viene dada por la ecuación de Young. Para una superficie sólida, de las características mencionadas, sobre la que se deposita una gota de líquido puro, el ángulo de contacto de equilibrio es una magnitud única (192) que cumple la ecuación de Young:

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_L \cos\theta \quad (61)$$

donde γ_{SV} , γ_{SL} y γ_L son, respectivamente, las tensiones interfaciales sólido-vapor y sólido-líquido y la tensión superficial del líquido. La Ec. 61 se puede escribir de la forma:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta + \pi_e \quad (62)$$

donde γ_S es la tensión superficial del sólido y π_e es la presión superficial (*film pressure*), definida por:

$$\pi_e \equiv \gamma_S - \gamma_{SV} \quad (63)$$

esto es, la presión bidimensional que ejerce el vapor adsorbido sobre la superficie sólida. En el caso de que γ_S sea superior a γ_L , esta adsorción provoca una disminución de la tensión superficial del sólido, hasta alcanzar, en caso de saturación, el valor de la tensión superficial del líquido (193, 194).

Bajo estas condiciones límite, $\pi_e = \gamma_S - \gamma_L$ (195). En el caso contrario, que corresponde generalmente a sólidos de poca energía superficial, como los utilizados en este trabajo, π_e es despreciable y la ecuación de Young se puede escribir:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta \quad (64)$$

Un factor importante a considerar, en las medidas de ángulo de contacto, es el fenómeno de histéresis. Cuando una gota de líquido se deposita sobre la superficie de un sólido, se puede producir (dependiendo del método utilizado) un avance (la gota se deposita sobre una superficie seca) o una regresión (una vez depositada la gota, se retrae, desplazándose sobre zonas ya mojadas) de la gota, siendo los respectivos ángulos de contacto θ_a (avance) y θ_r (retroceso). Se verifica que θ_r es siempre inferior a θ_a . Este

fenómeno puede dificultar la estimación del verdadero ángulo de contacto, pues existe una gran dependencia entre la amplitud de la histéresis y el volumen de la gota utilizado. Este efecto se puede minimizar disminuyendo el volumen de la gota de líquido. Nuestras medidas experimentales se han realizado sobre el ángulo de avance.

Good (196), justifica el fenómeno de la histéresis como una consecuencia de las heterogeneidades de la superficie (los ángulos de avance supondrían una interacción preferente del líquido con las zonas de menor energía superficial y viceversa). No obstante, un trabajo más reciente (197) explica los valores de los ángulos de retroceso como consecuencia de la disminución de la energía superficial del sólido, causada por la presión superficial asociada a la adsorción del vapor del líquido utilizado.

Una vez medidos los ángulos de contacto, es posible determinar las componentes de la energía superficial del sólido. Sustituyendo en la Ec. 64 el valor de γ_{SL} dado por la Ec. 59, se obtiene:

$$2\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} = \gamma_L(1 + \cos\theta) \quad (65)$$

Midiendo los ángulos de contacto formados por tres líquidos diferentes, de los que se conocen las componentes de su tensión superficial, se puede establecer un sistema de tres ecuaciones como la Ec. 65, a partir del cual se calcularán los valores de las componentes del sólido. Por lo general, se suelen utilizar dos líquidos polares y uno apolar.

El análisis termodinámico superficial se ha efectuado en los tres tipos de partículas sintetizadas: núcleo magnético (magnetita), recubrimiento polimérico [poli(etil-2-cianoacrilato)] y partículas compuestas. Los líquidos empleados son: agua doblemente destilada y desionizada de calidad Milli-Q (Milli-Q Academic, Millipore, Francia), formamida (Carlo Erba, Italia) y

diiodometano (Merck, Alemania). En la aplicación del modelo de van Oss, se utilizaron los datos bibliográficos recogidos en la Tabla 3, donde se especifican los valores de las componentes de la tensión superficial de los líquidos de prueba utilizados (180).

Tabla 3: Componentes de la tensión superficial de los líquidos utilizados en el experimento de medida del ángulo de contacto en mJ/m^2 y a $20\text{ }^\circ\text{C}$ (180).

Líquido	γ^{LW}	γ^+	γ^-	γ
Agua	21.8	25.5	25.5	72.8
Formamida	39.0	2.28	39.6	58.0
Diiodometano	50.8	0.0	0.0	50.8

La medida de los ángulos de contacto se ha realizado mediante un telegoniómetro Ramé-Hart 100-0.7-00 (USA), que permite observar las gotas de líquido depositadas sobre un sólido. Este aparato dispone de un conjunto de tornillos micrométricos que permiten los desplazamientos verticales y horizontales del sustrato, así como de un limbo graduado para la medida del ángulo con una precisión de $\pm 1^\circ$. El uso de una microjeringa Gilson permite controlar el volumen de la gota depositada entre 2 y 4 μL .

La superficie del sólido a estudiar se obtuvo por compresión del material seco en una prensa hidráulica Spepac a una presión fijada de 148 MPa durante 5 minutos. Los comprimidos obtenidos presentaron un radio de 1.3 cm. Es importante indicar la imposibilidad de lograr la determinación de los ángulos de contacto en el comprimido de magnetita, debido a la rapidez con que era absorbida la gota de líquido. Debido a esto y para confirmar los valores obtenidos con los otros comprimidos, se volvieron a determinar los ángulos de contacto de los tres tipos de sólidos sobre portaobjetos de microscopio. En esta ocasión, se recubrió la superficie de estas placas de vidrio con una fina capa de sólido en suspensión de diclorometano (Panreac S.A., España) (5 % de sólidos) para garantizar la máxima homogeneidad de la superficie a obtener. Este disolvente se evapora a temperatura ambiente, por lo que las mediciones obtenidas

corresponden a los sólidos objeto de estudio. Este hecho se comprobó al medir los ángulos de contacto de la superficie de vidrio tal cual y tras ser expuesta al diclorometano: los datos obtenidos fueron los correspondientes al vidrio sin tratar, en ambos casos. Debido a la rápida evaporación del disolvente, se pudo realizar la determinación de los ángulos de contacto a los pocos minutos de la preparación de las placas, una vez que se comprobó la homogeneidad de la superficie obtenida y que las gotas depositadas eran estables.

En la Tabla 4, se recogen los valores de ángulo de contacto obtenidos. Los datos presentados son el promedio de 20 determinaciones realizadas a 25.0 ± 0.5 °C, midiendo sobre una nueva gota después de cada dos medidas. Como puede observarse, estos resultados ponen de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los tres tipos de partículas. Además, la coincidencia entre las medidas obtenidas con las suspensiones en diclorometano y los comprimidos confirma la validez de los resultados. Así pues, para evitar repeticiones innecesarias, a partir de este momento sólo indicaremos los resultados obtenidos con los comprimidos de los diferentes materiales, a excepción de la magnetita por las razones ya señaladas.

Tabla 4: Ángulos de contacto (grados) de los líquidos utilizados en las determinaciones en placa (p) y en comprimido (c), con magnetita, poli(etil-2-cianoacrilato) (PE-2-CA) y partículas compuestas.

Sólido	Agua	Formamida	Diiodometano
Magnetita	33 ± 2	24.8 ± 2.2	12.4 ± 2.2
PE-2-CA (p)	61 ± 4	36.1 ± 2.2	46 ± 3
PE-2-CA (c)	62 ± 2.5	35.6 ± 1.7	44.9 ± 1.9
Compuestas (p)	70.0 ± 2.5	37.4 ± 1.2	45.5 ± 1.4
Compuestas (c)	65 ± 4	37 ± 3	42 ± 3

4.4. COMPONENTES DE LA ENERGÍA LIBRE SUPERFICIAL DE LAS NANOPARTÍCULAS.

Es la evaluación de las componentes γ_s , recogidas en la Tabla 5, la que aporta una información física veraz sobre la termodinámica de los tres tipos de superficies. Esta tabla confirma en gran medida nuestras estimaciones basadas en las propiedades electrocinéticas: en particular, para cualquier componente considerado, sus valores para las partículas compuestas son similares a los del polímero (96). Además, a pesar de que la componente Lifshitz-van der Waals es la menos afectada por el tratamiento superficial (como suele ser habitual, ver p.ej.: Ref. 198), su valor para las partículas compuestas es casi el mismo que el del polímero. Respecto a la componente electrón-aceptor (γ_s^+), a pesar de ser pequeña en los tres casos, es virtualmente cero para la magnetita, y adquiere valores finitos para el polímero y las partículas compuestas. La contribución electrón-donante (γ_s^-) presenta un valor elevado en la magnetita, la cual es esencialmente un material monopolar electrón-donante, en el sentido dado al término por van Oss: puede tener interacciones ácido-base con fases de cualquier polaridad (γ^+ , γ^- , o ambas, diferentes de cero) pero las fuerzas AB no contribuyen a su energía libre de cohesión. Esto es, en esencia, similar a lo que otros autores han obtenido para diferentes compuestos inorgánicos (169, 191, 199, 200). Es bastante general el comportamiento monopolar en los materiales inorgánicos, aunque Janczuk y cols. (194, 195, 201) han encontrado un carácter bipolar en calconita y galena.

El valor de γ_s^- para magnetita es mucho mayor que el encontrado para el polímero y las partículas compuestas. Además, como en el caso de las propiedades electrocinéticas, este análisis termodinámico sugiere que el recubrimiento es completo, ya que las componentes de γ_s de las partículas compuestas coinciden casi totalmente con las correspondientes al polímero puro (96).

Tabla 5: Componentes de la energía libre superficial de magnetita, polímero y partículas compuestas. γ_s^{LW} es la componente Lifshitz-van de Waals; γ_s^+ (γ_s^-) es la componente electrón-aceptor(electrón-donante). Todos los valores están en mJ/m^2 .

Sólido	γ_s^{LW}	γ_s^+	γ_s^-
Magnetita	49.6 ± 0.4	0.060 ± 0.012	42.2 ± 1.1
PE-2-CA	37.1 ± 1.1	2.12 ± 0.20	12.7 ± 1.9
Compuestas	38.5 ± 1.6	1.8 ± 0.3	10 ± 3

4.5. ANÁLISIS DE LA NATURALEZA HIDRÓFILA/HIDRÓFOBA.

Como ya hemos mencionado, una caracterización termodinámica exhaustiva como la descrita no sólo tiene interés de por sí, esto es, desde el punto de vista fundamental. Las interacciones implicadas en la determinación de la energía libre superficial de los sólidos se manifiestan en fenómenos como la agregación de partículas en suspensión o su adhesión a diferentes sustratos. La idea que subyace a nuestro estudio es que las metodologías empleadas, junto con su base teórica, permiten, por un lado, especificar completamente la componente LW de la energía de interacción entre partículas dispersas (contemplada, junto con la repulsión electrostática entre dobles capas, en la teoría clásica DLVO), y, por otro lado, cuantificar igualmente las contribuciones no-DLVO a la energía total, que se relacionan con la componente AB de la tensión superficial tanto del sólido en suspensión como del líquido.

Consideramos aquí la importancia de los términos LW y AB de la energía de interacción entre las partículas descritas en este trabajo (fase 1) en medio acuoso (fase 2):

$$\Delta G_{121} = \Delta G_{121}^{LW} + \Delta G_{121}^{AB} \quad (66)$$

Haciendo uso de la Ec. 60, pueden obtenerse los valores de ΔG_{121}^{LW} y ΔG_{121}^{AB} que se muestran en la Tabla 6. En la misma, se puede apreciar que para la magnetita, el intercambio energético debido a la componente LW es bastante menor que el asociado a la componente AB , siendo, además, negativo. Por tanto, la variación de la energía libre de interacción total es debida, principalmente, a la componente AB (198).

Tabla 6: Energía libre de interacción entre las partículas y sus componentes AB y LW en medio acuoso.

Sólido	ΔG_{121}^{LW} (mJ/m ²)	ΔG_{121}^{AB} (mJ/m ²)	ΔG_{121} (mJ/m ²)
Magnetita	-11.3 ± 0.3	28 ± 3	16 ± 3
PE-2-CA	-4.0 ± 0.5	-21 ± 9	-25 ± 9
Compuestas	-4.7 ± 0.8	-28 ± 8	-32 ± 9

El hecho de que sea positiva la contribución AB , en el caso de la magnetita, indica que su naturaleza fuertemente monopolar provoca una significativa repulsión entre las partículas. La interacción LW , debida a la contribución apolar, siempre atractiva en estos casos, es mucho menos intensa, provocando por ello un valor neto positivo para ΔG_{121} . Por el contrario, tanto las partículas compuestas como el polímero tienen valores negativos de ΔG_{121} (atracción hidrófoba), que se añaden a la atracción de van der Waals.

Obviamente, estos cambios en la energía libre superficial se manifiestan en las características hidrófobas/hidrófilas de los diferentes materiales. De acuerdo con van Oss y cols. (179), puede utilizarse el siguiente criterio para determinar cuándo un material puede considerarse hidrófilo o hidrófobo.

Si ΔG_{121} resulta ser negativo, las interacciones interfaciales favorecen la atracción entre sí de las partículas, y son consideradas hidrófobas. La hidrofilia estará asociada a valores positivos de ΔG_{121}^{TOT} . La Fig. 32 muestra los resultados obtenidos para los tres tipos de partículas. Como puede

apreciarse, la naturaleza hidrófila de la magnetita se pierde, al ser recubierta por el polímero hidrófobo, una clara indicación de que dicho recubrimiento ha sido efectivo (96).

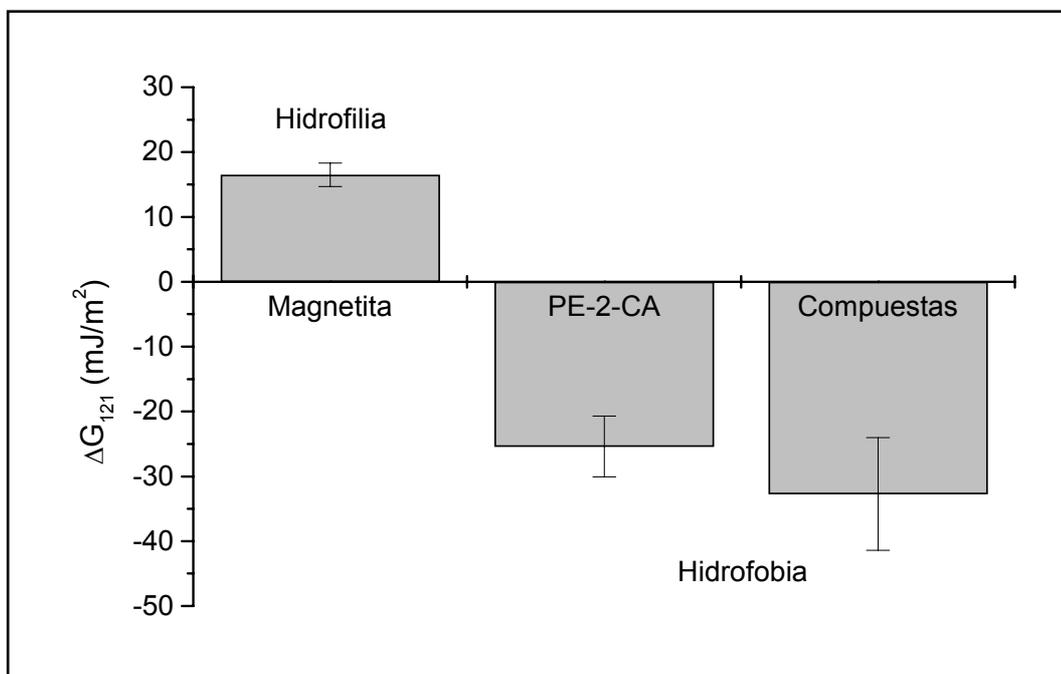


Fig. 32: Valores de ΔG_{SLs} y carácter hidrófobo/hidrófilo de los tres tipos de partículas.

4.6. MECANISMO DE FORMACIÓN DE LA CAPA DE POLÍMERO EN LAS PARTÍCULAS COMPUESTAS.

La información ya descrita sobre las características superficiales de los materiales implicados, permite argumentar el mecanismo por el que la capa polimérica se forma en la superficie de la magnetita. En primer lugar, podemos hablar de una interacción electrostática de tipo atractivo entre las partículas de magnetita cargadas positivamente (en la Fig. 26, se observa cómo las condiciones ácidas de la reacción determinan una carga superficial positiva) y los carbaniones cargados negativamente (generados por el ataque nucleofílico de los aniones OH⁻ al monómero). Esta atracción provocará la concentración de los últimos en las

inmediaciones de la superficie de la magnetita. Además, podemos dar un razonamiento termodinámico: a partir de los datos de la Tabla 5, la energía libre de interacción entre la magnetita (M) y el polímero (P) en el medio acuoso (A), ΔG_{MAP} , puede calcularse como sigue, utilizando la ecuación de Dupré (177):

$$\Delta G_{MAP} = \gamma_{MP} - \gamma_{MA} - \gamma_{PA} \quad (67)$$

donde las energías libres interfaciales se obtienen mediante la Ec. 55 para cada par de interfases involucradas. El resultado de este cálculo es $-56 \pm 8 \text{ mJ/m}^2$. Esto significa que las interacciones ácido-base y de van der Waals entre la magnetita y el polímero son netamente atractivas. En otras palabras, termodinámicamente es más favorable para el polímero permanecer en contacto con la magnetita antes que estar aislado en el agua (96).

Capítulo 5.
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD
DE VEHICULIZACIÓN DE
5-FLUOROURACILO

5.1. INTRODUCCIÓN.

Para que un fármaco antineoplásico actúe es condición indispensable que acceda en concentración suficiente a todas las células sensibles a él. Si bien es cierto que estos fármacos pueden actuar mejor que otros métodos terapéuticos en determinadas situaciones (grupos de células no visibles por su tamaño, metástasis múltiples e infiltrados en lugares poco accesibles al bisturí o a las radiaciones), en otras pueden no hacerlo porque sus características farmacocinéticas se lo impiden, por desarrollarse resistencias celulares o porque la concentración eficaz sería tal que implicaría una grave toxicidad (202). La utilización de nanopartículas de poli(alquilcianoacrilato) como vehículos de anticancerígenos ha recibido una especial atención en los últimos años. Los resultados más espectaculares en quimioterapia antineoplásica experimental se han logrado cuando el transportador es administrado dentro del compartimento donde las células cancerígenas están localizadas (203). Parece ser que el incremento de la acción de los citostáticos asociados a estas nanosferas se debe a un aumento de su captación por las células tumorales más que a su lenta liberación (204, 205).

Especial interés en investigación ha recibido el uso de estas nanopartículas como sistemas que permitan vencer las formas de resistencia desarrolladas por células cancerígenas, que complican la terapia antineoplásica. Entre estas formas destacan la resistencia múltiple a varios fármacos (consecuencia de la sobreexpresión de la glucoproteína P de multitransporte de fármacos), la resistencia múltiple atípica (debida a un descenso de la actividad de la topoisomerasa II) y el incremento de la actividad de la glutatión-S-transferasa. La primera forma de resistencia es la más importante y es en la que se ha propuesto la vehiculización de diversos anticancerígenos por este tipo de transportadores como alternativa al uso de inhibidores competitivos de la glucoproteína P (como el verapamilo), cuyos efectos adversos derivados del bloqueo de canales iónicos a las concentraciones terapéuticas disuade su uso en ensayos clínicos. Se ha observado que es preciso el contacto físico entre las nanosferas de

poli(alquilocianoacrilato) y las células para lograr una mayor concentración intracelular de fármaco y se ha destacado el efecto sinérgico de los productos de degradación de estas nanosferas (ácido policianoacrílico, principalmente) al provocar un aumento de la fluidez de la membrana que contribuye al incremento de la acumulación celular de fármaco tras vencer los gradientes electroquímicos de transmembrana (81, 206). La capacidad para vencer esta resistencia es mucho mayor si el anticancerígeno se encuentra incorporado en la matriz y no sólo vehiculizado en la superficie de las nanopartículas. Además, han demostrado una mayor eficacia que otros polímeros como el alginato, la poli(lactida) y la poli(lactida-co-glicolida) (207). Sin embargo, es discutida su eficacia *in vivo*. De hecho, cuando se administran por vía intravenosa son captadas por el hígado unos minutos después debido al proceso de opsonización (208).

La utilización de un sistema de liberación modificada constituido por un núcleo magnético (magnetita) y un recubrimiento polimérico biodegradable [poli(etil-2-cianoacrilato)] podría permitir el transporte magnéticamente controlado de un fármaco anticancerígeno (como el 5-fluorouracilo) hasta el órgano diana de interés. De esta manera, a los principales beneficios derivados del uso de estos sistemas ya comentados (13, 14), se sumarían los derivados de la mejora de los problemas de estabilidad [cardiotoxicidad de los productos de degradación generados en el medio básico de los viales inyectables (209)] y de la concentración del 5-fluorouracilo en el lugar diana [mejora del perfil farmacocinético: rápida metabolización, vida media de 10 minutos (202)]. También se solucionaría la posible aparición de resistencias, al localizarse el antineoplásico en elevada concentración en las inmediaciones de la célula cancerosa y facilitarse su acción por el efecto sinérgico de los productos de degradación poliméricos.

En el presente capítulo realizaremos, en primer lugar, un estudio de la absorbancia óptica de las disoluciones de 5-fluorouracilo con el objetivo de obtener las condiciones óptimas de trabajo (pH, temperatura y exposición a la luz) y determinar el coeficiente de absorción molar, mediante la preparación de una

curva de calibrado que relacione la absorbancia con la concentración de fármaco. Asimismo, se justificará el margen de concentraciones de fármaco en el que se ha realizado el estudio. Además, determinaremos la absorbancia de las suspensiones de polímero y de las disoluciones de fármaco con el fin de definir cómo influye el pH del medio de polimerización sobre la estabilidad de ambas. Realizaremos una justificación de la metodología de medida empleada en la determinación de la incorporación de fármaco en las partículas poliméricas y compuestas, la cual está basada en la aplicación de la extensión de la ley de Beer a mezclas de sustancias absorbentes. El estudio de la adsorción superficial de fármaco en los tres tipos de materiales se abordará mediante la determinación del efecto de la concentración de fármaco sobre la movilidad electroforética de los tres tipos de partículas y mediante el análisis espectrofotométrico de los sobrenadantes obtenidos tras la exposición de las partículas a disoluciones con diferente concentración de fármaco.

Para finalizar, se identificarán las condiciones óptimas de incorporación del 5-fluorouracilo en la matriz polimérica, centrándonos en cómo afecta la concentración de fármaco, el pH del medio, la presencia de agentes estabilizadores o tensioactivos y la concentración de monómero empleada en la vehiculización. Las condiciones óptimas determinadas se utilizarán en la síntesis de las partículas compuestas, realizando una comparación con los resultados obtenidos en las nanosferas poliméricas y con los datos de otros autores.

5.2. 5-FLUOROURACILO: GENERALIDADES.

El objetivo último de la terapia antineoplásica es la eliminación completa de toda célula cancerosa mediante métodos quirúrgicos, radioterápicos y farmacológicos. Si la neoplasia no está localizada, existen metástasis o no es posible la erradicación por motivos diversos, el objetivo de la terapia es paliativo. La farmacología anticancerosa constituye un método terapéutico muy útil que

coadyuva, junto con la cirugía y la radioterapia, a mejorar el pronóstico de la enfermedad. La acción de los antineoplásicos se dirige en su totalidad a frenar la proliferación y el crecimiento celular. Para ello actúan sobre la maquinaria reproductora y sólo excepcionalmente el objetivo primordial es inhibir la síntesis de proteínas (202).

La Organización Mundial de la Salud clasifica los fármacos antineoplásicos en tres niveles de prioridad (210), según criterios avalados científicamente de utilidad en el tratamiento de tumores y según la incidencia global de los tumores que responden a la terapia. Dentro de los antineoplásicos que pertenecen al grupo de prioridad 1 se encuentra el 5-fluorouracilo (Tabla 7), eficaz en el tratamiento de los diez tipos de tumores con mayor incidencia (pulmón, estómago, mama, colorrectal, cérvix, cabeza y cuello, linfoma, hepatobiliar, esofágico y próstata) y de aquellos clasificados en las categorías 1 y 2. La primera incluye tumores para los que existe evidencia de que un fármaco o una combinación, utilizada en solitario o con otras modalidades terapéuticas, da lugar a una curación total en algunos pacientes o a una prolongación de la supervivencia en la mayoría. Estos son: cáncer de células germinales, trofoblástico, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia promielocítica aguda, linfoma de enfermedad de Hodgkin y no Hodgkin. En la categoría 2 se engloban tumores en los que la supervivencia media se prolonga cuando la quimioterapia es utilizada como coadyuvante de la cirugía local o la radioterapia en los estados iniciales de la enfermedad. Estos son: cáncer colorrectal, de mama, de ovario, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms.

El 5-fluorouracilo es un antineoplásico perteneciente al grupo de los fármacos antimetabolitos, los cuales actúan en la fase de la síntesis del ciclo celular porque interfieren en la síntesis de ARN y ADN. La mayoría de los fármacos pertenecientes a este grupo son análogos estructurales de los metabolitos que normalmente intervienen en los procesos de crecimiento y división. Otros

inhiben enzimas específicas necesarias para la síntesis de compuestos esenciales. Su eficacia, en general, es máxima cuando la proliferación celular es rápida (202).

Tabla 7: Fármacos anticancerígenos de prioridad 1. El signo + indica actividad sobre ese grupo de tumores y el signo - indica ausencia de actividad. Asimismo, se indica si poseen presentación genérica.

	Actividad sobre los diez tipos de cáncer con mayor incidencia	Actividad sobre los tipos de cáncer agrupados en las categorías 1 y 2	Presentación genérica
Bleomicina	+	+	Sí
Clorambucilo	+	+	Sí
Cisplatino	+	+	Sí
Ciclofosfamida	+	+	Sí
Doxorrubicina	+	+	Sí
Etopósido	+	+	Sí
5-fluorouracilo	+	+	Sí
Metotrexato	+	+	Sí
Prednisolona	+	+	Sí
Procarbina	-	+	Sí
Tamoxifeno	+	+	Sí
Vincristina	+	+	Sí
Vinblastina	+	+	Sí
Citarabina	-	+	Sí
Dactinomicina	-	+	Sí
Daunorubicina	-	+	Sí
6-mercaptopurina	-	+	Sí

El 5-fluorouracilo (Fig. 33) es el más sencillo de los fármacos análogos del uracilo, incorpora un átomo de flúor en la posición 5 en lugar del hidrógeno. Es un antimetabolito de la uridina que actúa como falso sustrato en el proceso de síntesis de los constituyentes esenciales de los ácidos nucleicos, principalmente en la fase S del ciclo celular, provocando la síntesis de un ADN anómalo o incluso la detención del proceso. El fluorouracilo lesiona las células mediante dos

mecanismos de acción, cuya contribución a la acción citotóxica varía según el tipo de tumor: la inhibición de la timidilato-sintetasa (que provoca la depleción de d-TMP, un nucleótido indispensable para la síntesis de ADN) y la incorporación progresiva al ARN (interfiriendo así con su procesamiento y su función específica). Para ello, debe transformarse inicialmente en el desoxirribonucleótido correspondiente, el ácido 5-fluorodesoxiuridílico.

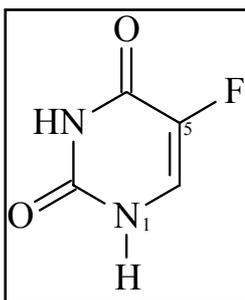


Fig. 33: Representación del 5-fluorouracilo.

Es uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de muchos tumores sólidos. En particular, es todavía fundamental en el tratamiento del cáncer colorrectal. Sin embargo, su eficacia está limitada por la rapidez de su metabolización (vida media de 10 minutos). Se han realizado muchos intentos para incrementar su eficacia:

- La combinación con otros antitumorales, sin obtenerse una mayor tasa de respuesta en comparación con su administración en solitario.
 - La combinación con modificadores biológicos como el ácido fólico y el metotrexato, los cuales interactúan con las acciones biológicas del 5-fluorouracilo aumentando sus efectos terapéuticos, parece ser más eficaz que su administración en solitario.
 - La infusión continua incrementa el porcentaje de células tumorales susceptibles, esto hace posible la utilización de una dosis de alta intensidad la cual es activa en pacientes resistentes al 5-fluorouracilo administrado como bolo inyectable.
-

El 5-fluorouracilo se emplea principalmente en algunos adenocarcinomas del tubo digestivo (colon, páncreas, estómago y recto) y de la mama y, con menor frecuencia, en hepatomas y carcinomas de ovario, próstata, cuello uterino, vejiga y orofaringe. En ocasiones, se ha empleado la infusión intraarterial (p. ej., en metástasis hepática del carcinoma de colon), pero la forma más frecuente de administración es la infusión intravenosa continua durante 120 horas (20-30 mg/kg/día); en tumores de cabeza y cuello se asocia al cisplatino en infusión durante 92 horas. Se utiliza como tratamiento paliativo en pacientes no curados por cirugía o radioterapia. También ha sido empleado en el tratamiento del cáncer de la cubierta externa de la glándula adrenal, de endometrio, de esófago, de pene, de vulva y en el hepatoblastoma. Por vía tópica puede inducir a fotosensibilización y eritema, exfoliación, ulceración, necrosis y reepitelización. Se utiliza en el tratamiento de la psoriasis, en la terapéutica de nevos y tumores epidérmicos y de la queratosis premaligna de la piel.

Al igual que ocurre con otros antineoplásicos, su especificidad por las células tumorales es escasa y ello condiciona la frecuente y grave afectación de otros órganos y tejidos, generando una toxicidad que casi siempre limita las posibilidades de administrar la dosis total que teóricamente sería conveniente. Las reacciones adversas más frecuentes se aprecian en el tracto gastrointestinal y en la médula ósea. En el primero, las reacciones iniciales son náuseas y vómitos, y las diferidas son estomatitis y ulceraciones en diversas localizaciones del tubo digestivo. En la médula ósea provoca mielosupresión, en la que predomina leucopenia. Puede producir también alopecia, conjuntivitis y síntomas neurológicos agudos (somnolencia, parestesias y atasia cerebelosa). La actividad mielotóxica predomina cuando la administración parenteral es en forma de bolo, y disminuye si se administra en infusión intravenosa. Algunos de los efectos adversos que produce pueden aparecer meses o años después de su administración. Una toxicidad no comúnmente relacionada con este fármaco es la cardiotoxicidad (211). Este fenómeno es atribuido a los compuestos de degradación (fluoroacetaldehído y ácido fluoromalonaldehídico) presentes en los viales inyectables y formados con el tiempo en el medio básico necesario para

solubilizar el fármaco. La metabolización del fluoroacetaldehído genera el fluoroacetato, potencialmente cardiotoxico (209).

Como muchos de los antineoplásicos, altera los mecanismos de división y procesamiento de las células implicadas en la inmunidad celular, de ahí que con frecuencia surja un estado de depresión inmunitaria que facilita la aparición de infecciones por virus, hongos y bacterias. Además, la modificación que induce de la estructura del genoma puede originar otras formas de toxicidad cada vez más preocupantes: la mutagenicidad y la carcinogenicidad. A medida que la expectativa de vida aumenta al mejorar la sistemática de administración, se incrementa la probabilidad de que ciertos antineoplásicos provoquen mutaciones génicas, algunas de las cuales significan una pérdida de control del crecimiento y diferenciación de células hasta entonces normales, originando así un nuevo tipo de tumor.

5.3. DETERMINACIÓN ESPECTRAL DE LA ABSORCIÓN.

5.3.1. Fundamentos teóricos.

Las medidas de absorción de la radiación ultravioleta y visible encuentran una enorme aplicación en la identificación y determinación cuantitativa de una gran variedad de especies inorgánicas y orgánicas. La espectroscopía de absorción molecular se basa en la medida de la transmitancia T o de la absorbancia A de disoluciones que se encuentran en cubetas transparentes que tienen un camino óptico de b cm. Normalmente, la concentración de un analito absorbente está relacionada linealmente con la absorbancia como recoge la siguiente ecuación:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (68)$$

donde A es la absorbancia, T es la transmitancia, P y P_0 son las intensidades transmitida e incidente, respectivamente, ϵ es la absorptividad molar, b es el camino óptico de la radiación y c es la concentración del analito absorbente. Esta ecuación es una representación matemática de la ley de Beer (212).

La ley de Beer también se puede aplicar a un medio que contenga más de una clase de sustancias absorbentes. La absorbancia total de una disolución es igual a la suma de las absorbancias que presentan los componentes individuales. Esta relación hace posible la determinación cuantitativa de los constituyentes individuales de una mezcla, incluso si su espectro se solapa (213). Siempre que se cumpla la ley de Beer y las distintas especies se comporten de forma independiente unas respecto de otras, la absorbancia total para un sistema multicomponente viene dada por:

$$A_{total} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \epsilon_1 b c_1 + \epsilon_2 b c_2 + \dots + \epsilon_n b c_n \quad (69)$$

donde los subíndices se refieren a los componentes absorbentes 1, 2, ..., n . La mayor exactitud de un análisis de este tipo se alcanza cuando se seleccionan longitudes de onda en las que las diferencias entre las absorptividades molares sean grandes.

Se han encontrado pocas excepciones a la generalización de que la absorbancia está relacionada linealmente con el camino óptico. Por otra parte, con frecuencia se han hallado desviaciones de la proporcionalidad entre la medida de la absorbancia y la concentración cuando b es constante (212). En algunas ocasiones estas desviaciones están relacionadas con el fundamento de la ley y representan limitaciones propias de la misma. Otras veces surgen como consecuencia de la forma en que se realizan las medidas de absorbancia (desviaciones instrumentales) o como resultado de cambios químicos asociados con cambios de concentración (desviaciones químicas).

Recuérdese que la ley de Beer describe de forma correcta el comportamiento de absorción de un medio que contiene concentraciones de analito relativamente bajas. A concentraciones altas, generalmente superiores a 10^{-2} M, la distancia media entre las moléculas responsables de la absorción disminuye hasta el punto en que cada molécula altera la distribución de carga de las moléculas vecinas. Esta interacción, a su vez, puede alterar la capacidad de las moléculas para absorber la radiación de una determinada longitud de onda. Como la magnitud de la interacción depende de la concentración, la aparición de este fenómeno da lugar a desviaciones de la linealidad entre la absorbancia y la concentración. Aunque, normalmente, el efecto de las interacciones moleculares no es significativo para concentraciones inferiores a 10^{-2} M, entre ciertos iones o moléculas orgánicas grandes aparecen algunas excepciones.

La absorción de radiación ultravioleta o visible resulta, generalmente, de la excitación de los electrones de enlace; como consecuencia, los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces de las especies objeto de estudio. La espectroscopía de absorción molecular es, por tanto, válida para identificar grupos funcionales en una molécula. Más importantes, sin embargo, son las aplicaciones en la determinación cuantitativa de compuestos que contienen grupos absorbentes.

El espectrofotómetro utilizado en nuestro trabajo (Dynko, Spectrometer 8500 UV-Vis, Dinamarca) está equipado con una lámpara de deuterio, que produce un espectro continuo útil para la región comprendida entre 180 y 375 nm, y otra de wolframio, útil para la región de longitudes de onda comprendida entre 350 y 1100 nm, con el objetivo de poder obtener un espectro que cubra desde los 180 nm hasta los 1100 nm. La cubeta utilizada es de cuarzo, transparente en la región espectral de interés, y con un camino óptico de 1 cm. Su mantenimiento es crítico para la calidad de las medidas, por lo que la limpieza completa antes y después de su uso es fundamental y se realizó siempre con agua destilada y acetona.

5.3.2. Absorbancia óptica de las disoluciones de 5-fluorouracilo.

Las primeras etapas de un análisis fotométrico o espectrofotométrico son el establecimiento de las condiciones de trabajo y la preparación de una curva de calibrado que relacione la absorbancia con la concentración de la especie a estudiar. Las medidas de absorbancia espectrofotométricas se hacen normalmente a una longitud de onda correspondiente a un pico de máxima absorción, ya que el cambio en la absorbancia por unidad de concentración es mayor en este punto, lográndose así una máxima sensibilidad. Además, bajo estas circunstancias se puede esperar una buena observancia de la ley de Beer y las medidas son menos sensibles a las incertidumbres que surgen de las limitaciones del instrumento (213).

Si bien la metodología seguida en la síntesis de las nanopartículas poliméricas y compuestas, determina las condiciones de trabajo [el fármaco se encontrará disuelto en un medio de polimerización acuoso con un pH ácido al que se adicionará el monómero de forma progresiva]; un aspecto crucial previo es la clarificación de las condiciones de preparación y conservación de las disoluciones de 5-fluorouracilo. Este estudio se realizó prestando especial atención a las concentraciones de fármaco, la temperatura y el pH de las disoluciones utilizados. El 5-fluorouracilo utilizado (5-fluorouracilo, Aldrich, Alemania) es un polvo cristalino blanco, inodoro, con un peso molecular de 130.08 g/mol y estable al aire. El carácter fotosensible de sus disoluciones (214), cuyo estudio recogemos más adelante, determina que deban prepararse con gran diligencia bajo las mínimas condiciones de iluminación posibles.

Se investigaron las condiciones óptimas de conservación durante 24 horas según la concentración de fármaco (concentraciones molares: 10^{-5} , $3 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $3 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $3 \cdot 10^{-3}$, 10^{-2} , $3 \cdot 10^{-2}$ y 10^{-1}), la temperatura (4 °C y 25 °C) y el pH de las disoluciones [pH = 2.4 ($2 \cdot 10^{-3}$ M HCl) y pH = 9.4 (ajustado con NaOH 10^{-1} M)]. Para la disolución de los cristales de 5-fluorouracilo se precisó la utilización de ultrasonidos, si bien la intensidad y la duración de la aplicación fue menor para las

disoluciones preparadas a pH básico. No se observó, de forma general, ningún tipo de alteración visible macroscópicamente tras el período de conservación de 24 horas; sin embargo y en concordancia con lo observado por otros autores (214), en la disolución de mayor concentración (10^{-1} M) aparecieron cristales en un período de tiempo inferior a las 24 horas en todas las condiciones de conservación, si bien a una temperatura de 4 °C (independientemente del pH) los cristales aparecieron en menos de 6 horas. Por lo tanto, la conservación de las disoluciones de 5-fluorouracilo con pH = 2.4 se realizará protegiéndolas de la luz ambiental (botes recubiertos por papel de aluminio y depositados en un cajón), a temperatura ambiente y no se utilizarán concentraciones de fármaco superiores a 10^{-2} M, para evitar la inestabilidad observada a grandes concentraciones.

Tras decidir las condiciones de preparación y conservación a seguir a lo largo de nuestro trabajo, se procedió a preparar la curva de calibrado a partir de una batería de disoluciones de 5-fluorouracilo (concentraciones molares: 10^{-5} , $3 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $1.5 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $2.5 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $3.5 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $2 \cdot 10^{-3}$, $3 \cdot 10^{-3}$ y 10^{-2}) con una concentración fijada $2 \cdot 10^{-3}$ M de HCl. De esta manera, determinaremos la longitud de onda de máxima absorbancia y se realizará el cálculo del coeficiente de absorción molar, fundamental en los estudios de adsorción y absorción de fármaco.

Transcurridas 24 horas desde su preparación, se procedió a la determinación del espectro de absorción ultravioleta-visible de cada una de ellas, realizando un barrido de longitudes de onda desde 1100 a 180 nm, con intervalos de 1.0 nm. Se utilizó como blanco en la calibración previa del aparato una disolución $2 \cdot 10^{-3}$ M de HCl (pH = 2.4) para eliminar las posibles interferencias en el espectro del fármaco generadas por el medio de disolución. Los resultados de este estudio se recogen en la Fig. 34, donde sólo se observa señal por debajo de los 325 nm y se aprecia cómo la absorción aumenta al aumentar la concentración de fármaco en el medio. Son claros los dos picos en el espectro de las disoluciones de 5-fluorouracilo, si bien el único que presenta una longitud de máxima absorbancia invariable a diferentes concentraciones es el que aparece a 265 nm.

Por lo tanto, descartamos el pico que se genera a menor longitud de onda y los espectros obtenidos a concentraciones superiores a $4 \cdot 10^{-4}$ M, ya que a partir de esta concentración es patente la tendencia de los dos picos a fundirse en uno, hecho que se produce a una concentración de $3 \cdot 10^{-3}$ M. Además, se aprecia una irregularidad manifiesta del espectro de estas altas concentraciones que hace imposible plantear cualquier tipo de medida y la longitud de onda de máxima absorbancia decrece de forma muy acusada al aumentar la concentración, por lo que pierde validez en la determinación del coeficiente de absorción molar. Esta desviación manifiesta de la ley de Beer podría justificarse por el hecho de que aunque, normalmente, el efecto de las interacciones moleculares no es significativo para concentraciones inferiores a 10^{-2} M, el 5-fluorouracilo puede pertenecer al grupo de moléculas orgánicas donde aparecen algunas excepciones.

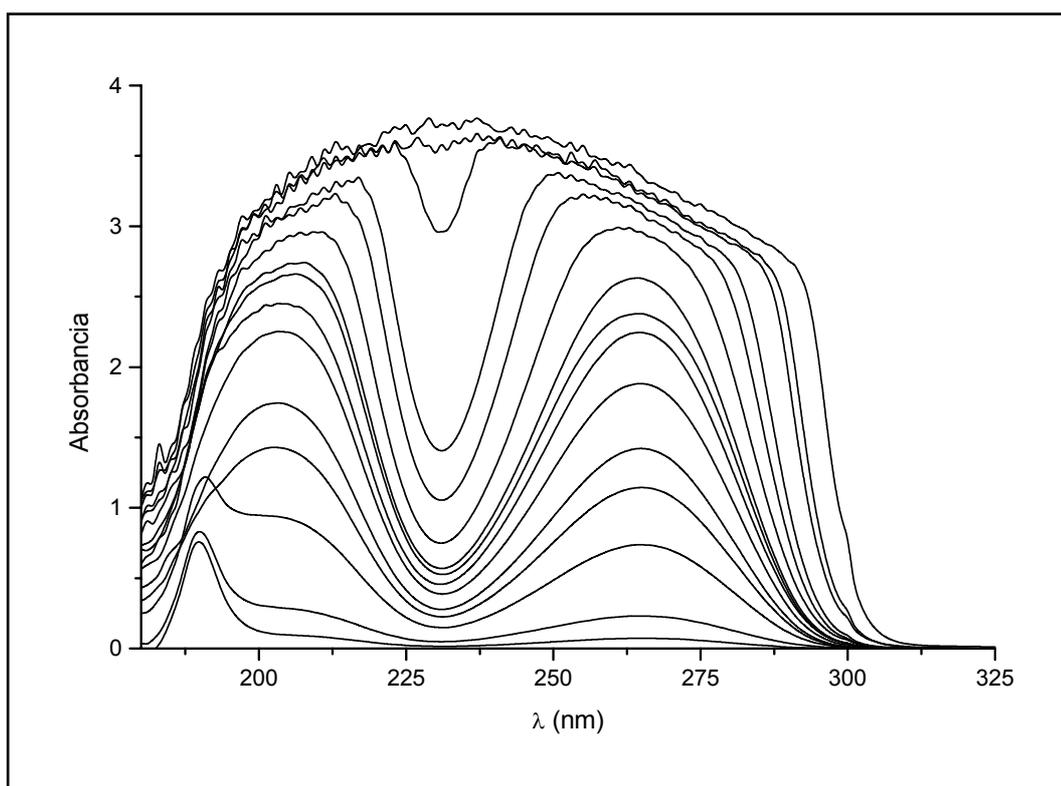


Fig. 34: Espectro de absorción ultravioleta-visible de disoluciones de 5-fluorouracilo a un pH de 2.4 ($2 \cdot 10^{-3}$ M KNO_3). Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbancia son: 10^{-5} , $3 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $1.5 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $2.5 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $3.5 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $2 \cdot 10^{-3}$, $3 \cdot 10^{-3}$ y 10^{-2} .

La determinación del coeficiente de absorción molar (ϵ) se realizó ajustando los datos de absorbancia y concentración mediante el método de los mínimos cuadrados. El resultado obtenido fue $\epsilon = 6840 \pm 220 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. En la Fig. 35 se muestran los datos y la recta de ajuste. Es destacable cómo los valores de absorbancia a diferentes concentraciones, obtenidos para la longitud de onda de máxima absorbancia cumplen la ley de Beer.

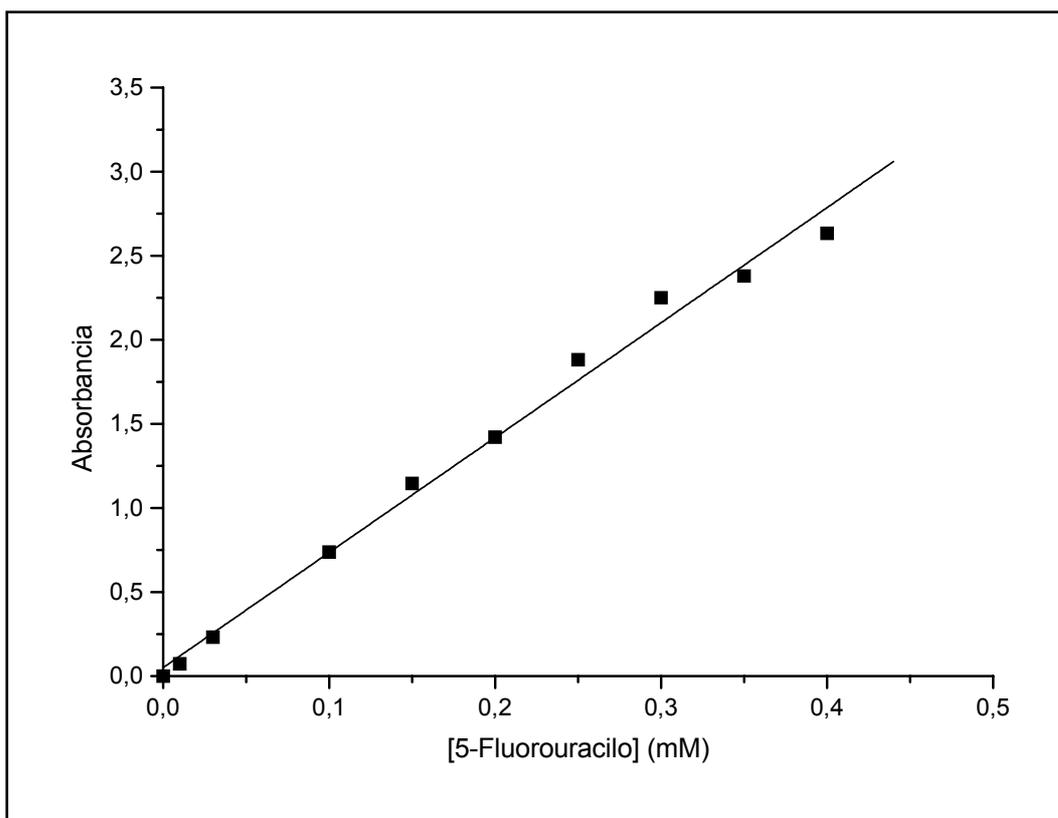


Fig. 35: Determinación del coeficiente de absorción molar de las disoluciones de 5-fluorouracilo para la longitud de onda de máxima absorbancia (265 nm).

La pérdida de la linealidad absorbancia-concentración se produce cuando los picos del espectro tienden a fusionarse en uno, como queda recogido en la Fig. 36, donde se aprecia el abandono de la linealidad absorbancia-concentración a concentraciones de 5-fluorouracilo superiores a $4\cdot 10^{-4}$ M para pasar a un comportamiento que se ajusta más a una exponencial creciente de ecuación:

$$A = y_0 + A_1 \cdot e^{\left(\frac{-c}{t_1}\right)} \quad (70)$$

siendo A la absorbancia y c la concentración de la disolución; e y_0 , A_1 y t_1 , constantes cuyos valores son: 3.274 ± 0.025 ; -3.40 ± 0.08 y 0.00027 ± 0.00001 , respectivamente. A estas elevadas concentraciones, es evidente la imposibilidad de realizar una estimación fiable, mediante determinación espectrofotométrica, de la cantidad de fármaco en disolución ya que el rango de concentraciones posibles para un valor de absorbancia determinado es muy variable. Este comportamiento se acentúa aún más a concentraciones superiores a $7 \cdot 10^{-4}$ M. Por lo tanto, nuestro estudio de incorporación de 5-fluorouracilo por las nanopartículas poliméricas y compuestas quedará limitado a concentraciones no superiores a $4 \cdot 10^{-4}$ M.

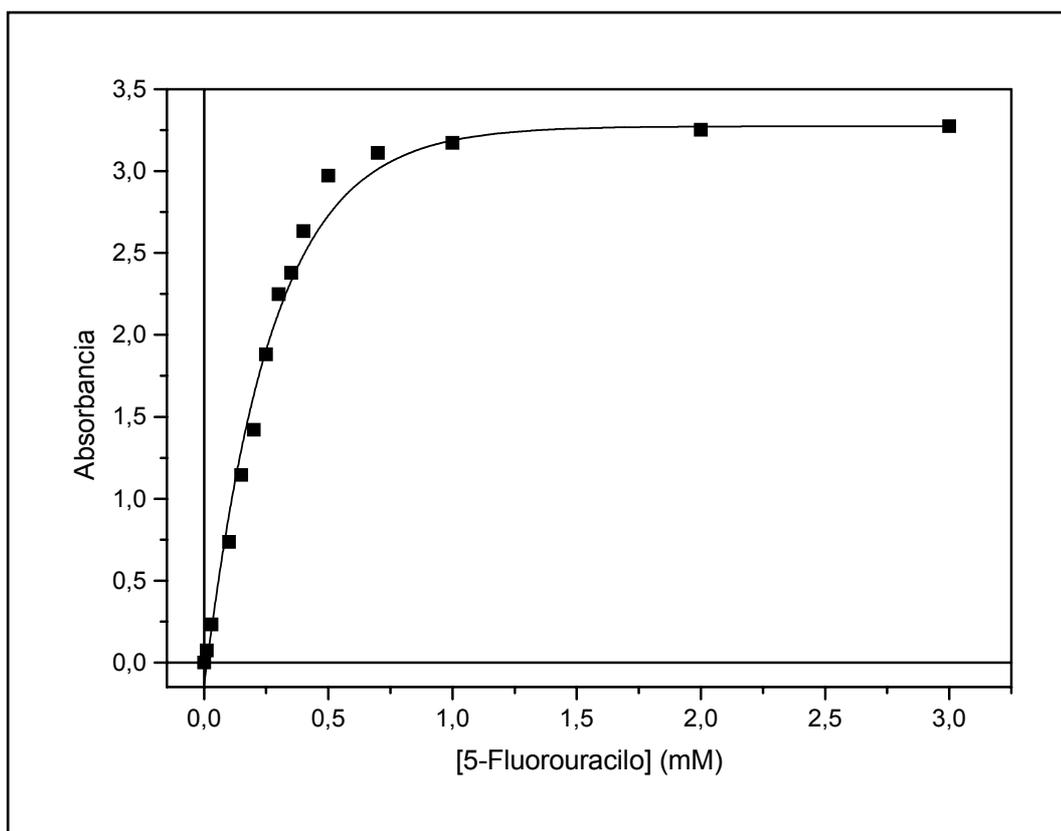


Fig. 36: Evolución de la linealidad absorbancia-concentración de las disoluciones de 5-fluorouracilo para la longitud de onda de máxima absorbancia (265 nm). La pérdida de la linealidad se produce para concentraciones superiores a $4 \cdot 10^{-4}$ M.

5.3.3. Influencia de la exposición a la luz ambiental.

Como ya se ha comentado, las disoluciones de 5-fluorouracilo son fotosensibles y deben conservarse protegidas de la luz. Esta protección ha demostrado ser eficaz, generando los mejores resultados de estabilidad de disoluciones de 50 mg/mL de 5-fluorouracilo conservadas a 21 °C. Así, se ha comprobado que se degrada menos de un 2 % del principio activo al cabo de 17 días, y un 18 % tras 30 días de almacenamiento. Además, disoluciones de menor concentración (10 mg/mL) almacenadas durante 7 días protegidas de la luz no han visto alterada la estabilidad del principio activo (214).

Nos propusimos determinar cómo puede llegar a afectar una exposición accidental a la luz (durante el proceso de preparación del medio de polimerización, la síntesis de las partículas y la manipulación posterior para la determinación del grado de adsorción y absorción de fármaco en estas) en la estabilidad de las disoluciones de 5-fluorouracilo. Para ello, preparamos bajo idénticas condiciones dos disoluciones de 5-fluorouracilo de concentración 10^{-4} M con una fuerza iónica $2 \cdot 10^{-3}$ M de HCl (pH = 2.4). Una vez preparadas, una de ellas fue expuesta a la luz ambiental y la otra fue protegida con papel de aluminio, y a intervalos de 30 minutos durante 6 horas se realizó la determinación del espectro de absorbancia de ambas disoluciones.

Los resultados obtenidos quedan recogidos en la Fig. 37, donde puede apreciarse una tendencia general al aumento en los valores de absorción en ambos picos respecto al espectro obtenido recién preparadas las disoluciones, observándose además una ligera deformación del pico que aparece a menor longitud de onda, que se mantiene en el tiempo. Es evidente que esta desviación, aunque escasa, es más marcada en la disolución expuesta a la luz ambiental [Fig. 37 (a)]. Esta pequeña desviación respecto a los valores iniciales puede inducir a error en los ensayos de incorporación de fármaco, por lo que realizaremos la caracterización espectrofotométrica de una pequeña cantidad del medio (protegido de la luz) extraída en el momento de realizar estas determinaciones. Además, la

comparación de esta muestra se realizará con otra del citado medio de polimerización extraída antes de realizar el ensayo y conservada en las mismas condiciones (protegida de la luz, a 25 °C).

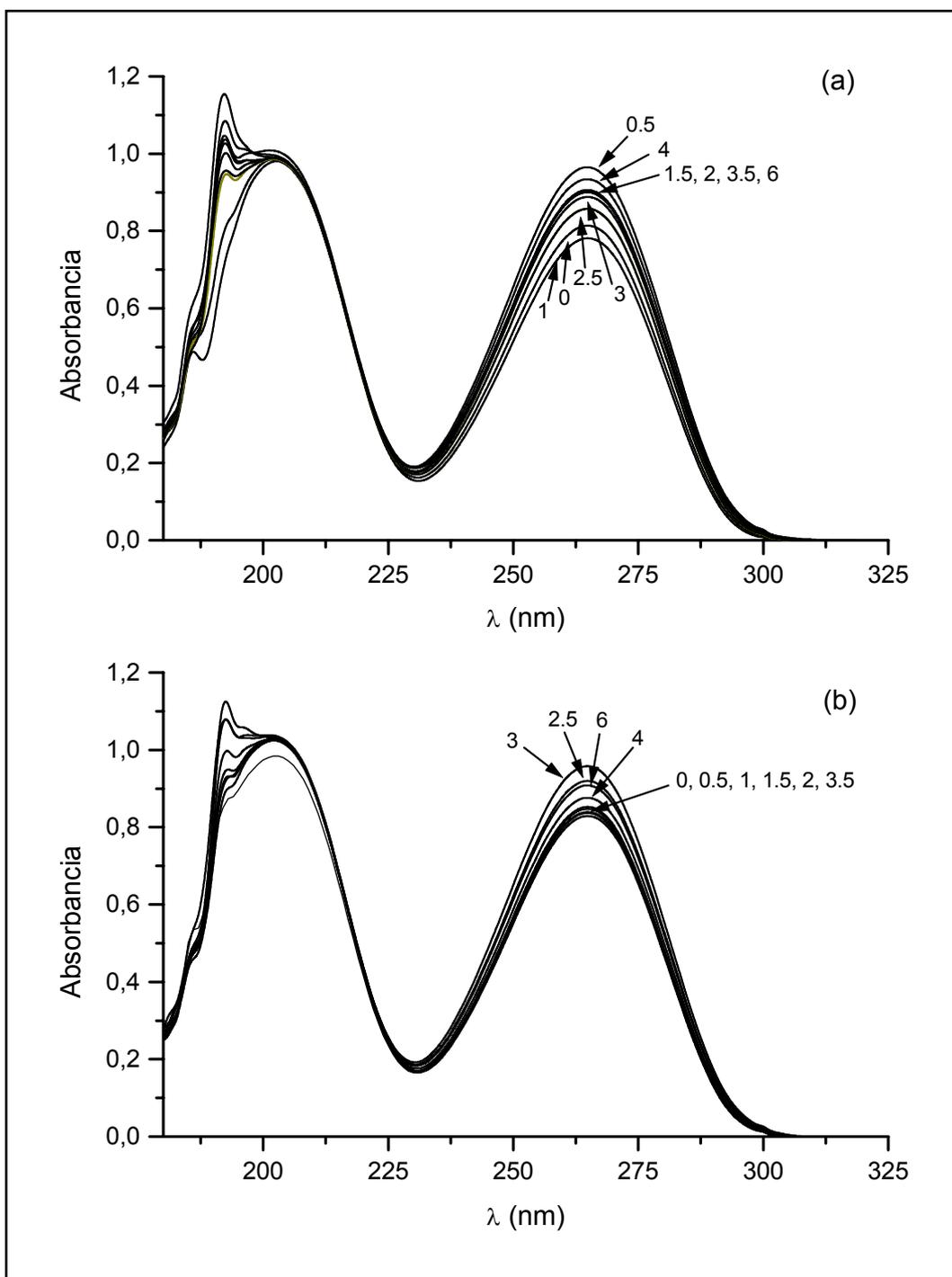


Fig. 37: Variación en función del tiempo (en horas) del espectro de absorción de una disolución 10^{-4} M de 5- fluorouracilo expuesta (a) y protegida (b) de la luz ambiental.

5.3.4. Influencia del pH del medio de polimerización.

a) Sobre la estabilidad del 5-fluorouracilo.

El comportamiento del antineoplásico 5-fluorouracilo según el pH del medio es otro de los aspectos ampliamente estudiados sobre este fármaco. Baste con señalar que el principal problema de la conservación de disoluciones de carácter básico de este principio activo en viales inyectables es la formación con el tiempo de fluoroacetaldehído y ácido fluoromalonaldehídico como productos de degradación. Como ya hemos mencionado, la metabolización *in vivo* del primero conduce a la formación del agente cardiotóxico fluoroacetato (209).

Esta susceptibilidad al pH del medio plantea la cuestión de si esta vulnerabilidad no se verá también reflejada en su comportamiento espectrofotométrico. Para clarificar esta posibilidad y poder validar el espectro del 5-fluorouracilo en toda la gama de pH ácido que utilizaremos en los ensayos de absorción, realizamos el estudio de la influencia de la concentración de hidrogeniones sobre el espectro de absorbancia y el coeficiente de absorción molar del anticancerígeno. Para ello, se preparó una batería de disoluciones de 5-fluorouracilo de concentración 10^{-4} M, según las condiciones de trabajo previamente establecidas y fijando una concentración creciente de HCl que nos permitiera obtener un pH desde 1 hasta 5.

Transcurridas 24 horas de su preparación, se procedió a la determinación del espectro de absorción de cada una de ellas, según la metodología ya descrita. El análisis de los espectros obtenidos (Fig. 38), pone de manifiesto la estabilidad de la disolución de 5-fluorouracilo en todo el rango de pH ácidos estudiados y nos revela la validez del coeficiente de absorción molar, para cualquiera de los valores de concentración de HCl investigados. Como puede apreciarse, es imposible distinguir los espectros obtenidos, para cada una de las concentraciones de H^+ , en la zona de longitud de onda de máxima absorción a 265 nm. Sin embargo, sí existe alteración del espectro del pico de menor longitud de onda, observándose

una deformación creciente de este al aumentar la concentración de HCl que achacamos exclusivamente al reflejo en el espectro del aumento de la concentración de electrolito, como explicaremos más adelante.

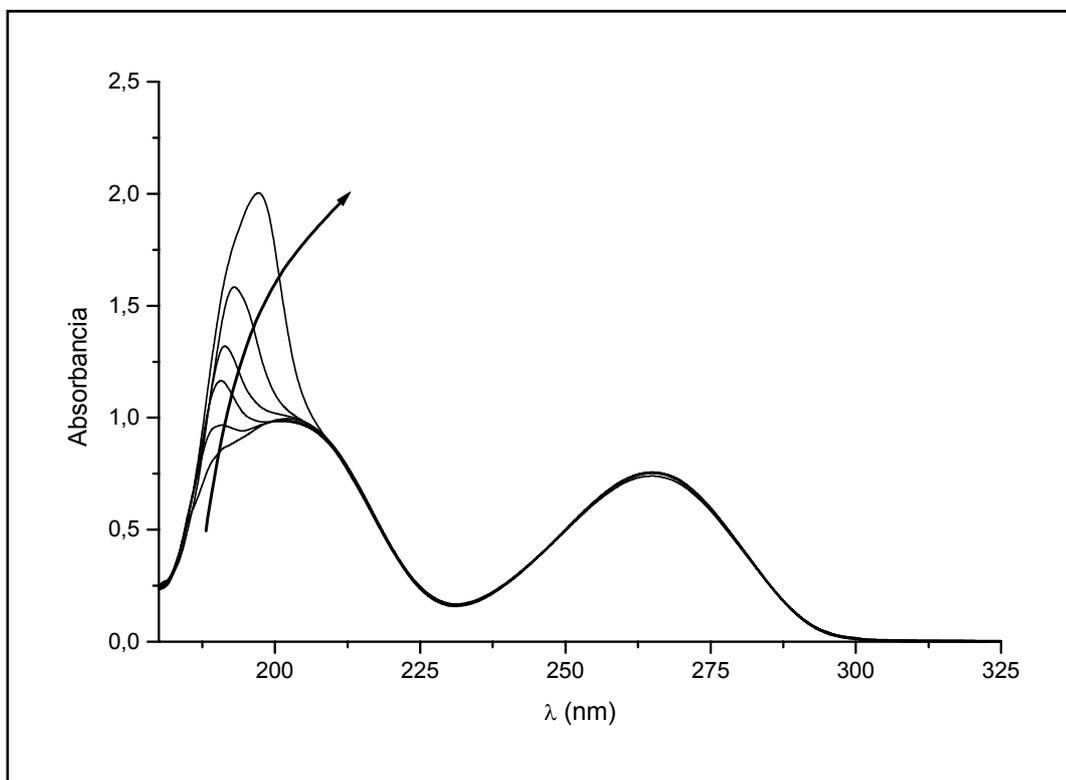


Fig. 38: Evolución del espectro de absorción del 5-fluorouracilo según la concentración molar de HCl (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , $2 \cdot 10^{-3}$, 10^{-4} y 10^{-5}). La flecha indica el sentido del aumento de la concentración de HCl.

Una vez confirmada la estabilidad del 5-fluorouracilo a pH ácido, estudiaremos qué ocurre si se somete a un pH básico elevado. Con esta finalidad se prepararon dos disoluciones de concentración 10^{-4} M de antineoplásico, una de ellas fijando una concentración $2 \cdot 10^{-3}$ M de HCl y otra fijando una concentración 1 N de KOH. Igual procedimiento se desarrolló empleando una concentración $4 \cdot 10^{-4}$ M del antineoplásico. En la Fig. 39 recogemos el resultado de la determinación del espectro de absorción de las disoluciones tras 24 horas de conservación, según las condiciones habituales. Puede apreciarse cómo en medio básico se produce la deformación general del espectro y el desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorbancia a valores superiores, desde los 265 nm

(pH ácido) a los 282 nm (pH básico). Esta situación es observable en las dos concentraciones del anticancerígeno utilizadas y, por lo tanto, extrapolable a todas las concentraciones de 5-fluorouracilo sometidas a un pH básico. El origen de esta deformación puede estar relacionado con la inestabilidad de este fármaco en medio básico, ya descrita por otros autores (209).

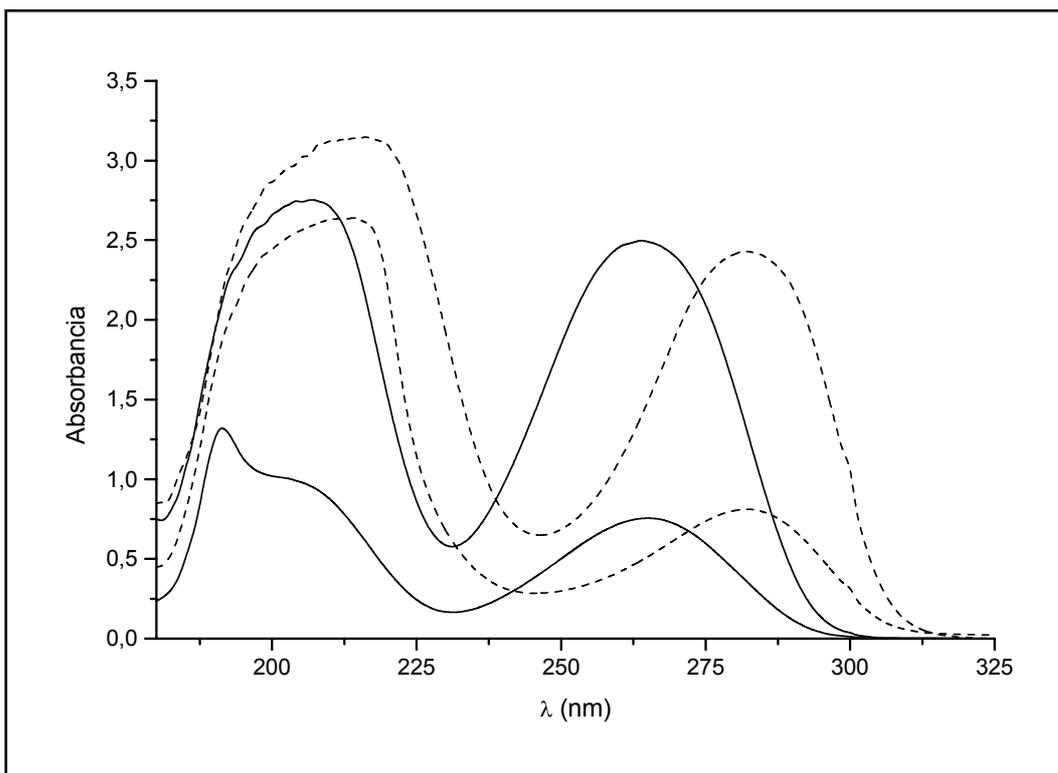


Fig. 39: Efecto del pH sobre el espectro de absorción del 5-fluorouracilo. Las concentraciones molares de 5-fluorouracilo en orden creciente de absorción son: 10^{-4} y $4 \cdot 10^{-4}$. Línea continua (-): HCl $2 \cdot 10^{-3}$ M; línea discontinua (---): KOH 1 N.

b) Sobre la estabilidad del poli(etil-2-cianoacrilato).

La estabilidad de las suspensiones de poli(etil-2-cianoacrilato) está seriamente condicionada por su naturaleza biodegradable. La degradación en presencia de agua de las nanopartículas poliméricas es un proceso bien conocido que se produce predominantemente a nivel superficial (82, 146), como

consecuencia de la escisión hidrolítica de una unión carbono-carbono de la *columna vertebral* polimérica, tras la adición de moléculas de agua.

La rotura del polímero *in vitro* se produce como consecuencia de la coexistencia de dos mecanismos de degradación que provocan la formación de fracciones hidrosolubles de bajo peso molecular (73, 82). Por un lado, el ataque inicial de los iones hidroxilo da lugar a la reacción reversible de Knövenagel con la formación de formaldehído (hidrólisis de las uniones carbono-carbono) y productos de degradación polimérica (cianoacetato, principalmente). La velocidad de degradación depende principalmente del pH del medio (un aumento de la concentración de hidroxilos incrementará la velocidad de degradación) y de la longitud de la cadena alquílica del monómero (a mayor longitud de ésta, mayor protección estérica); y en menor medida de la superficie polimérica, del tamaño de partícula y del peso molecular del polímero y su distribución. El otro mecanismo de degradación coexistente es una hidrólisis éster que provoca la generación de alcohol orgánico y restos ácidos hidrosolubles, entre los que destaca el ácido policianoacrílico [principal producto de la degradación de este tipo de polímeros (215)].

En cuanto a la degradación bajo condiciones fisiológicas, no se conoce hasta el momento un mecanismo comúnmente aceptado; pero se apunta sobre todo la combinación de la hidrólisis enzimática mediada por esterasas (generándose principalmente ácido policianoacrílico) con la retirada de oligómeros por proteínas mediante unión a puntos de alta afinidad (82, 206).

Con el objetivo de determinar cómo ve afectada su estabilidad el polímero bajo las condiciones de síntesis y almacenamiento, realizamos el estudio de la influencia de la concentración de iones hidroxilo en el medio sobre la velocidad de degradación. Para ello, evaluamos la evolución temporal de la apariencia de la suspensión, de la conductividad, de las propiedades espectrofotométricas y del pH de una suspensión de polímero a pH natural (en torno a 5) y otra a un pH = 9.4, fijado mediante un tampón H_3BO_3 -NaOH. Estas determinaciones se realizaron

una vez al día durante cuatro días. La preparación de 100 mL de la disolución tampón se realizó mezclando 50 mL de una disolución de H_3BO_3 10^{-1} M y KCl 10^{-1} M, 32.1 mL de una disolución NaOH 10^{-1} M y diluyendo hasta 100 mL con agua. Una vez preparadas ambas suspensiones y antes de cada determinación se aplicaron 3 minutos de ultrasonidos a las muestras, redispersando así los precipitados y coágulos de polímero que se generan en la suspensión.

En la Fig. 40 se recogen los espectros de las suspensiones de polímero a pH natural y a pH 9.4. La Tabla 8 resume las otras propiedades fisicoquímicas determinadas. De forma general, la absorbancia de las suspensiones de poli(etil-2-cianoacrilato) aumenta al decrecer la longitud de onda, alcanzando un máximo en la región del ultravioleta que no desaparece en lo que resta de espectro. Las suspensiones empleadas a estos pH no presentan igual concentración (en torno a 9 mg/mL para la suspensión de pH = 9.4, frente a unos 0.9 mg/mL de la suspensión de pH natural), hecho que puede observarse por la diferencia en el espectro de ambas suspensiones recién preparadas ($t = 0$ h.). La mayor concentración de la suspensión de pH = 9.4 le hace presentar una saturación (absorbancia igual a 5) en la determinación espectrofotométrica a una longitud de onda mayor que la suspensión de pH natural. Lo mismo ocurre con la conductividad de las dos suspensiones, para la suspensión de pH = 9.4 la conductividad inicial es de 6.95 mS/cm, mucho mayor que la de la suspensión de pH natural ($2.4 \mu\text{S/cm}$) debido a la presencia de los iones aportados por la disolución tampón.

Tabla 8: Evolución temporal (horas) de las propiedades fisicoquímicas [conductividad (C en $\mu\text{S/cm}$), pH y apariencia (A: blanco -b- y transparente -t-)] de las suspensiones de poli(etil-2-cianoacrilato) a pH = 5 y pH = 9.4.

pH = 5					pH = 9.4				
	0 h.	24 h.	48 h.	72 h.		0 h.	24 h.	48 h.	72 h.
C	2.4	4.6	6.2	10.4	C	6900	6900	7100	7100
pH	4.8	4.1	3.7	3.3	pH	9.4	8.8	8.7	8.6
A	b	b	b	b	A	b	t (precipitado b)	t	t

A pH natural no existe una alteración apreciable visualmente en el aspecto blanquecino de la suspensión de polímero durante la duración del estudio (Tabla 8). Sin embargo, los datos espectrofotométricos (ligera tendencia a la baja en los valores de absorbancia) y de evolución del pH [descenso del pH hasta 3.3 en el cuarto día como consecuencia de la formación de ácido policianoacrílico hidrosoluble (206)], hacen intuir una lenta degradación polimérica. Los datos de evolución de la conductividad apoyan este hecho, ya que esta aumenta en un 350 % tras tres días. La lentitud de este proceso a pH ácido ya fue puesta de manifiesto en el capítulo de propiedades eléctricas superficiales, donde se realizó un estudio electrocinético de la estabilidad del recubrimiento de las partículas compuestas (Fig. 29).

En cuanto a la suspensión de pH básico, la existencia en el medio de una mayor concentración de grupos hidroxilo da lugar a una degradación más rápida. Esto queda patente por un descenso muy marcado de los valores de absorbancia [Fig. 40 (b)], en el tercer día de observación, generándose un espectro de absorción totalmente diferente al original, con la presencia de dos picos en la región ultravioleta (uno de ellos en torno a los 260 nm). La apariencia visual de la suspensión también sufre una evolución muy marcada (Tabla 8), ya que al segundo día de observación prácticamente toda la suspensión es transparente con una leve tonalidad blanquecina, a excepción de unos pequeños coágulos de polímero fácilmente redispersables mediante ultrasonidos y que son los responsables de la saturación en la región ultravioleta del espectro de absorción. La existencia de estos restos poliméricos sin degradar puede atribuirse a la ausencia de agitación de las suspensiones durante el estudio, lo que provoca la precipitación por gravedad de una fracción polimérica que queda protegida, al menos en su región no expuesta al medio, de la acción de los iones hidroxilo. A partir del tercer día la suspensión es totalmente transparente de lo que se deduce que se ha producido la degradación total del polímero y el nuevo espectro de absorción generado corresponde a los productos de degradación. A pesar de encontrarse la suspensión tamponada a pH = 9.4 se produce un ligero y paulatino descenso de este hasta 8.6 en el cuarto día de observación, como consecuencia de

la marcada generación de ácido policianoacrílico por la rápida degradación, ante la que el tampón es incapaz de mantener el pH original. Además, la presencia de los productos de degradación del polímero provoca igualmente un aumento gradual de la conductividad (del 3 % en el cuarto día).

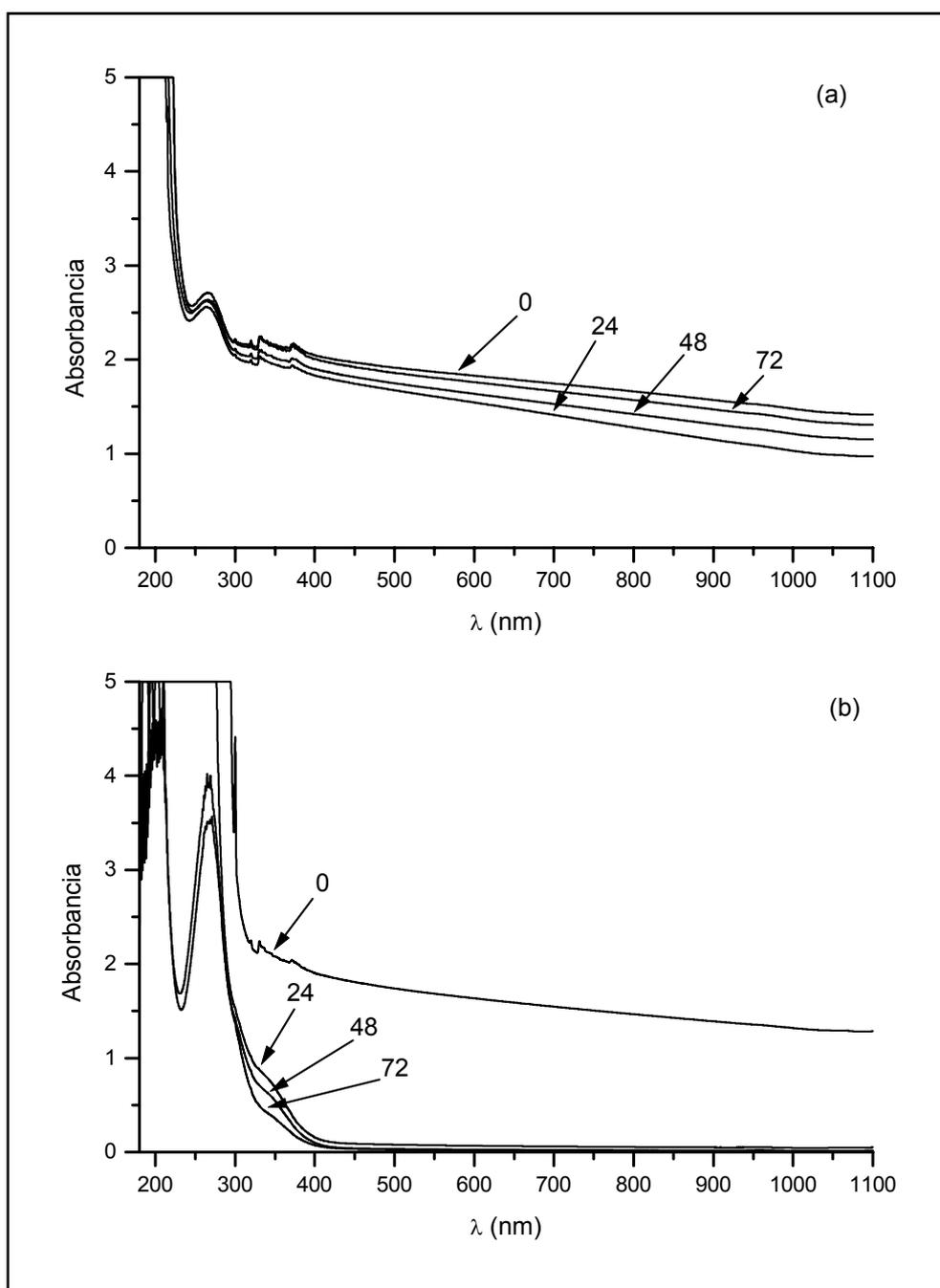


Fig. 40: Evolución temporal (en horas) del espectro de absorción de una suspensión de poli(etil-2-cianoacrilato) a pH = 5 (a) y a pH = 9.4 (b).

Con objeto de estudiar la degradación del polímero en condiciones extremas de concentración de iones hidroxilo, se preparó una suspensión de concentración 2 mg/mL de polímero seco en 10 mL de KOH 1N. Una vez preparada esta suspensión, se sometió a agitación mediante ultrasonidos durante 5 minutos, observándose que tras este tiempo no quedaba ningún resto de polímero seco en suspensión. Este comportamiento contrasta con el de una suspensión de igual concentración en 10 mL de agua Milli-Q, en la que se observaban partículas poliméricas secas en suspensión tras los 5 minutos de ultrasonidos.

En cuanto a la evolución temporal de la apariencia y de las propiedades espectrofotométricas de la suspensión de concentración 1N de KOH, las medidas se realizaron justo al finalizar la preparación de la suspensión, a la media hora y a las 24 horas. Es destacable cómo a los 5 minutos de preparar la suspensión aparece una coloración amarillenta que adquiere una mayor intensidad con el paso del tiempo, hasta que a las 24 horas se observa una coloración anaranjada intensa. Este comportamiento se ve confirmado por los datos espectrofotométricos (Fig. 41) ya que, como puede apreciarse, existe absorción en la región del visible tras media hora de la preparación de la suspensión, la cual adquiere mayor intensidad transcurridas 24 horas. Además, a la media hora de la preparación de la suspensión aparece un pico de máxima absorción en torno a los 260 nm, ya observado en nuestro primer experimento.

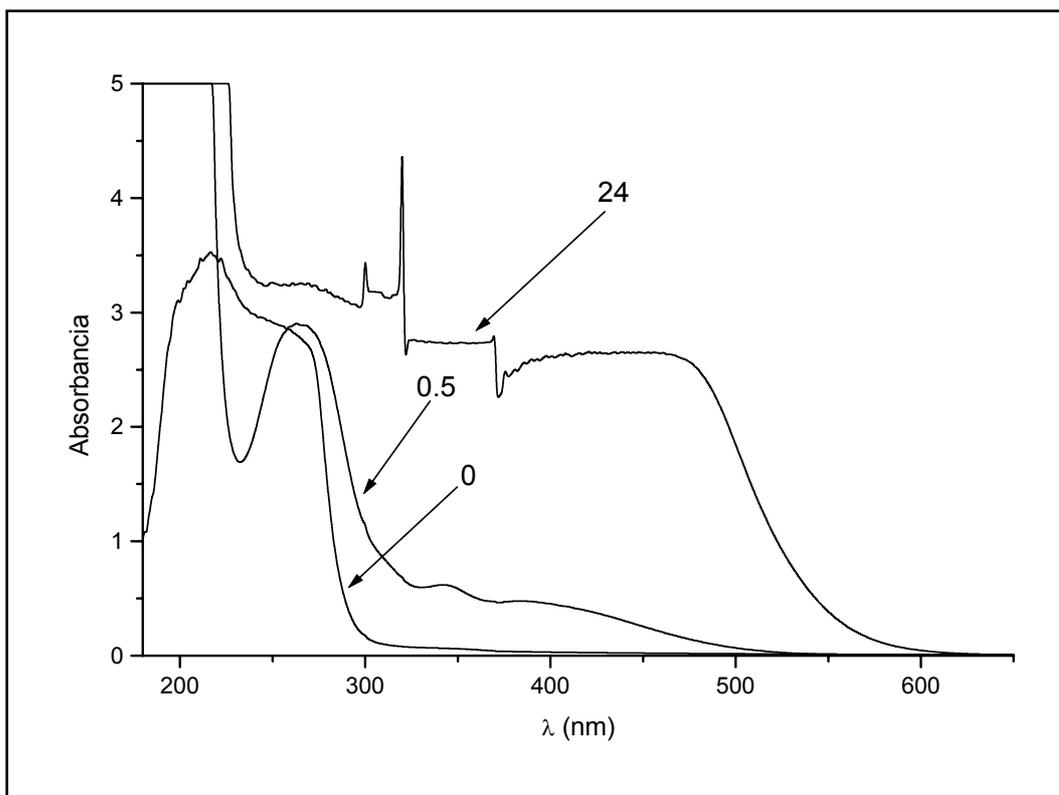


Fig. 41: Evolución temporal (en horas) del espectro de absorción de una suspensión KOH 1 N de poli(etil-2-cianoacrilato).

Para completar nuestro estudio desarrollamos una estimación preliminar del comportamiento del material bajo condiciones fisiológicas (37 °C y pH = 7.4). De esta manera se realizó el estudio de la evolución temporal de la apariencia de la suspensión, de la conductividad, de las propiedades espectrofotométricas y del pH de una suspensión de polímero a pH = 7.4, fijado mediante un tampón NaOH-KH₂PO₄. Estas determinaciones se realizaron cada 30 minutos durante las primeras 2 horas y cada hora durante las siguientes 2 horas, para pasar a una vez al día durante los 4 días que duró el estudio. La preparación de 250 mL de la disolución tampón se realizó mezclando 125 mL de una disolución de KH₂PO₄ 10⁻¹ M, 97.75 mL de una disolución NaOH 10⁻¹ M y diluyendo hasta 250 mL con agua. A 100 mL de esta disolución tampón se le adicionaron 50 mL de una suspensión de polímero de conductividad inferior a 5 μS/cm, para obtener 150 mL de una suspensión con una concentración de 1.2 mg/mL y una conductividad de

5.9 mS/cm. El incremento en el valor de la conductividad de la suspensión es atribuible a los iones aportados por la disolución tampón. Esta suspensión fue sometida a agitación mecánica (500 rpm) y a una temperatura de 37 °C durante todo el estudio. A los intervalos señalados se tomó cantidad suficiente del medio para realizar la determinación espectrofotométrica, muestra que fue reemplazada con un volumen equivalente de disolución tampón para evitar la saturación del sistema. Con el fin de eliminar cualquier resto insoluble, las muestras fueron sometidas a una centrifugación a 17000 rpm durante 25 minutos, obteniendo un sobrenadante que fue sometido al mismo proceso durante 10 minutos antes de proceder a su análisis espectrofotométrico.

En la Fig. 42 se recogen los espectros de los sobrenadantes de la suspensión de polímero a pH 7.4. La Tabla 9 resume el resto de propiedades fisicoquímicas determinadas. Tras la primera media hora, el espectro sufre un cambio drástico en su forma continua con la aparición de 2 picos. De forma general, la absorbancia de los sobrenadantes de la suspensión de poli(etil-2-cianoacrilato) aumenta durante las primeras 4 horas de exposición de las nanopartículas poliméricas a los iones hidroxilo. A las 24 horas del estudio se observa una evolución drástica en el espectro de los sobrenadantes, ya que se ha producido una deformación de este hacia longitudes de onda superiores, muy evidente en el pico que aparece a mayor longitud de onda (en torno a los 250 nm), ya que se desplaza hasta los 260 nm. La reducción de la intensidad del espectro observada a partir de este momento es consecuencia de la dilución de los productos de degradación polimérica al añadir nuevas cantidades de disolución tampón. Es destacable que nuevamente nos encontramos con el pico de máxima absorción a 260 nm, una vez que se ha producido la destrucción total del polímero y que atribuimos a los productos de su degradación.

Por otro lado, transcurridas las primeras 24 horas y en el momento de cada una de las medidas restantes se observa una reducción del volumen de la suspensión, lo que nos hace pensar en la evaporación de una pequeña cantidad del medio como consecuencia de la temperatura a la que está siendo sometido

(37 °C). Esto hace que el efecto de dilución sea mayor al añadir volumen suficiente de tampón para recobrar los 150 ml del medio de degradación. Estas reposiciones con disolución tampón provocan que no se aprecie una reducción marcada del pH de la suspensión, al diluirse el ácido policianoacrílico generado en la degradación polimérica, e incluso al final del estudio se recuperan prácticamente los valores iniciales de pH. Esto es debido a la adición de 50 mL de disolución tampón por la evaporación excesiva producida entre el segundo y tercer día.

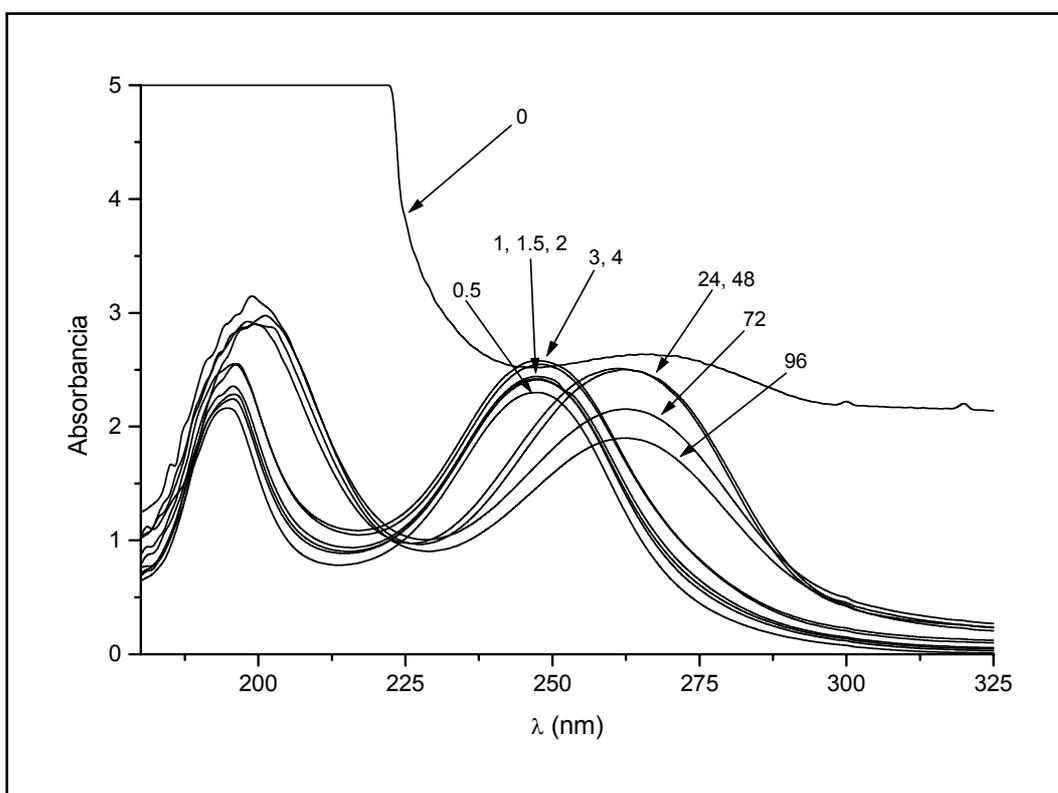


Fig. 42: Evolución temporal (en horas) del espectro de absorción de los sobrenadantes de una suspensión de poli(etil-2-cianoacrilato) a pH = 7.4.

Tabla 9: Evolución temporal (horas) de las propiedades fisicoquímicas [conductividad (C en mS/cm), pH y apariencia (A: blanco -b-, presencia de macroagregados -m- y transparente -t-)] de una suspensión de poli(etil-2-cianoacrilato) a pH = 7.4.

	0.5 h.	1 h.	1.5 h.	2 h.	3 h.	4 h.	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.
C	5.9	6.1	6.2	6.4	6.9	7	7.7	8.4	8.7	8.8
pH	7.4	7.4	7.4	7.3	7.3	7.2	6.9	6.8	7.2	7.2
A	b	m	m	m	m	m	t	t	t	t

En cuanto al aspecto de la suspensión, al detener la agitación del sistema, en las primeras 4 horas se observa la transformación de la suspensión de aspecto lechoso y uniforme en una suspensión de macroagregados poliméricos que tienden a huir hacia la superficie del medio. Esta disposición en macroagregados y su desplazamiento hacia la parte superficial del medio, puede atribuirse a un mecanismo de protección desarrollado por el polímero para reducir en lo posible la acción de los iones hidroxilo. Sin embargo, a las 24 horas del ensayo el aspecto de la suspensión cambia drásticamente al de una disolución de aspecto prácticamente transparente con una ligera tonalidad blanquecina-amarillenta, como consecuencia de la degradación total del polímero. Este aspecto se mantiene hasta el final del estudio y es atribuible a los productos de degradación del polímero. Además, sólo en la primera centrifugación se observa la aparición de un precipitado blanco. La evolución temporal de los valores de conductividad, con un incremento del 50 % al final del estudio, confirma este proceso.

De los tres estudios realizados podemos concluir que la estabilidad de las nanopartículas poliméricas se ve seriamente comprometida por la concentración de iones hidroxilo presentes en el medio. Este hecho se pone de manifiesto en un aumento de la velocidad de degradación con la concentración de este ion. El desarrollo de este proceso queda perfectamente caracterizado mediante la descripción de la evolución temporal de la apariencia, de la conductividad, de las propiedades espectrofotométricas y del pH de las suspensiones de poli(etil-2-cianoacrilato).

5.3.5. Justificación de la metodología de determinación de la incorporación de fármaco.

La determinación de la cantidad de 5-fluorouracilo incorporado por nuestros materiales se encuentra limitada por las técnicas instrumentales que tenemos a nuestra disposición. La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) es la técnica más utilizada para la cuantificación de la incorporación y liberación de cualquier principio activo ensayado con los miembros de la familia de los poli(alquilmcianoacrilatos), incluido este antineoplásico (216, 217). Sin embargo, no hemos tenido acceso a esta técnica para la realización de nuestro estudio. Por lo tanto, nos hemos basado en la metodología seguida por otros autores para la determinación de la cantidad de fármaco incorporado por nanopartículas de esta familia (218, 219). Esta metodología esta basada en la aplicación de la ley de Beer a un medio que contenga más de una clase de sustancias absorbentes. Como ya se ha descrito en la Ec. 69, la absorbancia total para un sistema multicomponente viene dada por la suma de las absorbancias de cada una de las especies, siempre que no exista interacción entre estas. De esta manera, se acepta la contribución de cada una de las sustancias presentes en el medio donde se ha producido la polimerización a la absorbancia total del sistema. En nuestro caso, podemos citar como sustancias susceptibles de contribuir a esta absorción total el propio fármaco no incorporado por las nanopartículas, los residuos de la polimerización del monómero (fracciones de monómero que no han polimerizado, restos de oligómeros y de productos de degradación) y los restos de otros componentes del medio (HCl, responsable del pH del medio, y dextrano-70, agente estabilizador de la polimerización). Por lo tanto, podría estimarse la cantidad de fármaco que no ha sido atrapado por las nanopartículas restando a la absorción total del sistema, la correspondiente al resto de sustancias presentes (residuos de la polimerización del monómero y restos de otros componentes del medio). Y, por diferencia entre la concentración inicial y final del antineoplásico en el medio, conoceremos la cantidad total incorporada por nuestros materiales.

En este apartado no justificaremos la contribución de ninguno de estos factores en la incorporación de fármaco por nuestros sistemas, ni fundamentaremos las condiciones óptimas para incrementar la eficacia de la síntesis (como el agente estabilizador dextrano-70). Simplemente, justificaremos la metodología de determinación de la incorporación de 5-fluorouracilo por nuestras nanopartículas mediante el análisis, por separado, de la contribución de cada una de las sustancias que constituyen este sistema multicomponente a la absorbancia final detectada en nuestros ensayos. Para ello, desarrollaremos la síntesis de las nanopartículas modificando la concentración de monómero (etil-2-cianoacrilato), de HCl y de dextrano-70.

En la investigación de la influencia de la concentración de etil-2-cianoacrilato, se realizaron 4 síntesis adicionando una concentración creciente de monómero [1, 2, 3 y 4 % (p/v)] de forma progresiva y bajo agitación mecánica (1000 rpm), en 50 mL de un medio de polimerización $2 \cdot 10^{-3}$ N de HCl, con un 0.5 % (p/v) de dextrano-70. Una vez lograda la polimerización del monómero (3 horas), se procedió a la neutralización del medio con cantidad suficiente de KOH para asegurar el final de la polimerización. De igual forma, se realizaron estas síntesis con la presencia en el medio de polimerización de 5-fluorouracilo 10^{-4} M. La suspensión de aspecto lechoso obtenida de esta forma fue sometida a una centrifugación a 17000 rpm durante 25 minutos, obteniéndose un sobrenadante que fue sometido a su vez a una centrifugación a 17000 rpm durante 10 minutos. De esta manera, se obtuvo un sobrenadante en las mismas condiciones que las utilizadas en las determinaciones de incorporación de fármaco. En la Fig. 43 se recogen los espectros de absorción del sobrenadante del medio de polimerización de las síntesis, con y sin 5-fluorouracilo, para las concentraciones de etil-2-cianoacrilato fijadas. Como puede observarse en la Fig. 43 (a), los residuos de la polimerización del monómero generan una señal de absorción en el espectro, la cual crece con la concentración de etil-2-cianoacrilato empleada. De aquí se deduce que al aumentar la cantidad de monómero añadida al medio, no sólo se acrecentará la cantidad de polímero obtenido sino que también se generarán residuos de la síntesis en mayor cuantía. Además, si comparamos el espectro de

una disolución 10^{-4} M de 5-fluorouracilo con los obtenidos en las síntesis con fármaco en el medio empleando diferente concentración de monómero [Fig. 43 (b)], apreciaremos cómo la absorción desarrollada por los residuos deforma el espectro del fármaco no incorporado por las nanopartículas. Esta deformación aumenta con la concentración de monómero utilizada, por llevar asociada una mayor producción de residuos de síntesis.

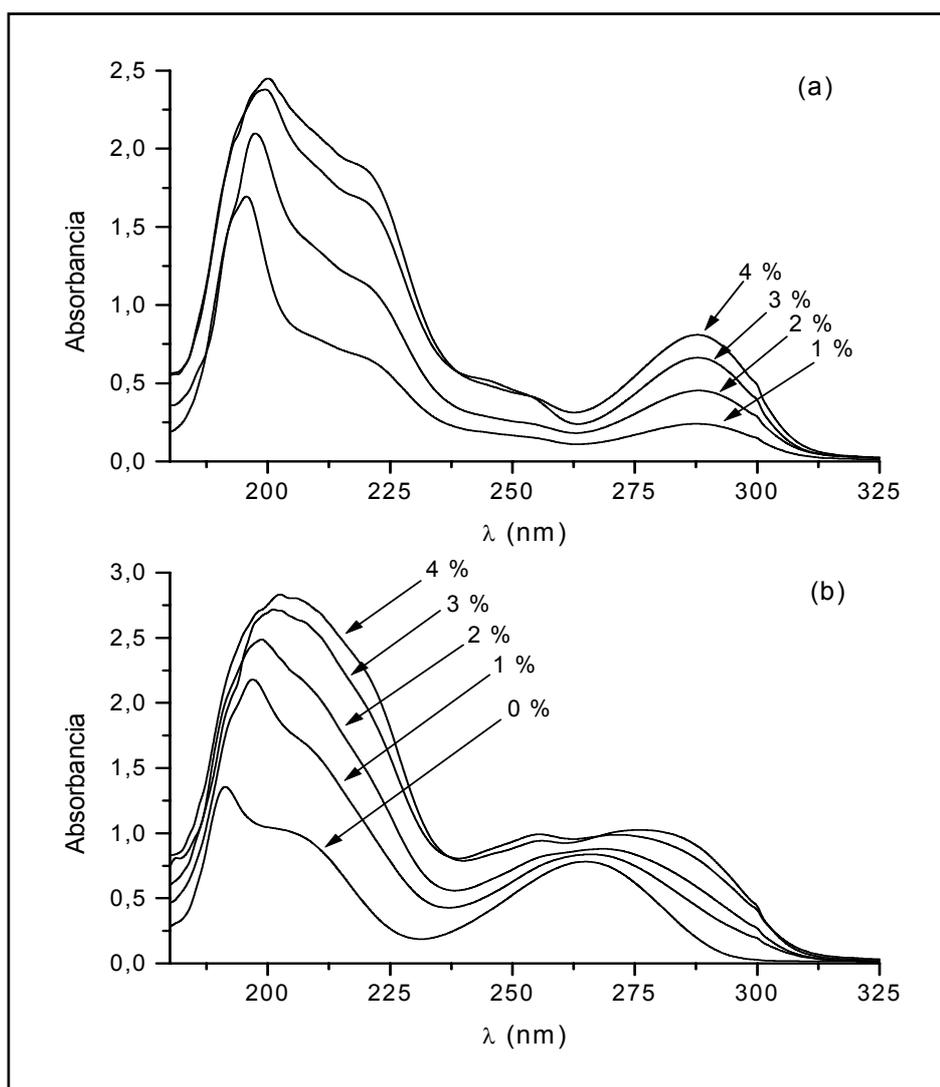


Fig. 43: Espectro de absorción de los sobrenadantes de la síntesis de poli(etil-2-cianoacrilato) empleando concentraciones crecientes de monómero [1, 2, 3 y 4 % (p/v)], en ausencia (a) y en presencia (b) de 5-fluorouracilo 10^{-4} M, para una concentración del 0.5 % (p/v) de dextrano-70. En (b), el espectro marcado como 0 % corresponde a la disolución de fármaco.

Otro aspecto que puede influir en el espectro del 5-fluorouracilo no incorporado por nuestros materiales, es la concentración de HCl presente en el medio de polimerización. Con el fin de analizar esta posibilidad estudiamos los espectros de las disoluciones correspondientes a los medios de polimerización preparados con y sin el antineoplásico. Se prepararon 50 mL de una serie de disoluciones 0.5 % (p/v) de dextrano-70 con una concentración fijada de HCl (10^{-1} , 10^{-2} , $2 \cdot 10^{-3}$, 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} M) y otra serie de disoluciones de iguales características, pero con una concentración 10^{-4} M de 5-fluorouracilo. Los espectros obtenidos tras la determinación después de 24 horas de almacenamiento, bajo protección de la luz ambiental, se recogen en la Fig. 44. Puede apreciarse en la Fig. 44 (a) un pico por debajo de los 200 nm que crece con la concentración de HCl y que deforma, en el caso de las disoluciones de fármaco [Fig. 44 (b)], el pico a menor longitud de onda del espectro propio del 5-fluorouracilo, de forma proporcional a la concentración de HCl.

Para comprobar el peso de estos espectros en los correspondientes a los medios de síntesis, seguimos la metodología experimental descrita en el análisis anterior de la influencia de la concentración de monómero, fijando una concentración de etil-2-cianoacrilato adicionado del 1 % (p/v) y utilizando las mismas concentraciones de HCl y dextrano-70 que en el experimento anterior. En la Fig. 45 aparecen los espectros de absorción del sobrenadante del medio de polimerización de las síntesis con y sin 5-fluorouracilo, para diferentes concentraciones de HCl. Como puede apreciarse en la Fig. 45 (a), la intensidad del espectro desarrollado por los residuos de la polimerización aumenta con la concentración de HCl presente en el medio. Asimismo, la magnitud de la deformación inducida por los residuos de la polimerización sobre el espectro del 5-fluorouracilo no incorporado por las nanosferas [Fig. 45 (b)], aumenta con la concentración de HCl presente en el medio.

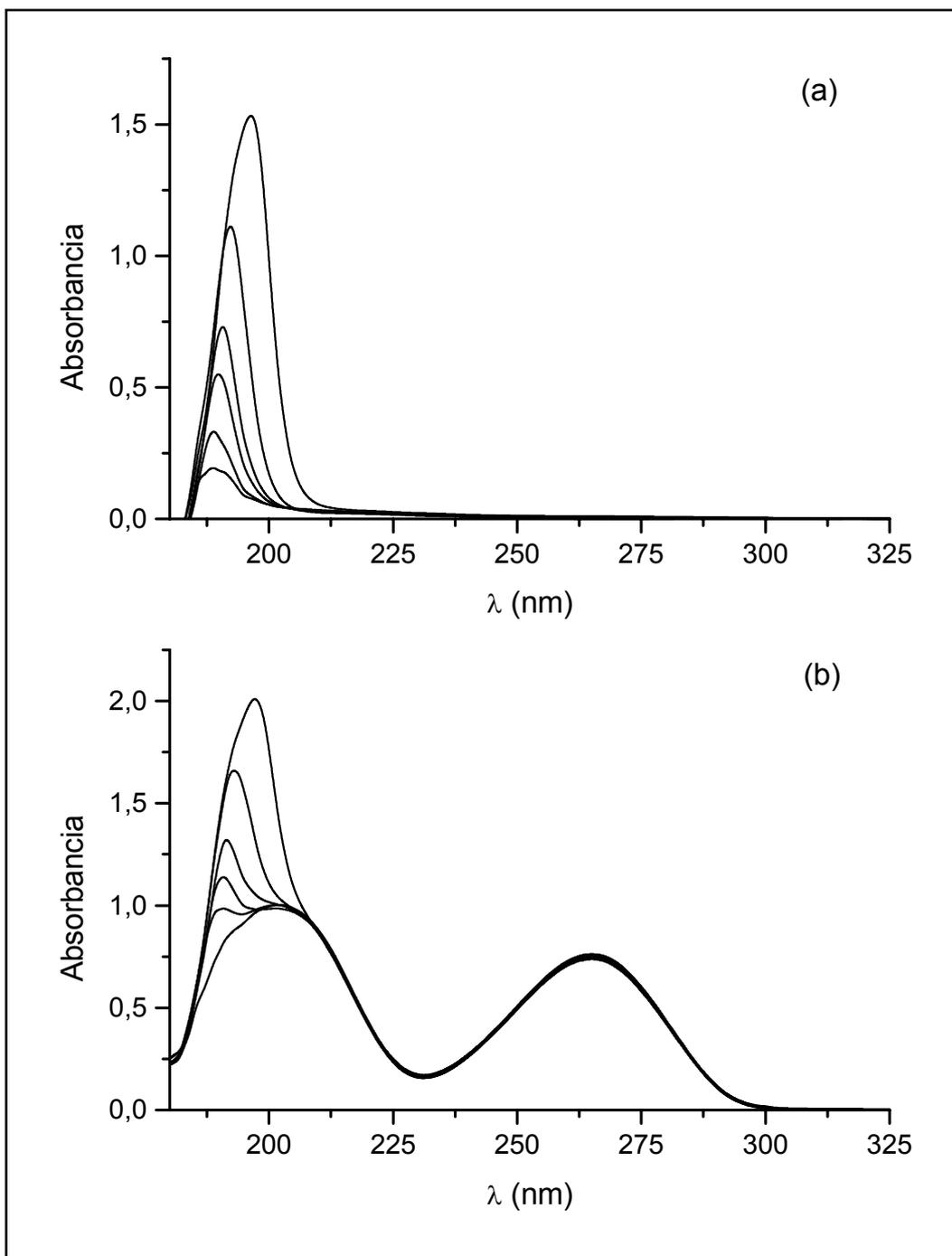


Fig. 44: Espectro de absorción ultravioleta-visible de disoluciones de HCl con una concentración 0.5 % (p/v) de dextrano-70, en ausencia (a) y en presencia (b) de 5-fluorouracilo 10^{-4} M. Las concentraciones molares de HCl en orden creciente de absorbancia son 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , $2 \cdot 10^{-3}$, 10^{-2} y 10^{-1} .

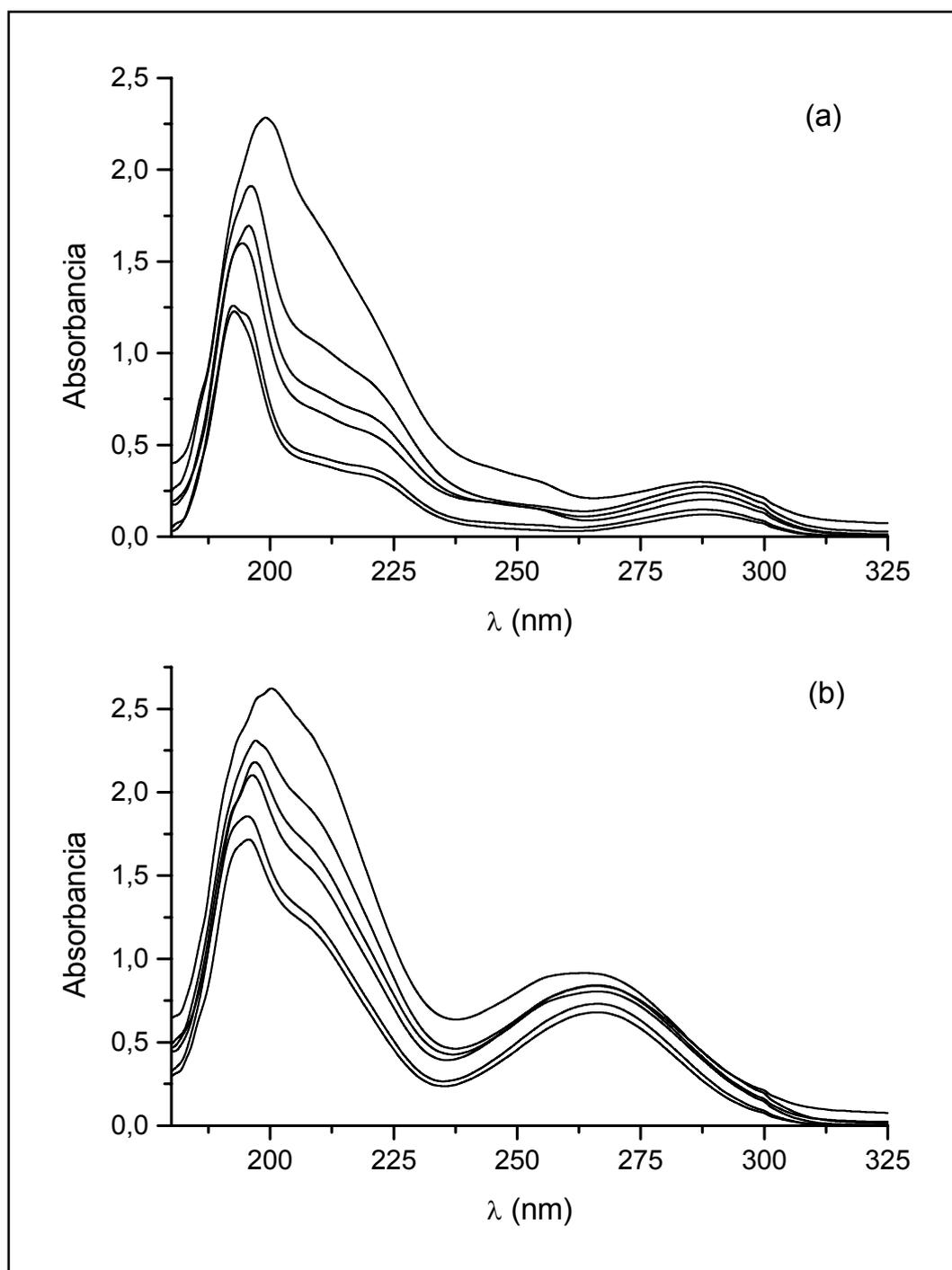


Fig. 45: Espectro de absorción de los sobrenadantes de la síntesis de poli(etil-2-cianoacrilato) empleando concentraciones crecientes de HCl, en ausencia (a) y en presencia (b) de 5-fluorouracilo 10^{-4} M, para una concentración 0.5 % (p/v) de dextrano-70. Las concentraciones molares de HCl utilizadas en orden creciente de absorbancia son 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , $2 \cdot 10^{-3}$, 10^{-2} y 10^{-1} .

Para finalizar, analizaremos la influencia del dextrano-70 en el espectro del 5-fluorouracilo no incorporado por nuestros materiales. Estudiamos en primer lugar qué papel desarrolla este agente estabilizador sobre la absorbancia del medio antes de adicionar el monómero. Siguiendo el procedimiento de preparación de los medios con diferente concentración de HCl, se procedió a elaborar disoluciones $2 \cdot 10^{-3}$ M de HCl con una concentración fijada de dextrano-70 [0, 0.5, 1 y 2 % (p/v)] y otra serie de disoluciones iguales pero con una concentración 10^{-4} M de 5-fluorouracilo. En la Fig. 46 se recogen los espectros obtenidos después de 24 horas de almacenamiento bajo protección de la luz ambiental. Puede apreciarse cómo el espectro propio de una disolución $2 \cdot 10^{-3}$ M de HCl ve incrementada su intensidad con la concentración de dextrano-70 [Fig. 46 (a)]. Este efecto también se refleja en la intensidad de la deformación, ejercida por una concentración $2 \cdot 10^{-3}$ M de HCl, sobre el espectro de una disolución 10^{-4} M del antineoplásico. Como puede apreciarse en la Fig. 46 (b), se confirma el incremento de la intensidad de la deformación del espectro del antineoplásico a una concentración $2 \cdot 10^{-3}$ M de HCl. Este aumento es proporcional a la concentración de dextrano-70 y se acusa principalmente en el pico situado a menor longitud de onda.

Al igual que ocurre en el estudio de la influencia de la concentración de HCl, debe existir, en los sobrenadantes de la síntesis de polímero, una correspondencia con lo observado en los medios de polimerización. La Fig. 47 recoge los espectros de absorción de los sobrenadantes de las síntesis con y sin 5-fluorouracilo, para distintas concentraciones de dextrano-70. Al incrementar la concentración del agente estabilizador en el medio de polimerización, crece la intensidad del espectro de absorción de los residuos de la polimerización del monómero [Fig. 47 (a)]. Este fenómeno se extiende a la deformación del espectro del 5-fluorouracilo no incorporado por las nanosferas. La intensidad de la deformación, debida a los residuos generados en la síntesis [Fig. 47 (b)], aumenta con la concentración de dextrano-70 utilizada.

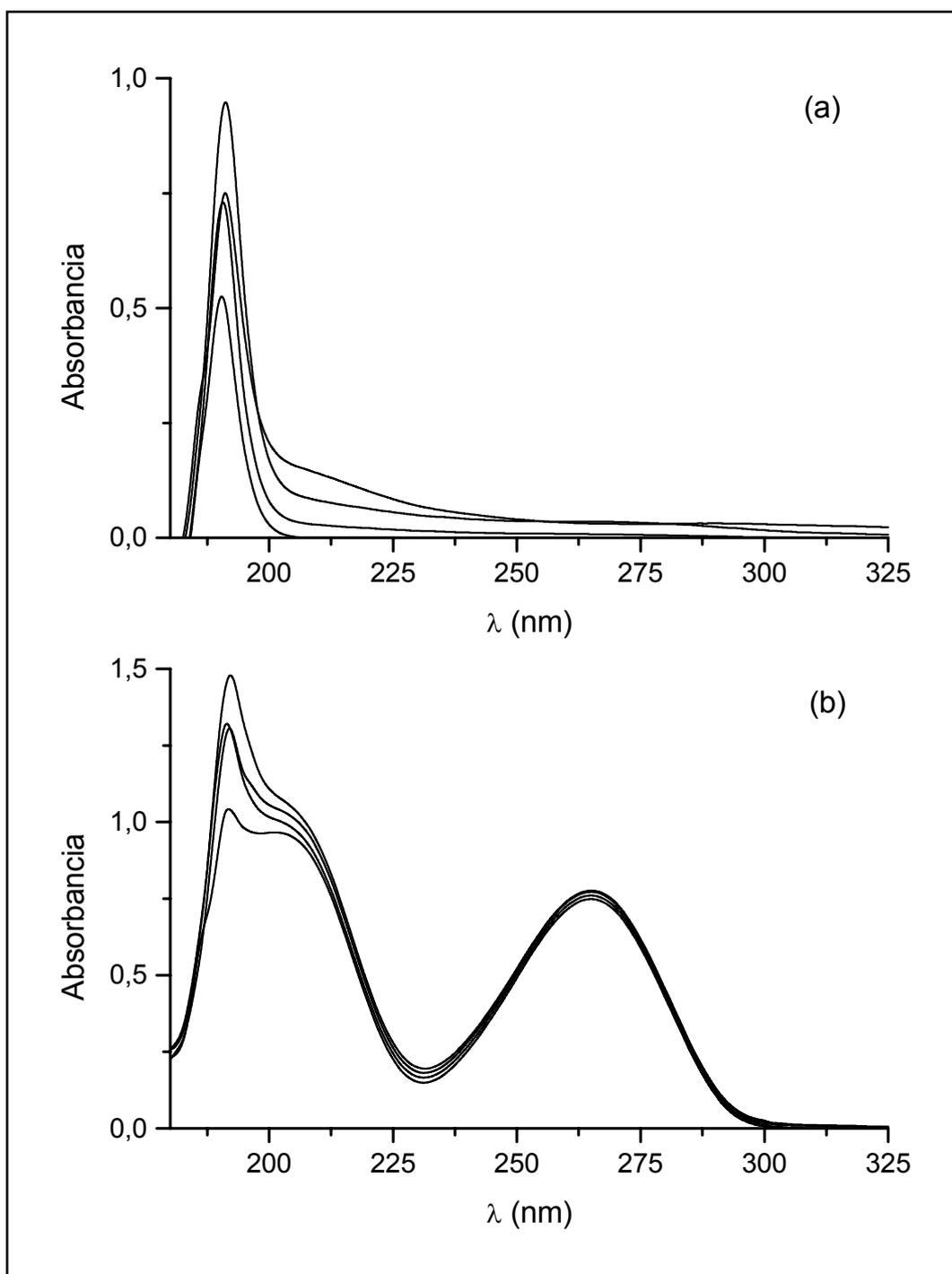


Fig. 46: Espectro de absorción de disoluciones $2 \cdot 10^{-3}$ M de HCl de dextrano-70, en ausencia (a) y en presencia (b) de 5-fluorouracilo 10^{-4} M. Las concentraciones [% (p/v)] de dextrano-70 en orden creciente de absorbancia son 0, 0.5, 1 y 2.

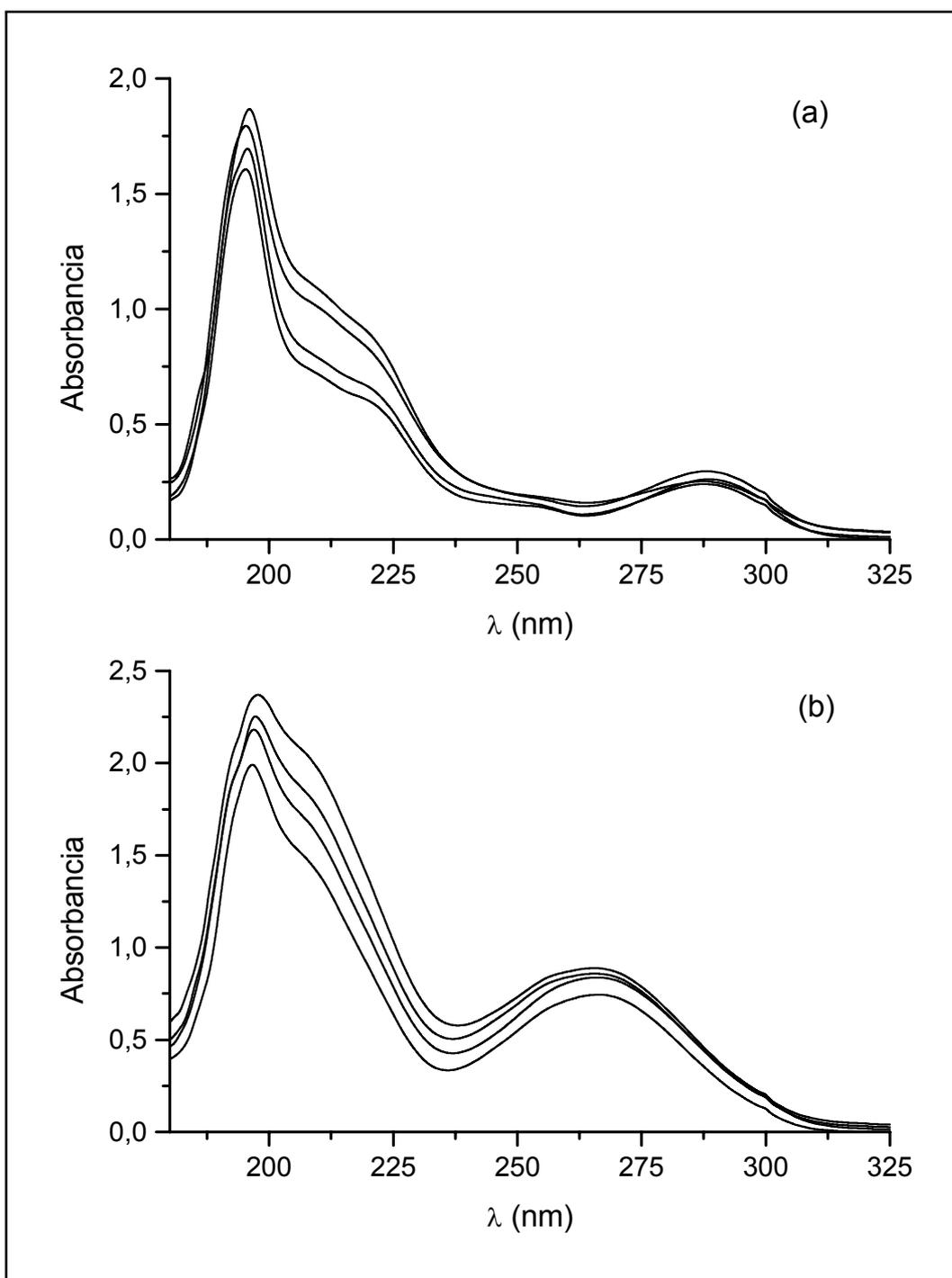


Fig. 47: Espectro de absorción de los sobrenadantes de la síntesis de poli(etil-2-cianoacrilato) empleando concentraciones crecientes de dextrano-70, en ausencia (a) y en presencia (b) de 5-fluorouracilo 10^{-4} M, para una concentración $2 \cdot 10^{-3}$ M de HCl. Las concentraciones [% (p/v)] utilizadas de dextrano-70 en orden creciente de absorbancia son 0, 0.5, 1 y 2.

Con estas tres experiencias ponemos de manifiesto la clara contribución de las diferentes especies presentes en el medio a la absorbancia total del sistema multicomponente que conforman junto con el 5-fluorouracilo no incorporado por las nanosferas poliméricas. Es por ello lógico plantear la determinación de la cantidad de fármaco no incorporado por las nanopartículas restando a la absorbancia total del sistema la correspondiente al resto de especies absorbentes. Esta metodología de determinación de la incorporación de fármaco ha sido aplicada por otros autores en muy diversos sistemas (218, 219).

5.3.6. Otros ensayos de determinación del 5-fluorouracilo incorporado.

Otra forma de determinar la cantidad de 5-fluorouracilo vehiculizado por nuestros materiales es la destrucción de las nanosferas para inducir su liberación. Este procedimiento complementará la metodología ya expuesta y justificada. Para ello se abordó la degradación de las nanopartículas poliméricas mediante la utilización de tres disolventes: acetona, diclorometano y dimetilsulfóxido (para análisis, Merck, Alemania). La idea básica es la obtención de una disolución de los productos de degradación del polímero junto con el fármaco incorporado por este. Esta mezcla será analizada espectrofotométricamente para cuantificar la cantidad de antineoplásico vehiculizada. Sin embargo, el bajo grado de unión de este fármaco en nanosferas poliméricas de la misma familia (216), nos hizo intuir la poca o nula utilidad de estos ensayos, esperándose una débil señal del 5-fluorouracilo en el espectro del sistema, si es que esta no es ocultada por los productos de degradación disueltos.

Mediante simple prueba visual se determinó la solubilidad total del poli(etil-2-cianoacrilato) en acetona. Desafortunadamente, el espectro de absorción de la acetona obtenido utilizando como blanco agua Milli-Q, determina la imposibilidad de apreciar el espectro propio del 5-fluorouracilo y de los productos de degradación, dado que la acetona presenta un espectro irregular, continuo y bastante intenso, por debajo de los 350 nm (Fig. 48).

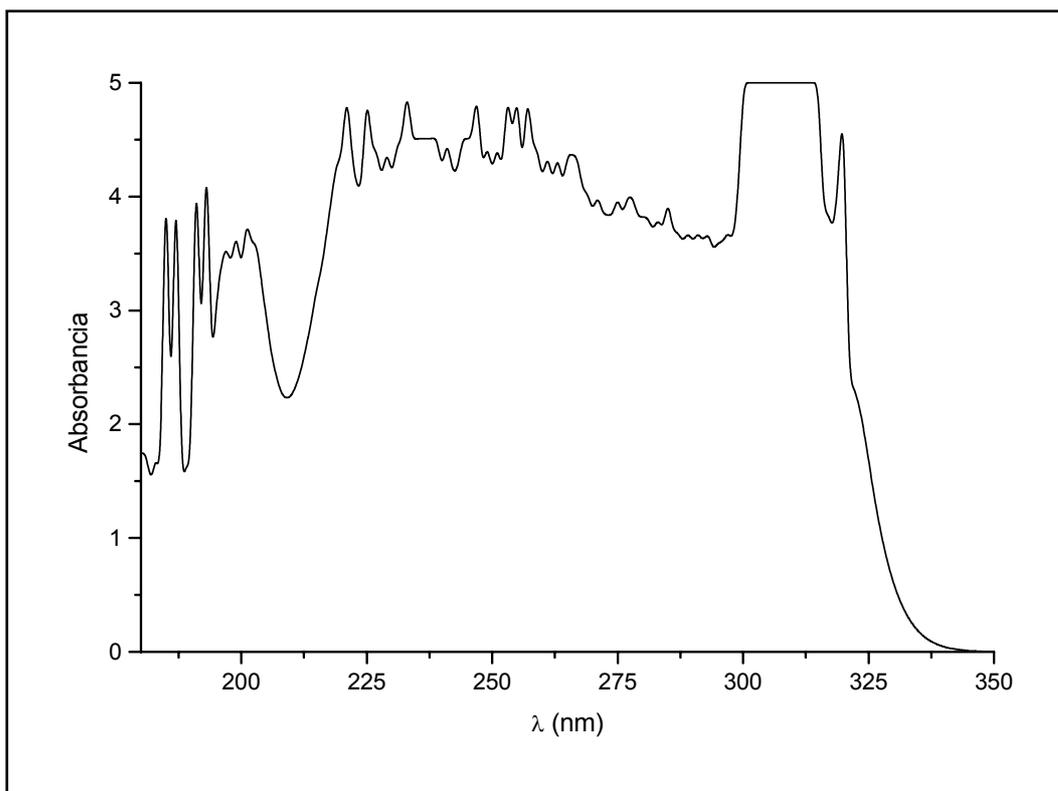


Fig. 48: Espectro de absorción ultravioleta-visible de la acetona, utilizando como blanco agua Milli-Q.

En cuanto al diclorometano, su espectro sí permitiría visualizar los picos del 5-fluorouracilo, o al menos el que aparece a 265 nm que es el útil en la determinación de la incorporación de fármaco por el polímero. Sin embargo, el primer problema que encontramos es la imposibilidad de obtener una curva de calibrado ya que el 5-fluorouracilo es insoluble en este disolvente, incluso tras aplicar 2 horas de ultrasonidos para lograr su disolución. Esto nos hace pensar que el 5-fluorouracilo incorporado en el polímero, puede llegar a precipitar en contacto con el diclorometano. Sin embargo, el polímero sí es soluble en este disolvente, por simple contacto. En la Fig. 49, se recogen los espectros de absorción, utilizando agua Milli-Q como blanco, del diclorometano y de una determinada concentración de poli(etil-2-cianoacrilato) disuelto en él (5 y 25 mg/mL). Puede apreciarse, cómo el pico característico del diclorometano que

aparece por debajo de los 235 nm, ve aumentada su anchura e intensidad al aumentar la cantidad de polímero disuelto en él.

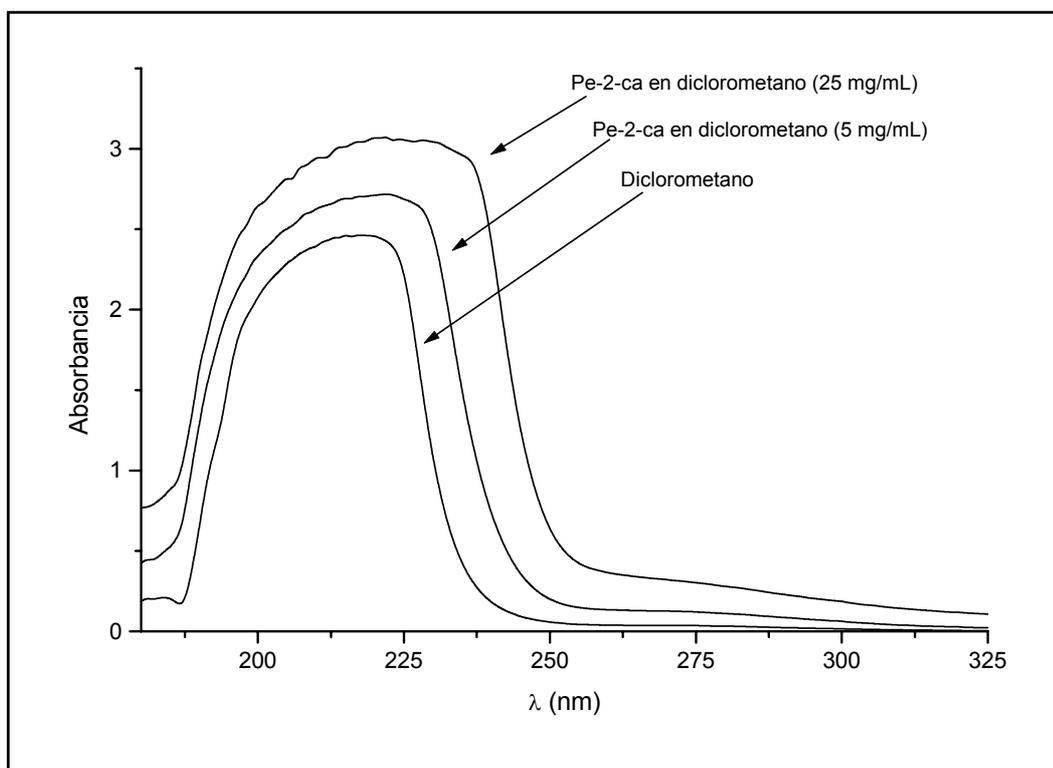


Fig. 49: Espectro de absorción del diclorometano y de una disolución de poli(etil-2-cianoacrilato) en él (5 y 25 mg/mL), utilizando agua Milli-Q como blanco.

Finalmente, se utilizó el dimetilsulfóxido como disolvente para determinar la cantidad de 5-fluorouracilo incorporada tras la rotura del polímero. En la Fig. 50 se recoge el espectro de este disolvente, el de una concentración $2 \cdot 10^{-3}$ M del antineoplásico disuelto en él y el de una concentración de 25 mg/mL de polímero disuelto en él. Como puede apreciarse, el espectro del dimetilsulfóxido es similar al del diclorometano, si bien es más ancho e intenso. Por lo demás, nos permitiría apreciar el pico característico a 265 nm del 5-fluorouracilo. En este disolvente sí es soluble nuestro anticancerígeno, pero el espectro obtenido para una concentración $2 \cdot 10^{-3}$ M de fármaco es irregular y carece de máximos bien definidos, por lo que se cometerían errores importantes en la obtención de una curva de calibrado. El polímero también es soluble en dimetilsulfóxido, pero el

espectro obtenido parece ser una deformación muy irregular del correspondiente a este disolvente. Por otro lado, a los 10 días de disolver el polímero la disolución adquiere un color amarillento, lo que atribuimos a la elevada concentración de productos de la degradación polimérica.

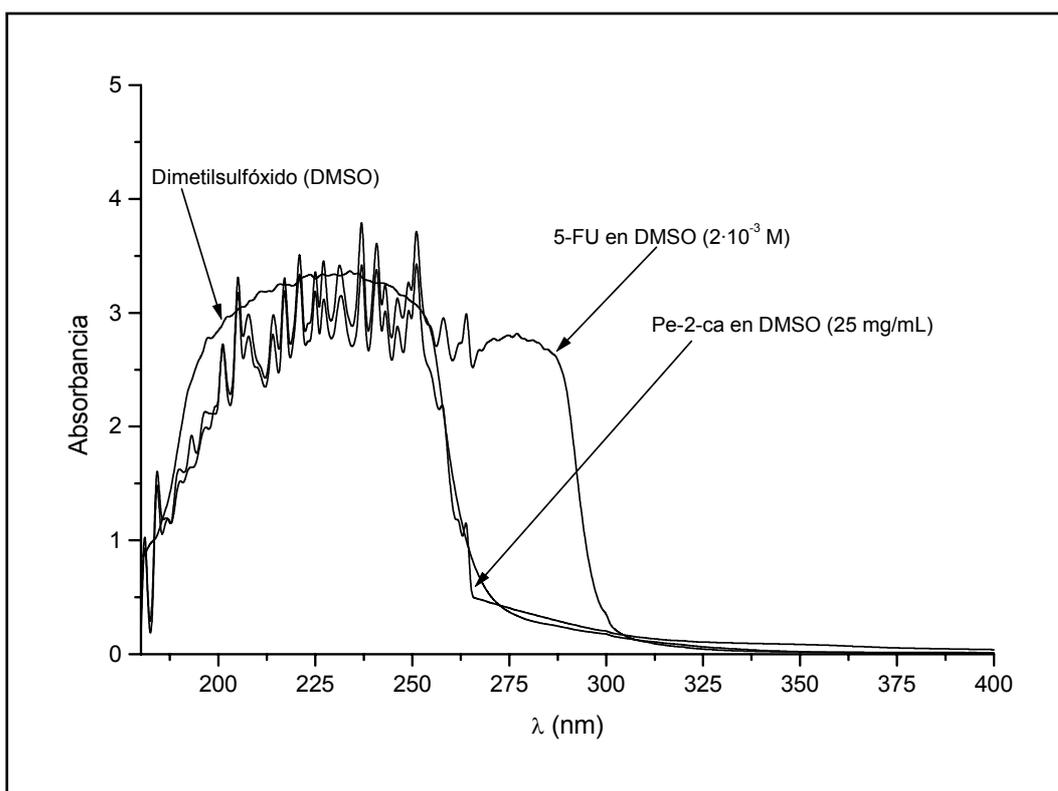


Fig. 50: Espectro de absorción del dimetilsulfóxido, de una disolución $2 \cdot 10^{-3}$ M de 5-fluorouracilo y de una de 25 mg/mL de poli(etil-2-cianoacrilato) disueltas en él, utilizando agua Milli-Q como blanco.

Estos ensayos ponen de manifiesto la imposibilidad de utilizar estos disolventes para liberar y cuantificar mediante determinación espectrofotométrica el 5-fluorouracilo vehiculado por el polímero. El comportamiento espectrofotométrico del polímero en los ensayos de estabilidad frente al pH del medio (Figs. 40-42) también revela la imposibilidad de someter las nanosferas a un pH básico para lograr esto.

5.4. INCORPORACIÓN SUPERFICIAL DEL 5-FLUOROURACILO.

La incorporación de fármaco en las nanopartículas poliméricas puede realizarse mediante dos métodos: la adición en el momento en el que se generan las nanosferas, con lo que queda atrapado principalmente en la matriz polimérica, o la adsorción superficial tras la formación e incubación de las nanopartículas en una disolución de este. Es previsible que la mayor captación de fármaco se consiga mediante el método de incorporación (220). El estudio de vehiculización superficial del 5-fluorouracilo por nuestros materiales se centrará en la evaluación del grado de unión a la superficie polimérica como mecanismo coadyuvante en la captación del antineoplásico por el polímero. También determinaremos la adsorción en la superficie de los núcleos magnéticos con vistas a una posible aplicación a la incorporación de este en las partículas compuestas tras la adición de la capa polimérica. Esto lo realizaremos mediante determinaciones espectrofotométricas y, como se recoge más adelante, con un estudio electroforético de los tres tipos de materiales utilizados.

5.4.1. Determinación espectrofotométrica.

En primer lugar, realizamos la determinación de la adsorción superficial de 5-fluorouracilo sobre las nanosferas de poli(etil-2-cianoacrilato). Para ello preparamos una serie de disoluciones de 5 mL de volumen con diferente concentración molar de 5-fluorouracilo ($3 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$ y $4 \cdot 10^{-4}$) reproduciendo el medio de polimerización del monómero que utilizamos de forma general en los ensayos de absorción [HCl $2 \cdot 10^{-3}$ M, dextrano-70 0.5 % (p/v)], con el objetivo de establecer las condiciones reales de adsorción en el momento de generación del polímero. Una vez retirada una muestra del medio para la posterior comparación, se procedió a añadir el poli(etil-2-cianoacrilato) en cantidad suficiente como para tener una concentración final del 0.55 % (p/v). Tras 24 horas de contacto se procedió a la separación de los sobrenadantes mediante doble

centrifugación a 17000 r.p.m. durante 20 minutos, para la determinación del espectro de absorción de estos. Como ya se ha justificado, el cálculo de la adsorción de 5-fluorouracilo se realizó mediante la comparación de la absorbancia del medio de polimerización con la correspondiente al sobrenadante obtenido tras doble centrifugación y tras eliminar la propia de los productos residuales que puedan interferir. De igual forma se procedió en el caso de las partículas compuestas y de las de magnetita, estableciendo un 1 % (p/v) de concentración para ambas.

Los resultados obtenidos en los tres casos nos muestran una adsorción inexistente o errática para los tres tipos de partículas, a lo largo de la batería de concentraciones de 5-fluorouracilo. La Fig. 51 muestra, como ejemplo, los resultados obtenidos con las partículas compuestas. A falta de confirmación mediante el estudio del efecto del fármaco sobre la movilidad electroforética de las partículas, podemos pensar que la incorporación de 5-fluorouracilo por las nanosferas de poli(etil-2-cianoacrilato) se realiza de forma casi exclusiva en la matriz, siendo la adsorción superficial nula o prácticamente inexistente.

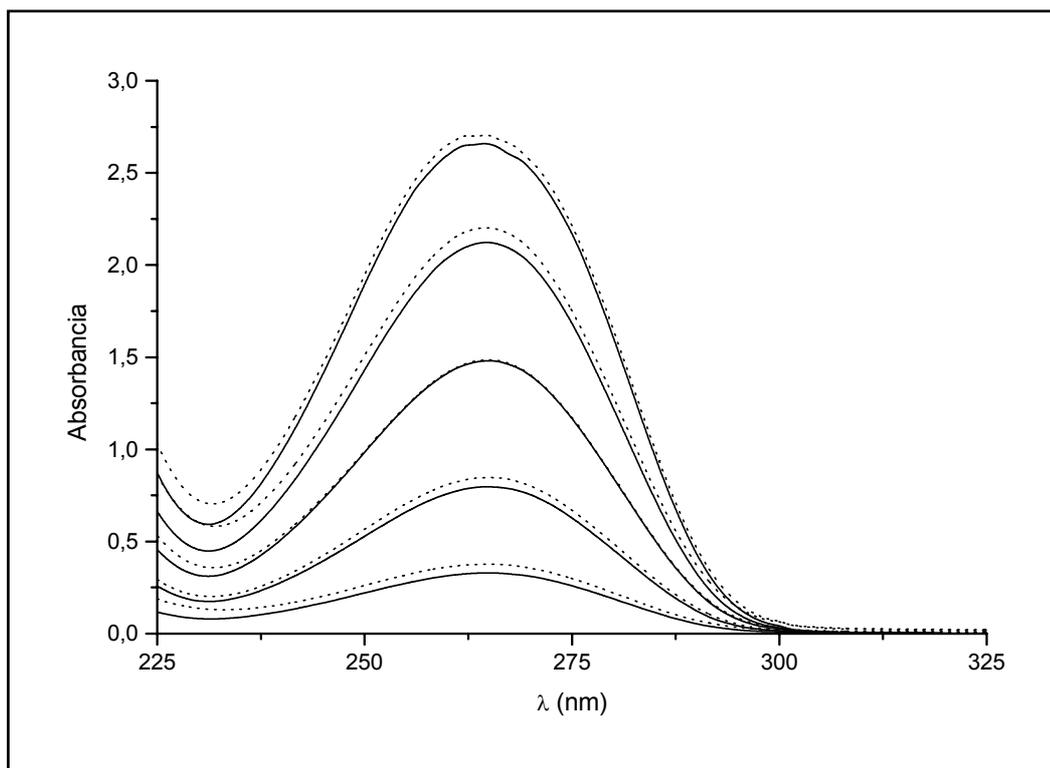


Fig. 51: Adsorción superficial de 5-fluorouracilo por las partículas compuestas. Las concentraciones molares de fármaco en orden creciente de absorbancia son: $3 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$ y $4 \cdot 10^{-4}$. Línea continua (-): medio de polimerización; línea discontinua (---): sobrenadante.

5.4.2. Determinación electroforética.

Como prueba adicional que determine si existe adsorción superficial del antineoplásico en alguno de los tres tipos de partículas, estudiaremos cómo se ve modificada la movilidad electroforética (μ_e) de estas al ponerlas en contacto con el 5-fluorouracilo. La metodología experimental seguida es igual a la descrita en las anteriores determinaciones electroforéticas. Las suspensiones preparadas para el estudio presentaban una concentración aproximada de partículas del 0.1 % (p/v). Antes de preparar las suspensiones, se fijaron una concentración del 0.5 % (p/v) de dextrano-70 y las diferentes concentraciones molares de 5-fluorouracilo (10^{-5} , $3 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $3 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $3 \cdot 10^{-3}$, 10^{-2} , $3 \cdot 10^{-2}$ y 10^{-1}), y a fin de descartar la influencia de los iones presentes en la disolución, se dividieron en dos grupos: uno

de ellos con una fuerza iónica fijada (KNO_3 10^{-3} M) y el otro sin fijar una fuerza iónica. Las medidas se realizaron tras 24 horas de almacenamiento de las disoluciones a 25 °C, protegidas de la luz ambiental y bajo agitación constante, comprobando previamente el pH. Los datos presentados son el promedio de quince determinaciones, cambiando la muestra cada tres.

La Fig. 52 muestra la evolución de la movilidad con la concentración de fármaco para los tres tipos de partículas, en presencia y ausencia de electrolito añadido (10^{-3} M KNO_3 en su caso). Se observa una tendencia general de la movilidad a aumentar (hacia valores positivos o progresivamente menos negativos) al añadir el fármaco. Hay, sin embargo, diferencias entre los distintos tipos de partículas, así como un claro efecto de la presencia de KNO_3 . Este es el caso de la magnetita: al aumentar la concentración de 5-fluorouracilo, la movilidad (originalmente positiva) se hace más positiva, lo que sugiere adsorción de especies con este signo de carga: tales especies han de provenir de la disociación de algún grupo de la molécula de fármaco, quizá el $-\text{NH}$. Se explica así también el efecto del KNO_3 : en presencia de este electrolito indiferente, la repulsión electrostática entre magnetita y antineoplásico se apantallaría parcialmente, favoreciéndose la adsorción de éste por disminución de la repulsión. Por ello, μ_e es más positiva al añadir KNO_3 y aumenta para concentraciones menores de fármaco. El cambio del pH de la disolución hacia valores ligeramente más ácidos a partir de una concentración de fármaco 10^{-2} M corrobora este fenómeno.

En el caso del polímero y en el de las partículas compuestas, la carga negativa original se reduce por adsorción, favorecida electrostáticamente, y la presencia de KNO_3 afecta esencialmente a la compresión de la doble capa, con la consiguiente reducción de movilidad. Se observa, no obstante, que la disminución de μ_e al aumentar la concentración de 5-fluorouracilo es más notable (sobre todo para las partículas poliméricas) cuando no hay KNO_3 en el medio: su presencia apantallaría en este caso la atracción electrostática partícula-fármaco, dificultando

la adsorción. Ésta debe ser en todo caso pequeña, como demuestra el hecho de que, incluso para las mayores concentraciones de 5-fluorouracilo, no se observa cambio de signo de la movilidad del polímero o las partículas compuestas.

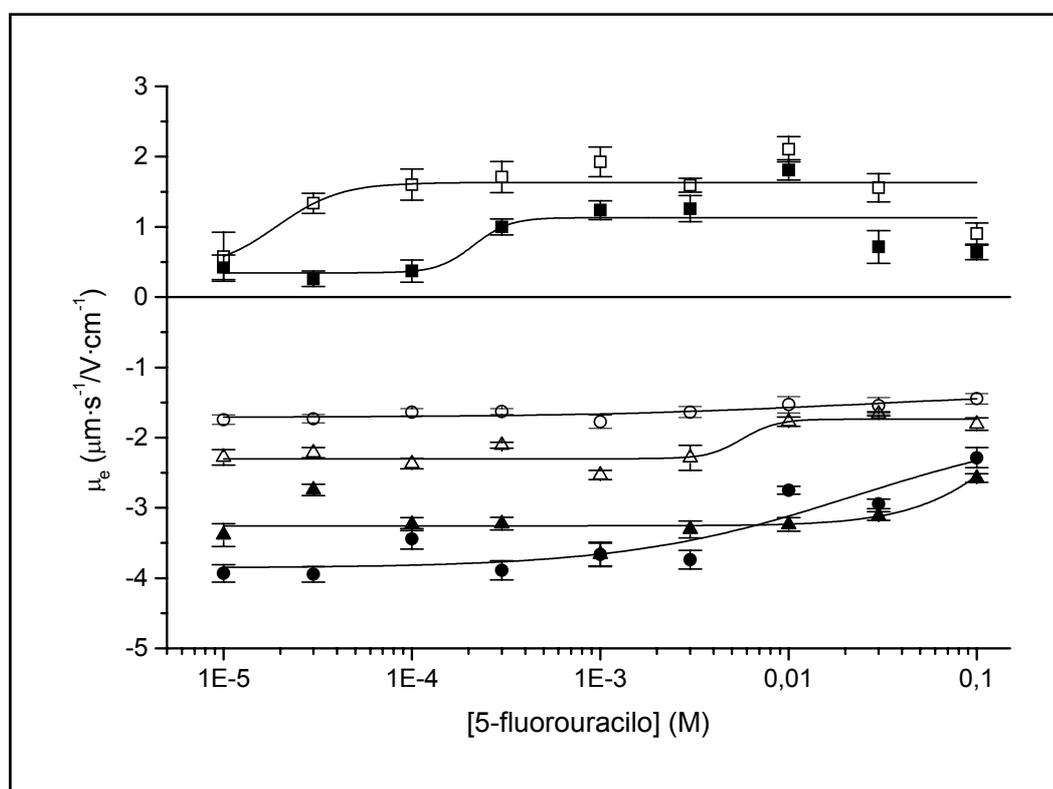


Fig. 52: Movilidad electroforética de magnetita (■), poli(etil-2-cianoacrilato) (●) y partículas compuestas (▲) en función de la concentración de 5-fluorouracilo y de la existencia de una fuerza iónica fija (KNO_3 10^{-3} M, símbolos huecos).

5.5. INCORPORACIÓN DEL 5-FLUOROURACILO A LA MATRIZ POLIMÉRICA.

Una vez confirmada la escasa o prácticamente nula adsorción de 5-fluorouracilo en la superficie de nuestros tres tipos de materiales, nos centraremos en el estudio de la contribución del principal método de vectorización de fármacos en las nanopartículas poliméricas, la incorporación en el momento en

que se produce su formación. Para ello, analizaremos la influencia de los principales factores determinantes de la polimerización del monómero, así como de la captación de fármaco, en la incorporación de este en la matriz. Estos son la concentración de 5-fluorouracilo, de dextrano-70, de HCl y de etil-2-cianoacrilato en el medio. De esta manera, pretendemos obtener las condiciones óptimas que permiten una incorporación máxima del antineoplásico y desarrollaremos una síntesis optimizada de nanosferas poliméricas con 5-fluorouracilo incorporado.

5.5.1. Efecto de la concentración de etil-2-cianoacrilato.

La capacidad de captación de fármaco por parte del poli(etil-2-cianoacrilato) se encuentra condicionada por la reducida longitud de su cadena alquílica (radical etilo), por lo tanto es esperable un menor grado de vehiculización en comparación con otros miembros de la misma familia con sustituyente alquílico de mayor longitud (220). Diversos estudios han puesto de manifiesto que las nanosferas de esta familia están constituidas por un núcleo poroso rodeado por un anillo más homogéneo (80, 87, 221). Esto nos hace intuir que la incorporación del 5-fluorouracilo se desarrollará mediante un atrapamiento mecánico, ya que el estudio de adsorción superficial no sugiere ninguna interacción suficientemente intensa entre fármaco y polímero. De esta manera, no se alterará la actividad del fármaco tras su unión a las nanosferas como ocurre con la ampicilina (222). Por otro lado, la naturaleza hidrófila del antineoplásico provocará que presente una baja afinidad por incorporarse en una matriz de naturaleza hidrófoba (146, 216). En cuanto a la influencia de la concentración de monómero empleada, diversos estudios realizados con fármacos de diversa naturaleza apuntan que la cantidad de fármaco incorporada aumenta con la concentración de monómero (83, 220, 221). Sin embargo, un estudio reciente sobre la incorporación de 5-fluorouracilo en polímeros de diferente naturaleza [poli(lactida-co-glicolida), poli(caprolactona) y Eudragit], revela que no se incrementa la vehiculización al aumentar la cantidad de polímero y sí existe un aumento de la formación de aglomerados poliméricos inservibles (216).

El estudio de la influencia de la concentración de etil-2-cianoacrilato adicionada al medio de polimerización sobre el grado de incorporación de 5-fluorouracilo, se realizó siguiendo la rutina de síntesis de las nanosferas de poli(etil-2-cianoacrilato) descrita anteriormente, modificada por la introducción en el medio de polimerización del agente estabilizador dextrano-70 [0.5 % (p/v)] y una concentración 10^{-4} M de 5-fluorouracilo. La concentración de monómero utilizada fue: 1, 2, 3 y 4 % (p/v). Una vez preparado el medio de polimerización y antes de añadir el monómero, se retiró una pequeña cantidad de cada uno de los medios para determinar su espectro de absorción en las mismas condiciones que el sobrenadante obtenido tras centrifugar dos veces dicho medio (a 17000 rpm y durante 25 minutos) una vez finalizada la síntesis. La metodología seguida para determinar la cantidad de antineoplásico vehiculizado ya ha sido ampliamente justificada y está basada en la comparación del espectro correspondiente al medio de polimerización con el perteneciente al sobrenadante del medio una vez finalizada la polimerización y previamente corregido. Los experimentos fueron repetidos tres veces con cada una de las concentraciones de monómero.

En la Fig. 53 se recogen las cantidades absorbidas de 5-fluorouracilo por las nanosferas poliméricas en función de la concentración de monómero adicionada al medio. Como puede apreciarse en la Fig. 53 (a), en términos absolutos se produce un incremento de la incorporación del antineoplásico por las nanopartículas al aumentar la concentración de monómero adicionada al medio, concretamente desde 0.3 hasta 1.1 micromoles. Sin embargo, no ocurre lo mismo si analizamos la absorción relativa de fármaco vehiculizado por las nanosferas. Esta se mantiene en torno a los 0.6 $\mu\text{mol/g}$, sin importar que la concentración de etil-2-cianoacrilato adicionada al medio se incremente hasta el 4 % (p/v) [Fig. 53 (b)]. Por lo tanto, se puede deducir que el único efecto que provoca el incremento de la concentración de monómero adicionado, es un aumento de la cantidad de nanopartículas generadas y este aumento será el responsable de la mayor vehiculización en términos absolutos, pero no inducirá que las nanosferas porten una mayor cantidad de fármaco. De esta manera, no hará falta emplear una

elevada concentración de etil-2-cianoacrilato para lograr la mejor densidad de absorción.

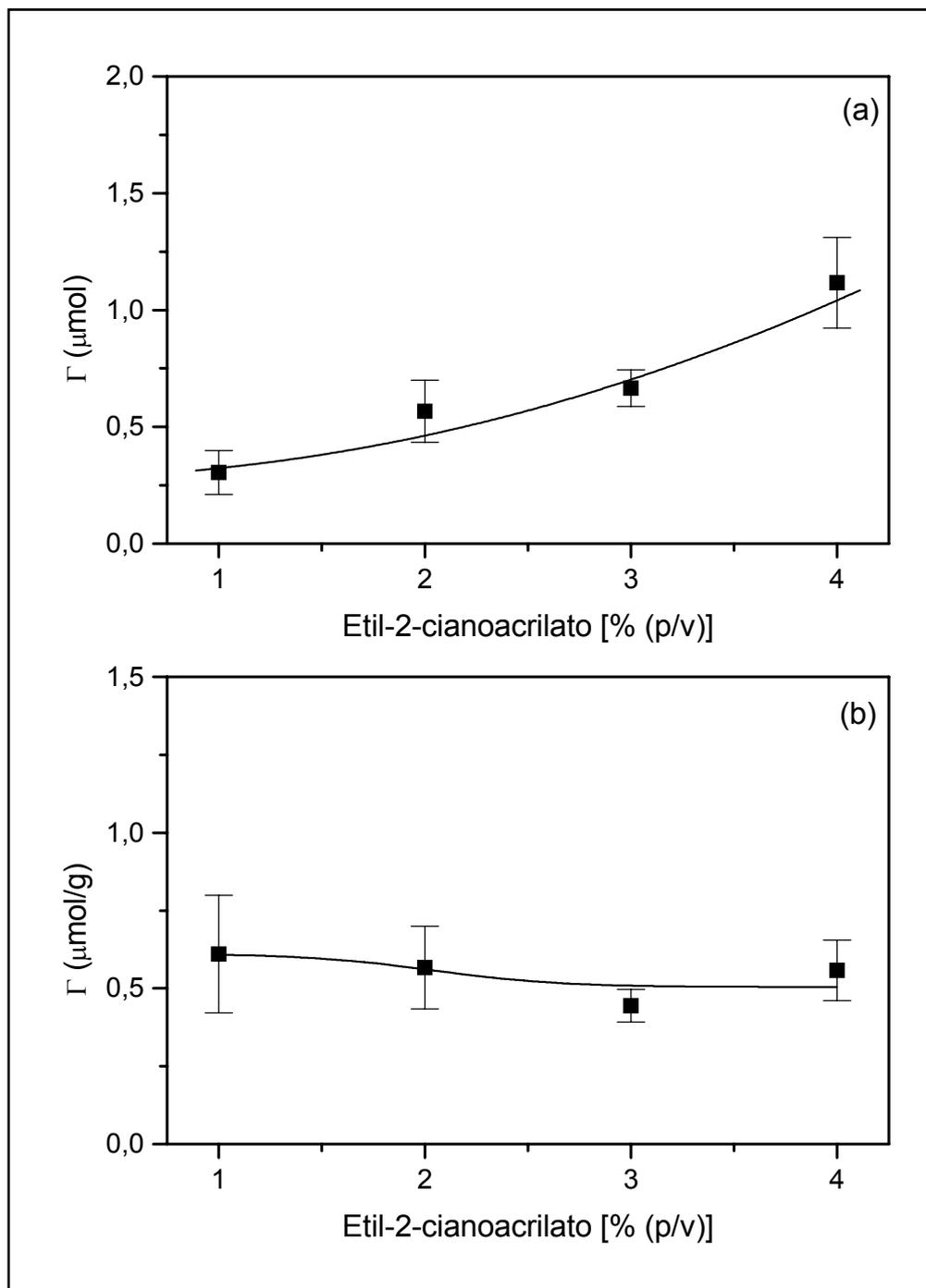


Fig. 53: Cantidad total absorbida (μmol) (a) y cantidad absorbida por unidad de masa de monómero ($\mu\text{mol/g}$) (b) de 5-fluorouracilo en función de la concentración de etil-2-cianoacrilato.

5.5.2. Efecto de la concentración de dextrano-70.

La utilización de agentes tensioactivos o estabilizadores permite optimizar las características de las nanosferas obtenidas al lograr una mejora de las propiedades de tamaño y de protección frente a los fenómenos de opsonización, lo que adecuaba estos sistemas para su administración parenteral (223, 224). Sin embargo, no es menos conocido el papel fundamental desarrollado por estos agentes en la vehiculización de fármaco (220, 223). Por esta razón hemos decidido introducir en la rutina de síntesis del polímero un agente estabilizador que permita incrementar la captación de 5-fluorouracilo por el poli(etil-2-cianoacrilato). El agente seleccionado es el dextrano-70 (dextrano-70 grado clínico, Sigma, U.S.A.), un polímero biodegradable de elevado peso molecular, neutro, hidrosoluble y con una buena estabilidad a temperatura ambiente y pH entre 4 y 10. Presenta una excelente biocompatibilidad con una seguridad probada y ha sido ampliamente utilizado en Medicina y Biología Molecular (225).

El dextrano-70 utilizado en nuestro estudio se presenta en forma de polvo blanco, higroscópico, y con peso molecular de 68000 Da. Ha sido ampliamente utilizado para facilitar la incorporación de fármacos de diferente naturaleza por polímeros de la familia de los poli(alquilocianoacrilatos), incluidos los antineoplásicos doxorubicina y metotrexato (206, 207, 223). Su introducción en el medio de polimerización antes de adicionar el monómero pretende provocar la apertura de las cadenas poliméricas, generándose un espacio dentro de la matriz polimérica donde pueda incorporarse el fármaco. Además, ha demostrado ser útil en la obtención de distribuciones poliméricas homogéneas y con uniformidad en los tamaños (223).

Se estudió la influencia de la concentración de dextrano-70 en el medio de polimerización sobre el grado de incorporación del antineoplásico en la matriz polimérica. Para ello, se siguió la rutina de síntesis y el procedimiento de determinación del 5-fluorouracilo ya descritos y justificados, con la única variación de la introducción en el medio de polimerización de este agente

estabilizador y una concentración 10^{-4} M de 5-fluorouracilo. Las concentraciones [% (p/v)] de dextrano-70 utilizadas fueron: 0, 0.5, 1 y 2. Los experimentos fueron repetidos tres veces con cada una de las concentraciones de dextrano-70.

En la Fig. 54 se recogen las densidades de absorción del 5-fluorouracilo por las nanosferas poliméricas en función de la concentración del agente estabilizador presente en el medio. Como puede apreciarse, la participación del dextrano-70 en la incorporación de fármaco no es crucial ya que los valores de densidad de absorción obtenidos en las síntesis sin este agente estabilizador, son muy similares a los logrados con su participación (en torno a $0.9 \mu\text{mol/g}$). Sin embargo, su papel en la obtención de las nanosferas poliméricas es fundamental cualitativa y cuantitativamente. Su carácter de estabilizador polihidroxílico, provoca que en el medio exista una mayor concentración de especies iniciadoras de la polimerización (sus grupos OH y los iones OH^- de la disociación del agua), por lo que inducirá un efecto similar al desarrollado por el polietilenglicol, es decir, actuará como iniciador de la polimerización además de ejercer un efecto estabilizador (105). Por lo tanto, la velocidad de polimerización se verá aumentada al igual que el rendimiento en la obtención de nanosferas. De esta manera se justifica que, con concentraciones de dextrano-70 inferiores al 1 % (p/v), se generen suspensiones que coagulan fácilmente y en las que predomina la formación de macroagregados poliméricos y residuos sólidos de polímero, lo que determina la necesidad de realizar una filtración previa de la suspensión para obtener el tamaño de partículas deseado, reduciéndose el rendimiento del proceso de síntesis. Con la utilización de concentraciones del 1 % (p/v) o superiores, se obtienen suspensiones de aspecto lechoso muy estables que no coagulan fácilmente una vez interrumpida la agitación y en las que no se aprecian macrocoágulos de polímero. El aspecto de las suspensiones no mejora conforme se aumenta la concentración de dextrano-70 por encima del 0.5 % (p/v). Es suficiente el uso de una concentración del 1 % (p/v) para lograr este efecto. Este efecto sobre el tamaño de partícula de la suspensión obtenida ya ha sido descrito anteriormente, en el caso del polietilenglicol (105). Queda claro, por tanto, que con la introducción de este agente estabilizador se optimiza la obtención de

distribuciones homogéneas de nanosferas de reducido tamaño y elevada uniformidad, sin que para ello se merme la capacidad de carga de fármaco.

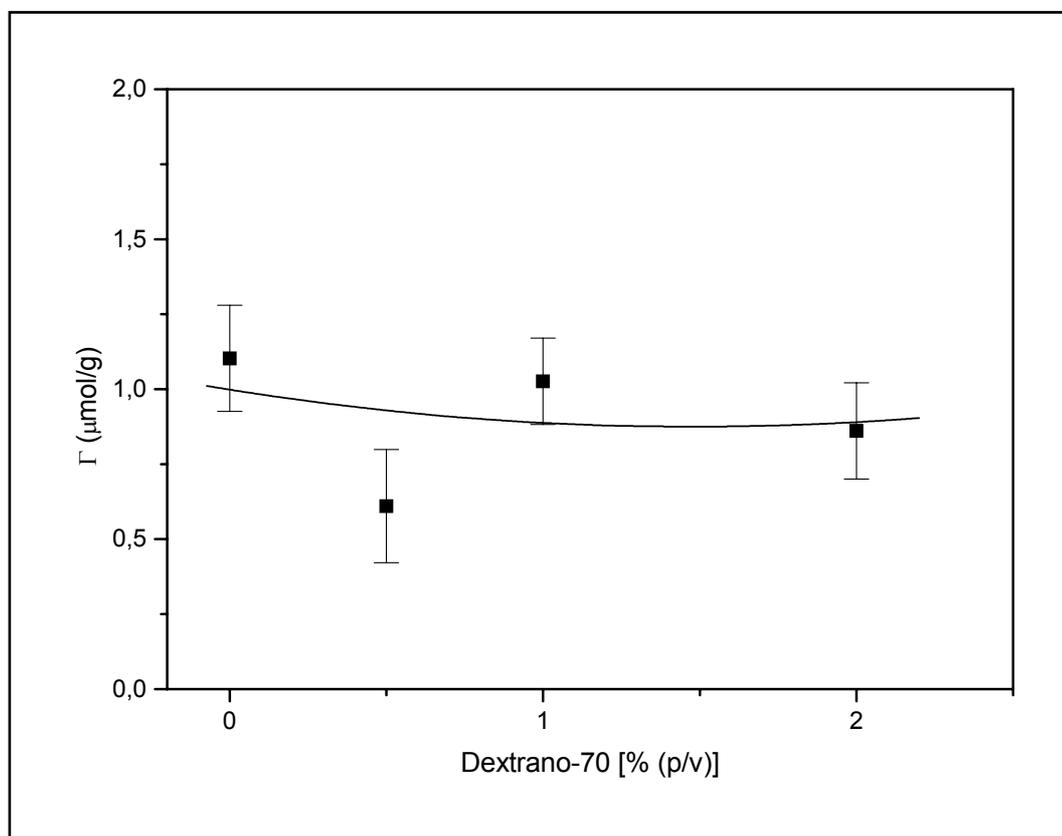


Fig. 54: Densidad de absorción ($\mu\text{mol/g}$) de 5-fluorouracilo en función de la concentración de dextrano-70.

5.5.3. Efecto de la concentración de HCl.

Como ya hemos comentado, la preparación de las nanosferas de poli(etil-2-cianoacrilato) se realiza mediante el método de emulsión/polimerización. El mecanismo de polimerización es un proceso aniónico iniciado por bases covalentes presentes en el medio de polimerización. La cinética de este proceso está determinada por el balance entre la concentración de agentes iniciadores (porciones OH del dextrano-70 e iones OH^- procedentes de la disociación del agua) y terminadores (iones H^+) de la polimerización presentes en el medio. Cuanto más ácido sea el medio, más lenta será la velocidad de polimerización y

viceversa (105, 218). Por lo tanto, el pH del medio determina la velocidad de polimerización y la adsorción de fármacos que sean ionizables (73). Este no es el caso del 5-fluorouracilo, ya que se trata de una molécula de carácter no iónico.

Debido a que la naturaleza hidrófila del fármaco determina una baja captación por el núcleo polimérico hidrófobo (216) y a que en la captación presumiblemente no participa ningún otro proceso que no sea de tipo mecánico (por la naturaleza no iónica del 5-fluorouracilo), interesará desarrollar una velocidad de polimerización lo suficientemente rápida como para lograr una captación mecánica tan veloz que el fármaco hidrófilo escape al medio acuoso lo menos posible. Sin embargo, si el pH del medio de polimerización no es lo suficientemente ácido el rendimiento de la síntesis se verá mermado, obteniéndose nanopartículas de bajo peso molecular y fácilmente degradables, acompañadas de una gran cantidad de polímero sólido por la rápida polimerización del monómero. Evidentemente, en ningún momento se fijará un medio de polimerización con pH básico para evitar la formación de una elevada cantidad de polímero sólido y la degradación rápida de las escasas partículas poliméricas que puedan llegarse a formar. El uso de dextrano-70 nos permitirá movernos en unos valores de pH más ácidos ya que la elevada concentración de iones H^+ (agentes finalizadores de la polimerización) se verá compensada por la actuación de este estabilizador polihidroxílico como iniciador de la polimerización, ya comentada.

Nuestro objetivo es analizar la influencia de la concentración de HCl en el medio de polimerización sobre el grado de incorporación de 5-fluorouracilo en la matriz polimérica. Asimismo, investigaremos las condiciones adecuadas de pH y de concentración de dextrano-70 para obtener un rendimiento óptimo de nanosferas adecuadas como vehículo de este antineoplásico vía parenteral. De esta manera, buscamos la determinación del pH apropiado que permita cumplir ambos objetivos. Para ello, introduciremos en el medio de polimerización un 0.5 % (p/v) de dextrano-70, una concentración 10^{-4} M de 5-fluorouracilo y variaremos las concentraciones molares de HCl entre 10^{-5} y 10^{-1} , y seguiremos la rutina de síntesis y el procedimiento de cuantificación ya descritos y justificados. No se

utilizarán concentraciones de dextrano-70 superiores, más adecuadas en una síntesis óptima, para evitar que el agente estabilizador enmascare el efecto del pH como ya se ha comentado. Por otro lado, para las concentraciones molares extremas de HCl (10^{-1} , 10^{-4} y 10^{-5}), se investigó la influencia del dextrano-70 sobre la apariencia de la suspensión polimérica obtenida, mediante la realización de nuevas síntesis en las que se fijaron unas concentraciones de este agente del 0, 1 y 2 % (p/v). Los experimentos fueron repetidos tres veces con cada uno de los pH fijados. Igualmente, se determinó el tiempo preciso para que el medio de polimerización comenzara a presentar un aspecto blanquecino, señal que indica la formación de nanopartículas de polímero y que nos permite intuir la velocidad de polimerización. También se analizó la suspensión de las nanopartículas mediante apreciación visual, valorando el aspecto de la suspensión obtenida, su estabilidad y la presencia de precipitados sólidos de polímero.

El aspecto de las suspensiones poliméricas obtenidas se encuentra muy influenciado por el pH del medio. La variación más acusada se observa entre las concentraciones molares 10^{-5} y 10^{-4} . A pH = 5, se obtiene una suspensión blanquecina donde se aprecian macroagregados y en la que se ha formado una elevada cantidad de precipitados sólidos de polímero. Sin embargo, cuando el pH es inferior el aspecto de la suspensión es totalmente lechoso, no se observa la formación de macroagregados y son escasos los precipitados sólidos que se generan. Este fenómeno ya ha sido observado en el caso de las suspensiones de poli(isohexilcianoacrilato) (218). En cuanto al papel del dextrano-70, comentado previamente, concentraciones inferiores al 1 % (p/v) no permiten la formación de partículas coloidales, generándose una distribución polimodal con elevada presencia de macroagregados y precipitados sólidos, no estando la suspensión estabilizada.

El tiempo necesario para que el medio de polimerización, una vez finalizada la adición del monómero y en presencia o ausencia de dextrano-70 [0.5 % (p/v)], presente un aspecto turbio blanquecino ratifica lo expuesto. A pH menos ácidos, antes de finalizar la adición del monómero se observa esta turbidez;

proceso que se acelera aún más si en el medio se encuentra el dextrano-70, por su papel como iniciador. Sin embargo, a pH muy ácidos (pH = 1) son necesarios más de 10 minutos para que se comience a observar un ligero tono blanquecino en el medio, de lo que se deduce que la cinética será mucho más lenta por existir una menor proporción de agentes iniciadores.

La capacidad de incorporación de 5-fluorouracilo según el pH queda recogida en la Fig. 55, donde se indican las densidades de absorción por las nanosferas poliméricas en función de la concentración de HCl presente en el medio. Como puede apreciarse, la absorción es mucho mayor para los pH 4 y 5, incluso no es precisa la corrección del espectro del sobrenadante obtenido para observar la existencia de una clara reducción de la intensidad del pico obtenido a 265 nm con respecto al espectro del medio de polimerización; es decir, para apreciar que se ha producido absorción. El mayor grado de incorporación a estos pH menos ácidos se justifica, según hemos comentado, por la elevada velocidad de polimerización desarrollada, la cual genera una mayor captación mecánica. Se logra de esta forma un máximo de captación a pH = 5 del orden de 1.6 ± 0.3 $\mu\text{mol/g}$, que irá disminuyendo progresivamente con el pH hasta situarse entorno a 0.5 $\mu\text{mol/g}$. Esto se debe a que el aumento de la acidez del medio provoca una ralentización progresiva de la cinética de polimerización, lo que induce una reducción en la capacidad de captación. A pesar de que el máximo de incorporación se logra a pH = 5, no seleccionaremos esta concentración de HCl como la adecuada para desarrollar la polimerización ya que las características de la suspensión obtenida no son óptimas, como ya hemos comentado. Por lo tanto, seleccionaremos una concentración 10^{-4} M de HCl, donde se obtiene una absorción algo menor (1.16 ± 0.12 $\mu\text{mol/g}$), como la idónea por obtenerse una suspensión de nanosferas adecuada, siempre que utilicemos una concentración de dextrano-70 del 1 % (p/v) por los motivos también señalados. Esta mejor absorción al utilizar pH menos ácidos también se obtiene con otros fármacos, como el ciprofloxacino (218).

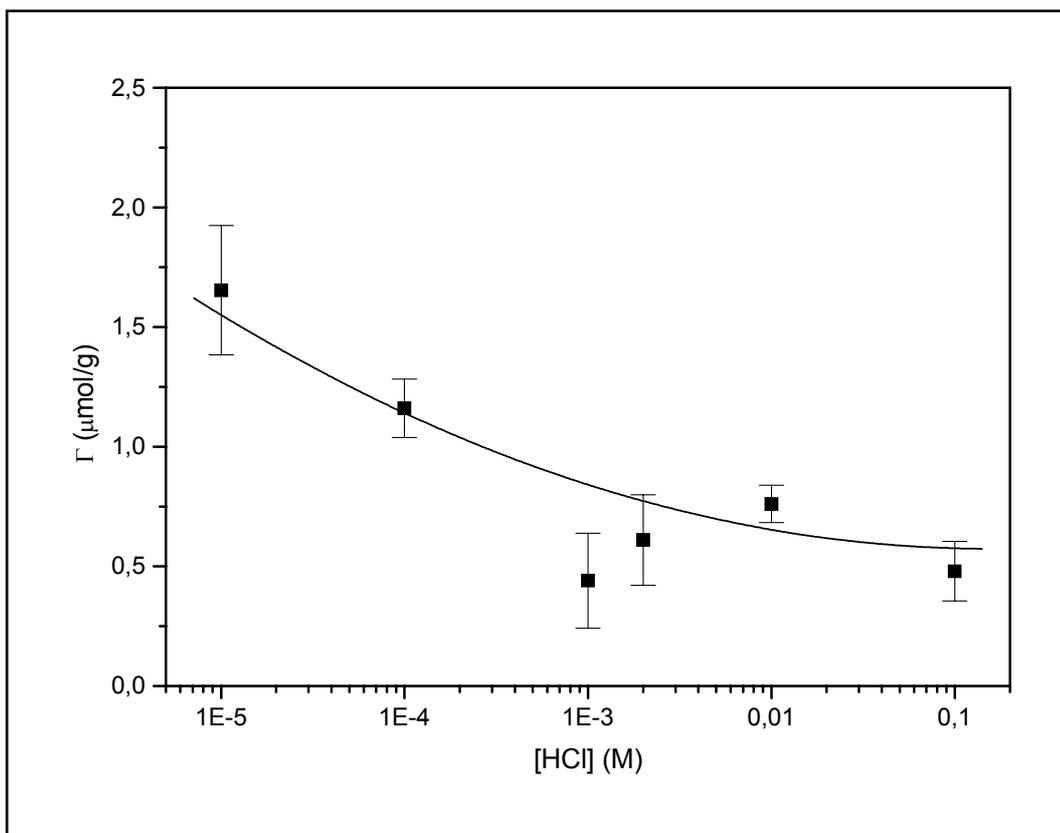


Fig. 55: Densidad de absorción ($\mu\text{mol/g}$) de 5-fluorouracilo en función de la concentración de HCl.

5.5.4. Efecto de la concentración de 5-fluorouracilo.

La influencia de la concentración de fármaco en el medio sobre su incorporación por las nanopartículas de la familia de los poli(alquilcianoacrilatos) es un fenómeno muy estudiado. La naturaleza de los fármacos utilizados es muy heterogénea, desde anticancerígenos como el propio 5-fluorouracilo (216), hasta antibióticos como el ciprofloxacino (218), la ampicilina (226) o la amikacina (227); apreciándose un efecto positivo del aumento de la concentración de fármaco sobre la eficacia de la vehiculización. En cuanto a la incorporación de este antineoplásico por otros transportadores, son muchos los sistemas ensayados desde liposomas (228) hasta nanopartículas de Eudragit, poli(caprolactona) o poli(lactida-co-glicolida) (216); observándose una baja eficacia de incorporación debido a las características del fármaco ya comentadas.

El análisis de la influencia de la concentración de 5-fluorouracilo sobre su incorporación en la matriz polimérica se realizó siguiendo la rutina de síntesis y el procedimiento de determinación espectrofotométrica ya descritos y justificados. Para ello, la única variable que se introdujo en la polimerización fue la concentración de este antineoplásico. Las concentraciones molares utilizadas fueron: $3 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-4}$ y $5 \cdot 10^{-4}$. Los experimentos se repitieron tres veces con cada una de las concentraciones molares de fármaco.

En la Fig. 56 se recogen las densidades de absorción del 5-fluorouracilo por las nanosferas poliméricas en función de la concentración de este en el equilibrio. Como puede apreciarse, la cantidad de antineoplásico asociada por unidad de peso de las nanosferas aumenta con la concentración de este que permanece en el sobrenadante en la situación de equilibrio. De esta manera, los valores de densidad de absorción obtenidos pasarán de $0.41 \pm 0.12 \mu\text{mol/g}$ para la concentración inicial de 5-fluorouracilo menor ($3 \cdot 10^{-5}$ M), a $2.56 \pm 0.13 \mu\text{mol/g}$ cuando la concentración inicial utilizada es $4 \cdot 10^{-4}$ M. Por lo tanto, existe una mayor eficacia en la captación mecánica ya que más fármaco es susceptible de ser atrapado en la red polimérica. Este aumento de la captación también se intuye por encima de las concentraciones estrictamente utilizables, como lo demuestra la estimación del valor de absorción obtenido para la concentración $5 \cdot 10^{-4}$ M mediante la Ec. 70 ($3.1 \pm 0.3 \mu\text{mol/g}$). Los datos de absorción obtenidos se ajustaron a una ecuación potencial de ecuación:

$$\Gamma = aC^b \quad (71)$$

siendo Γ la densidad de absorción ($\mu\text{mol/g}$) y C la concentración (M) de fármaco en el equilibrio, a y b son constantes de valor 3.0 ± 0.3 y 0.77 ± 0.09 , respectivamente. El coeficiente de correlación de la función es 0.9744. Por otro lado, no existe ningún efecto apreciable de la concentración de fármaco sobre el aspecto de la suspensión de nanosferas que se obtiene.

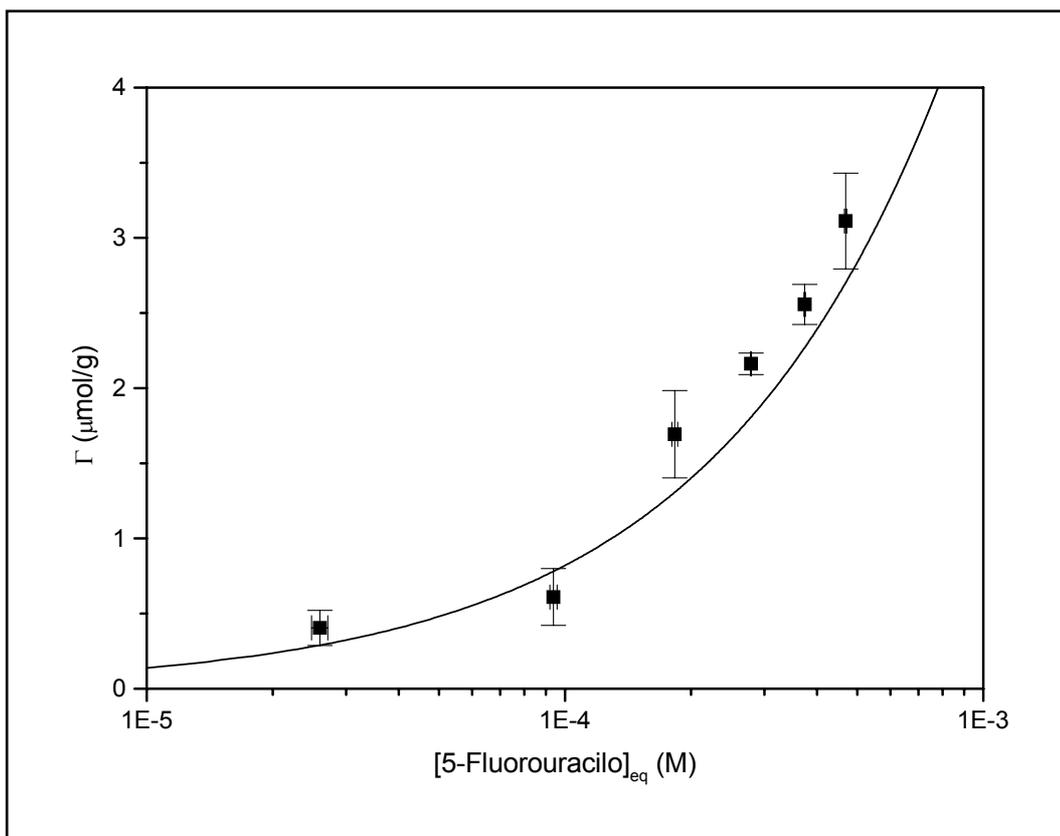


Fig. 56: Densidad de absorción ($\mu\text{mol/g}$) de 5-fluorouracilo en función de la concentración de este en el equilibrio.

5.5.5. Incorporación en condiciones óptimas.

A lo largo del estudio de la influencia sobre la capacidad de incorporación de 5-fluorouracilo por las nanosferas de poli(etil-2-cianoacrilato) de los principales factores modificables de su síntesis, se han logrado establecer las condiciones adecuadas para una incorporación óptima en la matriz polimérica. Estas condiciones son:

- Una concentración de etil-2-cianoacrilato del 1 % (p/v): no es necesaria una concentración mayor ya que el único efecto que provoca este incremento es un aumento de la cantidad de nanopartículas generadas, pero no inducirá que las nanosferas porten una mayor cantidad de fármaco.

- Una concentración de dextrano-70 del 1 % (p/v): su presencia no afecta a la vehiculización del anticancerígeno, pero ejerce un papel decisivo en la obtención de suspensiones muy estables de nanosferas de distribución homogénea, reducido tamaño y elevada uniformidad, en las que no se aprecian macrocoágulos ni precipitados sólidos.
- Una concentración de HCl 10^{-4} M: un medio de polimerización con un pH excesivamente ácido merma la incorporación del anticancerígeno en las nanosferas poliméricas. No se utilizará una concentración de HCl menor para evitar la reducción del rendimiento de la síntesis con vistas a una administración parenteral.
- Una concentración de 5-fluorouracilo $4 \cdot 10^{-4}$ M: es la máxima que nos permite utilizar la técnica espectrofotométrica utilizada. El aumento de la concentración de 5-fluorouracilo en el medio de polimerización incrementa la eficacia de captación.

Bajo estas condiciones y según la rutina conocida de síntesis, obtendremos las nanosferas de polímero con la mayor incorporación de antineoplásico posible. De forma breve, la adición del monómero (1 % p/v) se realizó de forma progresiva, bajo agitación mecánica (1000 rpm), en 50 mL de un medio de polimerización 10^{-4} N de HCl, con una concentración $4 \cdot 10^{-4}$ M de 5-fluorouracilo y un 1 % (p/v) de dextrano-70. Una vez finalizada la polimerización total del monómero (3 horas), se procedió a la neutralización del medio con cantidad suficiente de KOH para asegurar el final de la polimerización. La suspensión de aspecto lechoso resultante fue sometida a una centrifugación a 17000 rpm durante 25 minutos, obteniéndose un sobrenadante que fue sometido a una nueva centrifugación a 17000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante transparente obtenido se comparará con la muestra del medio, tomada antes de adicionar el monómero, mediante la metodología espectrofotométrica ya descrita y justificada. Cada uno de los medios de polimerización, las muestras de estos retiradas y los

respectivos sobrenadantes, estuvieron en todo momento protegidos de la luz ambiental. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

En la Fig. 57 se recogen los espectros de absorción del medio de polimerización y del sobrenadante obtenidos tras la síntesis con una concentración $4 \cdot 10^{-4}$ M de 5-fluorouracilo. Es evidente la disminución de la absorbancia con respecto al espectro del medio de polimerización del pico localizado a 265 nm, sin necesidad de corregir los espectros de los sobrenadantes de la síntesis [Fig. 57 (a)]. Como muestra la Fig. 57 (b), la eliminación de la absorbancia de los residuos de la polimerización acentúa aún más el descenso de este pico. Por ello, puede concluirse que la absorción de 5-fluorouracilo en la matriz de las nanosferas poliméricas es marcada y mayor, 3.1 ± 0.3 $\mu\text{mol/g}$ frente a 2.56 ± 0.13 $\mu\text{mol/g}$, que la obtenida utilizando las condiciones normales [Fig. 56; HCl $2 \cdot 10^{-3}$ M, dextrano-70 0.5 % (p/v)]; esto supone un incremento del 25 % gracias a la optimización de las condiciones de síntesis.

En la Tabla 10 recogemos la comparación entre los datos de incorporación de 5-fluorouracilo [% (p/p)] obtenidos por otros autores en nanopartículas de diferente naturaleza (216) y el logrado mediante la optimización de las condiciones de síntesis de las nanosferas de poli(etil-2-cianoacrilato). Como puede apreciarse, se ha logrado mejorar el grado de vehiculización obtenido en las nanopartículas de poli(butilcianoacrilato), a pesar de su mejor capacidad para incorporar fármaco por la mayor longitud de su sustituyente alquílico (220). Además, se mejora la captación obtenida en las nanopartículas de Eudragit y casi se igualan los valores alcanzados por las nanopartículas de poli(caprolactona) y poli(lactida-co-glicolida).

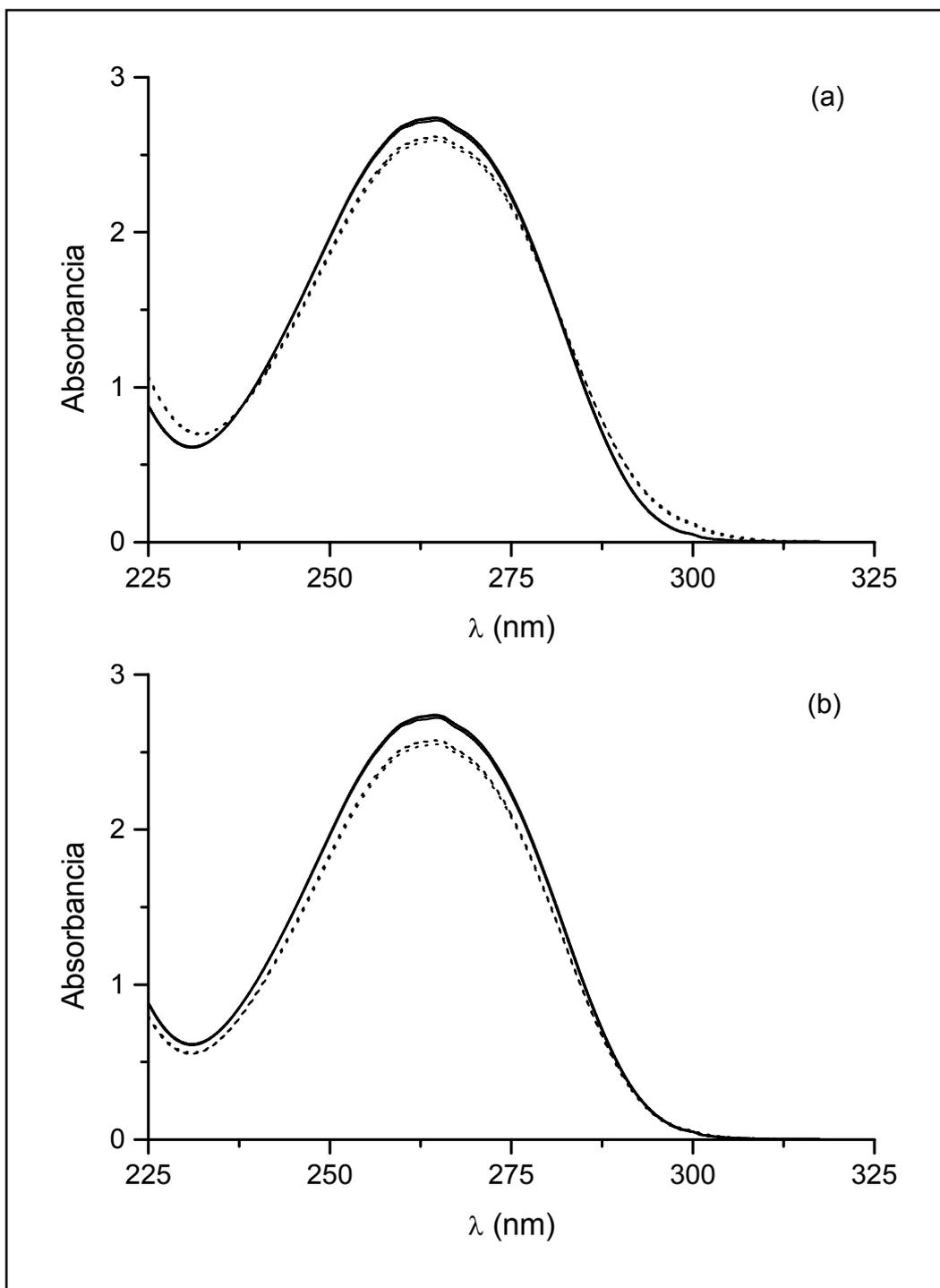


Fig. 57: Estudio de la absorción de 5-fluorouracilo por poli(etil-2-cianoacrilato), considerando (a) y eliminando (b) la absorbancia de los residuos de la polimerización. La concentración molar de fármaco utilizada es $4 \cdot 10^{-4}$. Se recogen los espectros de los 3 ensayos realizados. Línea continua (-): medio polimerización de referencia; línea discontinua (---) sobrenadante síntesis.

Tabla 10: Absorción [% (p/p)] de 5-fluorouracilo en diferentes tipos de nanopartículas.

Tipo de material	Absorción [% (p/p)]
Poli(etil-2-cianoacrilato)	0.041 ± 0.004
Poli(butilcianoacrilato)	0.032 ± 0.001
Poli(caprolactona)	0.054 ± 0.004
Poli(lactida-co-glicolida)	0.051 ± 0.005
Eudragit	0.031 ± 0.001

La optimización de la síntesis nos ha permitido obtener una eficacia de encapsulación del 8 ± 1 %, similar a los valores máximos alcanzados en liposomas (nunca mayores del 10 %), con concentraciones superiores de 5-fluorouracilo, mediante la optimización de su composición lipídica y sus procedimientos de preparación (228). Además, las nanosferas de la familia de los poli(alquilocanoacrilatos) presentan una mayor estabilidad en fluidos biológicos y en almacenamiento que los liposomas (228, 229).

5.6. INCORPORACIÓN DEL 5-FLUOROURACILO EN LAS PARTÍCULAS COMPUESTAS.

Una vez determinado el mecanismo y las condiciones óptimas de incorporación del 5-fluorouracilo en las nanosferas de poli(etil-2-cianoacrilato), aplicaremos estas conclusiones a la síntesis de las partículas compuestas. De esta manera, pretendemos lograr una captación óptima del antineoplásico por unas partículas constituidas por un núcleo magnético y un recubrimiento polimérico biodegradable, cuya síntesis ha sido a su vez mejorada como hemos descrito en el segundo capítulo (Apartado 2.1.3.). La única modificación con respecto a las condiciones de síntesis que permiten una óptima captación del anticancerígeno, es la presencia en el medio de polimerización de los núcleos de magnetita.

La adición del monómero [1 % (p/v)] se realizó de forma progresiva, bajo agitación mecánica (1000 rpm), en 50 mL de un medio de polimerización 10^{-4} N de HCl y $4 \cdot 10^{-4}$ M de 5-fluorouracilo, con una concentración de magnetita del 0.75 % (p/v) y un 1 % (p/v) de dextrano-70. Una vez finalizada la polimerización total del monómero (3 horas), se neutralizó el medio con cantidad suficiente de KOH para asegurar el final de la polimerización. Si bien la limpieza de las partículas compuestas se realiza mediante separación magnética para lograr la eliminación de los residuos de polimerización y las nanosferas de polímero formadas, someteremos la suspensión obtenida al tratamiento de doble centrifugación ya descrito en las partículas poliméricas, con el objetivo de determinar la incorporación del antineoplásico en el conjunto nanopartículas compuestas-poliméricas. El sobrenadante transparente obtenido se comparará con la muestra del medio, tomada antes de adicionar el monómero, mediante la metodología espectrofotométrica ya descrita y justificada. Cada uno de los medios de polimerización, las muestras de estos retiradas y los respectivos sobrenadantes, estuvieron en todo momento protegidos de la luz ambiental. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

En la Fig. 58 se recogen los espectros de absorción del medio de polimerización y del sobrenadante obtenidos tras la síntesis. Al igual que en la síntesis que permite una captación óptima del antineoplásico por el polímero, queda patente la reducción en la intensidad del pico a 265 nm con respecto al espectro del medio de polimerización, sin necesidad de corregir los espectros de los sobrenadantes de la síntesis [Fig. 58 (a)]. Como muestra la Fig. 58 (b), la corrección del espectro acentúa aún más el descenso de este pico y se aprecia que es mayor que el observado en el espectro corregido de las nanopartículas poliméricas [Fig. 57 (b)].

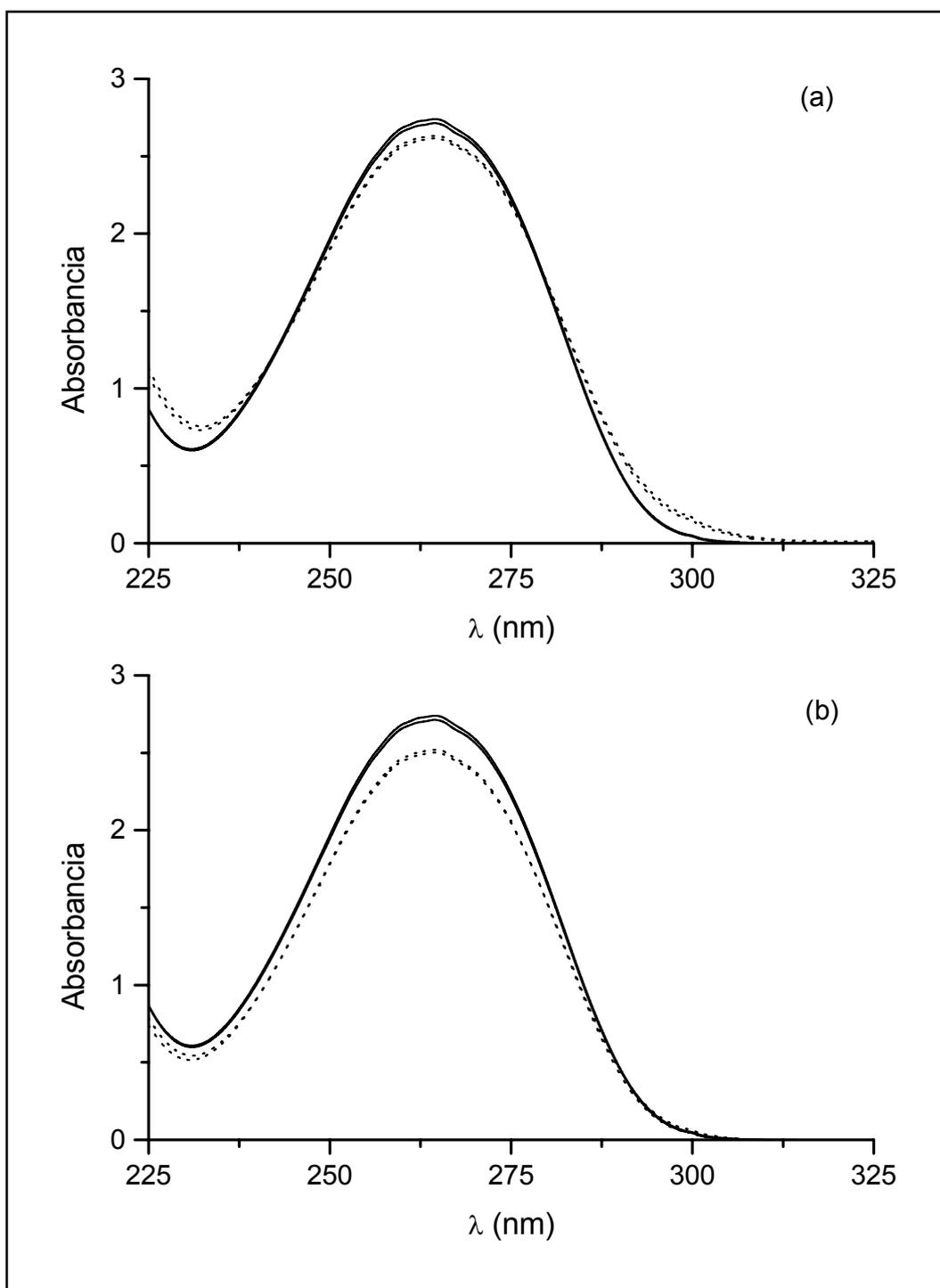


Fig. 58: Estudio de la absorción de 5-fluorouracilo por las partículas compuestas, considerando (a) y eliminando (b) la absorbancia de los residuos de la polimerización. La concentración molar de fármaco utilizada es $4 \cdot 10^{-4}$. Se recogen los espectros de los 3 ensayos realizados. Línea continua (-): medio polimerización de referencia; línea discontinua (---) sobrenadante síntesis.

La absorción de 5-fluorouracilo desarrollada por el conjunto partículas compuestas-poliméricas es mayor que la conseguida por las nanosferas poliméricas, $4.16 \pm 0.09 \mu\text{mol/g}$ frente a $3.1 \pm 0.4 \mu\text{mol/g}$ en la síntesis optimizada y frente a $2.56 \pm 0.13 \mu\text{mol/g}$ en la síntesis normal; esto supone un incremento en la absorción del 35 % y del 65 %, respectivamente. Este aumento en la captación mecánica de fármaco con respecto a la síntesis optimizada de las nanosferas de poli(etil-2-cianoacrilato), lo atribuimos a la contribución de las interacciones entre los núcleos magnéticos y la cadena polimérica en crecimiento. La elevada superficie específica de la magnetita y las fuerzas que favorecen el recubrimiento mecánico de los núcleos magnéticos (96) pueden ser las responsables del incremento en la captación de 5-fluorouracilo ya que, además del fármaco incorporado en la matriz polimérica, se producirá la captación puramente mecánica en la interfaz núcleo-recubrimiento. Como ya se ha indicado, la adsorción superficial del fármaco es inexistente o errática en estos materiales por lo que no se espera una contribución significativa a la incorporación.

Si tenemos en cuenta el peso relativo del recubrimiento de las partículas sintetizadas cuando la proporción de peso inicial es de 4:3 (Tabla 2), podemos determinar que la vehiculización por las partículas compuestas es $2.08 \pm 0.16 \mu\text{mol/g}$. Esta capacidad de incorporación [$0.027 \pm 0.002 \%$ (p/p)] es menor que la obtenida por las nanosferas de poli(etil-2-cianoacrilato) [$0.041 \pm 0.004 \%$ (p/p)], y se debe a la formación de nanosferas poliméricas como subproductos de síntesis, las cuales también absorben fármaco. Como la principal incorporación se realiza en la matriz polimérica, es lógico que en las partículas compuestas se produzca una menor incorporación debido a la menor proporción de polímero presente en estas.

A pesar de esto y comparando con los valores de la Tabla 10, la vehiculización es adecuada, sin olvidar las posibilidades que aporta la capacidad de respuesta magnética adquirida. La eficacia de encapsulación de las partículas compuestas ($6.3 \pm 0.5 \%$) no es mucho menor que la máxima lograda en liposomas (228). Por lo tanto, la incorporación de núcleos magnéticos en la matriz

polimérica no implica una pérdida significativa en la capacidad de vehiculización de 5-fluorouracilo por las nanosferas, y además permite que estas adquieran propiedades de respuesta magnética con todo lo que ello puede implicar desde el punto de vista su uso terapéutico.

Capítulo 6.
CONCLUSIONES

Del presente trabajo de investigación, cuyo principal objetivo es la vehiculización, bajo condiciones óptimas, del antineoplásico 5-fluorouracilo por nanopartículas compuestas de un núcleo magnético y un recubrimiento polimérico biodegradable, se pueden resumir las principales aportaciones en las siguientes conclusiones:

1. Sobre la síntesis de las nanopartículas compuestas.

Se ha puesto a punto un procedimiento reproducible de síntesis de partículas coloidales esféricas de composición mixta, formadas por un núcleo magnético (magnetita) y un recubrimiento polimérico [poli(etil-2-cianoacrilato)] biodegradable.

Para optimizar las condiciones de la síntesis, se analizó el efecto de la proporción inicial de pesos monómero:magnetita sobre las partículas compuestas obtenidas, y se concluyó que la relación 4:3 (monómero:magnetita) es la óptima para la realización de la síntesis de las partículas compuestas.

De esta manera, se ha logrado el diseño de un sistema de liberación controlada de fármaco constituido por un núcleo magnético, responsable del pequeño tamaño, morfología esférica y propiedades magnéticas de las partículas obtenidas; y por un recubrimiento polimérico, muy apropiado para el transporte y liberación controlada de fármaco.

2. Sobre la estructura y composición química.

Mediante la comparación de los difractogramas de rayos X obtenidos para la magnetita y las partículas compuestas con el patrón ASTM de la magnetita, se comprobó la perfecta coincidencia de las líneas de estos difractogramas con las del patrón. Esto permite identificar las muestras como magnetita y observar la elevada cristalinidad de ésta. Además, al comparar los difractogramas entre sí se

observó cómo el recubrimiento polimérico provoca una atenuación de los picos de la magnetita.

El análisis del espectro de infrarrojos constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento, ya que permitió la identificación de los grupos funcionales del polímero y una banda característica de la magnetita en las partículas compuestas. Las bandas del espectro de las partículas compuestas son menos intensas debido a la presencia de una menor cantidad de polímero en éstas.

Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de las partículas poliméricas, permitieron la identificación de los diferentes grupos funcionales del polímero y, junto con el espectro de infrarrojos, constituyen una prueba de la obtención de las partículas de poli(etil-2-cianoacrilato) por polimerización del monómero correspondiente.

El estudio del espectro de masas de ión secundario de las nanosferas poliméricas nos permitió determinar su peso molecular. De esta forma se observó que el polímero más abundante presenta un peso molecular en torno a 861 Da y está constituido por la asociación de 7 monómeros.

El análisis de las propiedades magnéticas mediante la determinación de la curva de primera imanación y el ciclo de histéresis de la magnetita y de las partículas compuestas, permitió apreciar cómo el recubrimiento polimérico reduce la imanación de la muestra. Sin embargo, el comportamiento de la magnetita y de las partículas compuestas es muy similar.

Por lo tanto, de este apartado puede concluirse que nuestras partículas compuestas cumplen el requisito que buscábamos: su superficie es comparable a la del polímero, pero tienen la propiedad de ser magnetizables, por lo que constituyen un vehículo ideal para el transporte de fármacos.

3. Sobre las propiedades eléctricas superficiales.

El estudio comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de partículas mediante electroforesis constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento. Este oculta muy eficazmente el núcleo magnético, haciendo que la superficie de las partículas compuestas sea indistinguible de la de las partículas de polímero.

El análisis preliminar de la estabilidad del recubrimiento mediante el estudio electrocinético de las partículas compuestas con el tiempo, mostró cómo el comportamiento de éstas se aproxima al de la magnetita en agua. Es interesante destacar cómo la electrocinética hace intuir la velocidad de degradación, un aspecto fundamental cuando se trabaja con el mecanismo de liberación de un fármaco en el lugar deseado.

Del estudio de la estabilidad de las propiedades eléctricas superficiales de la magnetita se concluyó que la magnetita es intrínsecamente inestable en agua, desde el punto de vista de las propiedades eléctricas superficiales, por lo que el potencial zeta y la movilidad electroforética pueden aportar información siempre sobre las características de envejecimiento del material.

4. Sobre la termodinámica superficial.

Utilizando un modelo termodinámico aplicable a la interfase sólido/líquido, ha sido posible llevar a cabo una completa caracterización termodinámica superficial de las partículas sintetizadas. Para ello, se ha realizado la determinación experimental del ángulo de contacto sobre comprimido y sobre una placa de vidrio recubierta con una fina capa de sólido en suspensión de diclorometano, con el objeto de contrastar resultados.

El modelo permite caracterizar el sólido mediante tres componentes de su energía libre superficial: γ_S^{LW} (Lifshitz-van der Waals, representativa de las

interacciones no polares o dispersivas en la interfase), γ_S^+ (aceptor de electrones o ácido de Lewis) y γ_S^- (donante de electrones o base de Lewis).

La diferente naturaleza de las superficies de magnetita, poli(etil-2-cianoacrilato) y partículas compuestas, se manifiesta en cambios sufridos por las interacciones interfaciales entre el sólido y los líquidos de ensayo, y en general, en diferentes contribuciones a la energía superficial total de cada tipo de sólido.

Obviamente, estos cambios en la energía libre superficial se manifiestan en las características hidrófobas/hidrófilas de los diferentes materiales. La naturaleza hidrófila de la magnetita se pierde al ser recubierta por el polímero hidrófobo, lo que se considera una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento.

Empleando la información obtenida del estudio electrocinético y termodinámico de nuestros materiales, hemos justificado el mecanismo de formación de la capa de recubrimiento polimérico sobre los núcleos magnéticos. Esta se genera como consecuencia de la atracción electrostática entre las partículas de magnetita cargadas positivamente y los carbaniones de polímero con carga negativa, lo que induce la concentración de los últimos en las inmediaciones de la superficie de la magnetita. El recubrimiento polimérico termina de forjarse gracias a que las interacciones ácido-base y de van der Waals son netamente atractivas. Es decir, termodinámicamente es más favorable para el polímero permanecer en contacto con la magnetita que estar aislado en el agua.

5. Sobre la capacidad de vehiculización de 5-fluorouracilo.

El análisis de las condiciones óptimas de trabajo (pH, temperatura y luz) con las disoluciones de 5-fluorouracilo, ha permitido establecer una rutina de laboratorio que garantice la estabilidad de las disoluciones durante todo el proceso.

Se ha realizado un estudio detallado de la influencia del pH del medio de polimerización en la estabilidad de las nanosferas poliméricas, apreciándose cómo la concentración de OH^- compromete la integridad de las nanopartículas. Este hecho se pone de manifiesto por un aumento de la velocidad de degradación con la concentración de este ion. El desarrollo de este proceso queda perfectamente caracterizado mediante la descripción de la evolución temporal de la apariencia, conductividad, propiedades espectrofotométricas y pH de las suspensiones de poli(etil-2-cianoacrilato).

Para la determinación de la incorporación de fármaco por los materiales estudiados, se ha diseñado un procedimiento original que permite esta cuantificación de forma reproducible, fundamentado en técnicas espectrofotométricas. Este método está basado en la corrección de los valores de absorción obtenidos tras el ensayo de vehiculización, mediante la eliminación de las absorbancias generadas por los residuos de la polimerización del monómero y por los restos de especies presentes en el medio. Se ha analizado la contribución de las diferentes variables de la síntesis (concentración de monómero, de agente estabilizador, de fármaco y de HCl) a esta señal de fondo.

El análisis de la incorporación superficial de 5-fluorouracilo en nuestros materiales, mediante técnicas espectrofotométricas y electroforéticas, pone de manifiesto una adsorción superficial errática o inexistente. Esto es lógico si tenemos en cuenta el carácter no iónico e hidrófilo del antineoplásico, frente al carácter hidrófobo de las nanosferas poliméricas.

De la contribución de las variables de la síntesis sobre la incorporación de 5-fluorouracilo en la matriz, cabe destacar el papel desempeñado por el pH del medio de polimerización y por la concentración de fármaco. Un pH moderadamente ácido ($\text{pH} = 4$) permite una rápida cinética de polimerización, lo que induce una mayor captación mecánica de antineoplásico en la matriz hidrófoba. Por otro lado, al incrementarse la concentración de 5-fluorouracilo, mayor cantidad de este se encontrará disponible para ser captada. En cuanto a la

concentración de monómero, su aumento no conlleva una mejora de la vehiculización y sí el incremento del número de nanosferas generadas. La presencia de dextrano-70 en el medio no afecta a la vehiculización, pero sí a la calidad de la suspensión obtenida para uso parenteral.

Del análisis espectrofotométrico de la influencia de estas variables de la polimerización, se obtienen las condiciones de síntesis que permiten una incorporación óptima de fármaco. El método propuesto mejora los resultados obtenidos con otros miembros de la familia de poli(alquilocianoacrilatos) e iguala o supera los obtenidos en otros vehículos.

La incorporación de los núcleos magnéticos en la síntesis de las nanosferas poliméricas, según las condiciones óptimas de recubrimiento y vehiculización de 5-fluorouracilo, permite la obtención de unas partículas compuestas que prácticamente no ven mermada su capacidad de transporte con respecto al polímero puro, y presentan la ventaja que aportan los núcleos magnéticos al reducir el tamaño de las nanopartículas resultantes y dotarlas de propiedades de respuesta magnética, con todo lo que ello implica desde el punto de vista terapéutico.

Capítulo 7.
BIBLIOGRAFÍA

1. Craig D. Q. M., “*Dispersions as Pharmaceutical Dosage Forms*”. En: “*Technological Applications of Dispersions*”, Ed.: Williams R. A., Marcel Dekker, New York, pp. 457-497 (1994).
 2. Pieters B. R., Williams R. A., Webb C., “*Magnetic Carrier Technology*”. En: “*Colloid and Surface Engineering: Applications in the Process Industries*”, Ed.: Williams R. A., Butterworth-Heinemann, Oxford, pp. 248-286 (1994).
 3. Meyers P. H., Cronin F., Nice C. M. Jr., *AJR*, **90**, 1068 (1963).
 4. Alksne J. F., Fingerhut A. G., Rand R. W., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, **30**, 159 (1967).
 5. Robinson P. J., Dunnill P., Lilly M. D., *Biotechnol. Bioeng.*, **15**(3), 603 (1973).
 6. Kronick P. L., Campbell G. L., Joseph K., *Science*, **200**, 1074 (1978).
 7. Zimmerman U., Pilwat G., *Naturforschungen*, **31C**, 732 (1976).
 8. Widder K. J., Senyei A. E., Scarpelli D. G., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **158**, 141 (1978).
 9. Widder D. J., Edelman R. R., Grief W. L., Monda L., *AJR*, **149**, 839 (1987).
 10. Saini S., Stark D. D., Hahn P. F., Wittenberg J., Brady J. T., Ferrucci J. T., *Radiology*, **162**, 211 (1987).
 11. Stolnik S., Illum L., Davis S. S., *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **16**, 195 (1995).
-

12. Gupta P. K., Hung C. T., “*Magnetically Controlled Targeted Chemotherapy*”. En: “*Microspheres and Regional Cancer Therapy*”, Eds.: Willmott N., Daly J., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 71-116 (1994).

 13. Senyei A., Widder K. J., Czerlinski G., *J. Appl. Phys.*, **49**, 3578 (1978).

 14. Pouliquen D., Chouly C., “*Magnetic Microcarriers for Medical Applications*”. En: “*The MML Series (Vol. 2): Medical & Biotechnology Applications*”, Ed.: Arshady R., Citus Books, Londres, pp. 343-382 (1999).

 15. Belikov V. G., Kuregyan A. G., *Pharm. Chem. J.*, **35**(2), 88 (2001).

 16. Lewis D. A., Alpar H. O., *Int. J. Pharm.*, **22**, 137 (1984).

 17. Sprandel U., Lanz D.-J., von Horsten W., *Method. Enzymol.*, **149**, 301 (1987).

 18. Vyas S. P., Jain S. K., *J. Microencapsulation*, **11**(1), 19 (1994).

 19. Ibrahim A., Couvreur P., Roland M., Speiser P., *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**, 59 (1983).

 20. Hung C. T., McLeod A. D., Gupta P. K., *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **16**, 509 (1990).

 21. Mosbach K., Schroder U., *FEBS Lett.*, **102**, 112 (1979).

 22. Mosbach K., Schroder U., *Enz. Eng.*, **5**, 239 (1981).

 23. Morimoto Y., Akimoto M., Yotsumoto Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**(8), 3024 (1982).
-

-
24. Morimoto Y., Sugibayashi K., Akimoto M., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**(1), 279 (1983).
 25. Morimoto Y., Akimoto M., *Biomaterials*, **4**, 49 (1983).
 26. Kiwada H., Sato J., Yamada S., Kato Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4253 (1986).
 27. Kharkevich D. A., Alyautdin R. N., Filippov V. I., *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**, 286 (1989).
 28. Zavadskii S. P., Cherkasova O. G., Kharitonov Yu. Ya., *Pharm. Chem. J.*, **34**(10), 558 (2000).
 29. Iannone A., Magin R. L., Walczack T., Federico M., Swartz H. M., Tomasi A., Vannini V., *Magn. Reson. Med.*, **22**, 435 (1991).
 30. Müller R. H., Maaßen S., Weyhers H., Specht F., Lucks J. S., *Int. J. Pharm.*, **138**, 85 (1996).
 31. Okon E., Pouliquen D., Okon P., Kovaleva Z. V., Stepanova T. P., Lavit S. G., Kudryavtsev B. N., Jallet P., *Lab. Invest.*, **71**(6) 895 (1994).
 32. Gupta P. K., Hung C. T., *Int. J. Pharm.*, **43**, 167 (1988).
 33. Gupta P. K., Gallo J. M., Hung C. T., Perrier D. G., *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **13**, 1471 (1987).
 34. Gallo J. M., Gupta P. K., Hung C. T., Perrier D. G., *J. Pharm. Sci.*, **78**, 190 (1989).
 35. Widder K. J., Senyei A. E., Ranney D. F., *Canc. Res.*, **40**, 3512 (1980).
-

36. Gupta P. K., Hung C. T., Perrier D. G., *Int. J. Pharm.*, **33**, 137 (1986).
 37. Widder K. J., Flouret G., Senyei A., *J. Pharm. Sci.*, **68**, 79 (1979).
 38. Widder K. J., Morris R. M., Poore G., Howard D. P. Jr., Senyei A. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**(1), 579 (1979).
 39. Senyei A. E., Reich S. D., Gonczy C., Widder K. J., *J. Pharm. Sci.*, **70**, 389 (1981).
 40. Kato T., Nemoto R., Mori H., Abe R., Unno K., Goto A., Murota H., Harada M., Homma M., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **10**, 199 (1984).
 41. Kato T., Nemoto R., Mori H., Unno K., Goto A., Harada M., Homma M., *Proc. Jpn. Acad.*, **55**, 470 (1979).
 42. Samokhin B. P., Domogatsky S. P., *Zh. Vses. Khim. Ova.*, **32**, 527 (1987).
 43. Jain S. K., Vyas S. P., *J. Microencapsulation*, **11**, 141 (1994).
 44. Langer R., *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **30**(8), 524 (1983).
 45. Kost J., Noecker R., Kunica E., Langer R., *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**(8), 935 (1985).
 46. Saslawski O., Weingarten C., Benoit J. P., Couvreur P., *Life Sci.*, **42**, 1521 (1988).
 47. Kato T., Nemoto R., Mori H., Kumagai I., *Lancet*, **2**, 479 (1979).
 48. Kato T., Nemoto R., Mori H., Takahashi M., Harada M., *Cancer*, **48**, 674 (1981).
-

-
49. Kato T., Nemoto R., Mori H., Takahashi M., Tamakawa Y., Harada M., *J.A.M.A.*, **245**, 1123 (1981).
50. Kato T., “*Encapsulated Drugs in Targeted Cancer Therapy*”. En: “*Controlled Drug Delivery (Vol. 2)*”, Ed.: Bruck S. D., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 189-192 (1982).
51. Goldberg J. A., Kerr D. J., Blackie R., Whately T. L., Pettit L., Kato T., McArdle C. S., *Cancer*, **67**, 952 (1991).
52. Audisio R. A., Doci R., Mazzaferro V., Bellegotti L., Tommasini M., Montalto F., Machiano A., Piva A., DeFazio C., Damascelli B., Gerranri L., van Thiel D. H., *Cancer*, **66**, 228 (1990).
53. Kato T., Nemoto R., Mori H., Iwata K., Sato S., Unno K., Murota H., Echigo M., Harada M., Homma M., *J. Jap. Soc. Cancer Ther.*, **15**, 33 (1980).
54. Sako M., Hirota S., *Jpn. J. Cancer Chemother.*, **13**(4): part. II, 1618 (1986).
55. Widder K. J., Morris R. M., Poore G. A., Howard D. P., Senyei A. E., *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **19**, 135 (1983).
56. Morris R. M., Poore G. A., Howard D. P., Sefranka J. A., “*Selective Targeting of Magnetic Albumin Microspheres Containing Vindesine Sulphate: Total Remission in Yoshida Sarcoma-Bearing Rats*”. En: “*Microspheres and Drug Therapy: Pharmaceutical, Immunological and Medical aspects*”, Eds.: Davis S. S., Illum L., McVie J. G., Tomlinson E., Elsevier, New York, pp. 439-449 (1984).
57. Turner R. D., Rand R. W., Bentson J. R., Mosso J. A., *J. Urol.*, **113**, 455 (1975).
-

58. Sako M., Yokogawa S., Sakamoto K., Adachi S., Hirota S., Okada S., Murao S., *Invest. Radiol.*, **17**, 573 (1982).
59. Barry J. W., Bookstein J. J., Alksne J. F., *Radiology*, **138**, 341 (1981).
60. Ito R., Machida Y., Sannan T., Nagai T., *Int. J. Pharm.*, **61**, 109 (1990).
61. Sugibayashi K., Okumura M., Morimoto Y., *Biomaterials*, **3**, 181 (1982).
62. Charles S. W., Popplewell J., “*Ferromagnetic Liquids*”. En: “*Ferromagnetic Materials (Vol. 2)*”, Ed.: Wohlfarth E. P., North-Holland Publishing Company, pp. 509-559 (1980).
63. Gupta P. K., Hung C.T., “*Magnetically Controlled Targeted Chemotherapy*”. En: “*Microspheres and Regional Cancer Therapy*”, Eds.: Willmott N., Daly J., CRC Press, Boca Raton, pp. 71-116 (1994).
64. Ranney D. F., “*Magnetically Controlled Devices and Biomodulation*”. En: “*Drug Delivery Devices: Fundamentals and Applications*”, Ed.: Tyle P., Marcel Dekker, New York, pp. 325-343 (1988).
65. Gupta P. K., Hung C.T., *Life Sci.*, **44**, 175 (1989).
66. Morimoto Y., Sugibayashi K., Okumura M., Kato Y., *J. Pharm. Dyn.*, **3**, 264 (1980).
67. Widder K. J., Senyei A. E., Scarpelli D. G., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **158**, 141 (1978).
68. Ovadia H., Paterson P. Y., Hale J. R., *Isr. J. Med. Sci.*, **19**, 631 (1983).
69. Gupta P. K., Hung C. T., *J. Microencapsulation*, **7**(1), 85 (1990).
-

-
70. Gaines R. V., Skinner H. C. W., Foord E. E., Mason B., Rosenzweig A., "Dana's New Mineralogy", John Wiley & Sons, Inc., pp. 299-300 (1997).
71. Sugimoto T., Matijević E., *J. Colloid Interface Sci.*, **74**(1), 227 (1980).
72. Kattan J., Droz J. P., Couvreur P., Marino J. P., Boutan-Laroze A., Rougier P., Brault P., Vrankx H., Grognet J. M., Morge X., Sancho-Garnier H., *Invest. New Drugs*, **10**, 191 (1992).
73. Fattal E., Peracchia M. T., Couvreur P., "Poly(alkylcyanoacrylates)". En: "Handbook of Biodegradable Polymers", Eds.: Domb A. J., Kost J., Wiseman D. M., Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 183-202 (1997).
74. Cavallaro G., Fresta M., Giammona G., Puglisi G., Villari A., *Int. J. Pharm.*, **111**, 31 (1994).
75. Cuvier C., Roblot-Treupel L., Millot J. M., Lizard G., Chevillard S., Maufait M., Couvreur P., Poupon M. F., *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 509 (1992).
76. Fattal F., Youssef M., Couvreur P., Andremont A., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**, 1540 (1989).
77. Chavany C., Le Doan T., Couvreur P., Puisieux F., Helene C., *Pharm. Res.*, **9**, 441 (1992).
78. Radwan M. A., Zaghoul I. Y., Aly Z. H., *Europ. J. Pharm. Sci.*, **8**(2), 95 (1999).
79. Alonso M. J., Losa C., Calvo P., Vila-Jato J. L., *Int. J. Pharm.*, **68**, 69 (1991).
-

-
80. Henry-Toulmé N., Decout A., Lalanne J., Nemati F., Dubernet C., Dufourcq J., *J. Colloid Interface Sci.*, **162**, 236 (1994).
81. Hu Y.-P., Jarillon S., Dubernet C., Couvreur P., Robert J., *Cancer Chemoter. Pharmacol.*, **37**, 556 (1996).
82. Decout A., Dubernet C., Henry-Toulmé N., *J. Colloid Interface Sci.*, **181**, 99 (1996).
83. Page M. E., Pinto-Alphandary H., Chachaty E., Andremont A., Couvreur P., *S.T.P. Pharma Sci.*, **6**(4), 298 (1996).
84. Lherm C., Müller R. H., Puisieux F., Couvreur P., *Int. J. Pharm.*, **84**, 13 (1992).
85. Leonard F., Kulkarni R. A., Brandes G., Nelson J., Cameron J. J., *J. Appl. Polym. Sci.*, **10**, 259 (1966).
86. Couvreur P., Dubernet C., Puisieux F., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **41**, 2 (1995).
87. Couvreur P., Kante B., Roland M., Guiot P., Bauduin P., Speiser P., *J. Pharm. Pharmacol.*, **31**, 331 (1979).
88. Couvreur P., Roland M., Speiser P., *Patente EE. UU. 4.329.332* (1982).
89. Seijo B., Fattal E., Roblot-Treupel L., Couvreur P., *Int. J. Pharm.*, **62**, 1 (1990).
90. Lenaerts V., Raymond J., Juhaz J., Simard M. A., Jolicoeur J. J., *J. Pharm. Sci.*, **70**, 1051 (1989).
-

-
91. Al Khouri-Fallouh N., Roblot-Treupel L., Fessi H., Devissaguet J. P., Puisieux F., *Int. J. Pharm.*, **28**, 125 (1986).
 92. Alvotidinov A., *Dokl. Akad. Nauk. Uzb. SSR*, **7**, 41 (1982).
 93. Donnelly E. F., Johnston D. S., Pepper D. C., *Polymer lett.*, **15**, 399 (1977).
 94. Pepper D. C., *J. Polym. Sci.*, **62**, 65 (1978).
 95. Pepper D. C., *Makromol. Chem. Macromol. Symp.*, **60**, 267 (1992).
 96. Arias J. L., Gallardo V., Gómez-Lopera S. A., Plaza R. C., Delgado A. V., *J. Control. Rel.*, **77**, 309 (2001).
 97. Newman A. W., "Micromeritics". En: "*Physical Characterization of Pharmaceutical Solids*", Ed.: Brittain H. G., Marcel Dekker Inc., New York, pp. 253-280 (1995).
 98. López-Gonzales J. D., Carpenter F. G., Deitz V. R., *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, **55**, 11 (1955).
 99. Suryanarayanan R., "X-Ray Powder Diffractometry". En: "*Physical Characterization of Pharmaceutical Solids*", Ed.: Brittain H. G., Marcel Dekker Inc., New York, pp. 187-221 (1995).
 100. Silverstein R. M., Webster F. X., "Infrared Spectrometry". En: "*Spectrometric Identification of Organic Compounds*", 6° Ed., John Wiley & Sons Inc., New York, pp. 71-144 (1998).
 101. Lyon R. J. P., "Infrared Absorption Spectroscopy". En: "*Physical Methods in Determinative Mineralogy*", Ed.: Zussman J., Academic Press, Londres, pp. 371-399 (1967).
-

-
102. Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A., *“Principios de Análisis Instrumental”*, 5° Ed., Mc Graw Hill, Madrid, pp. 481-536 (2001).
 103. Bugay D. E., *“Magnetic Resonance Spectroscopy”*. En: *“Physical Characterization of Pharmaceutical Solids”*, Ed.: Brittain H. G., Marcel Dekker Inc., New York, pp. 93-125 (1995).
 104. Silverstein R. M., Webster F. X., *“Proton Magnetic Resonance Spectrometry”*. En: *“Spectrometric Identification of Organic Compounds”*, 6° Ed., John Wiley & Sons Inc., New York, pp. 144-216 (1998).
 105. Peracchia M. T., Vauthier C., Popa M., Puisieux F., Couvreur P., *S.T.P. Pharma Sci.*, **7**(6), 513 (1997).
 106. Silverstein R. M., Webster F. X., *“¹³C-NMR Spectrometry”*. En: *“Spectrometric Identification of Organic Compounds”*, 6° Ed., John Wiley & Sons Inc., New York, pp. 217-249 (1998).
 107. Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A., *“Principios de Análisis Instrumental”*, 5° Ed., Mc Graw Hill, Madrid, pp. 590-591 (2001).
 108. Fenselau C., Cotter R. J., *Chem. Rev.*, **87**, 501 (1987).
 109. De Pauw E., *Mass Spectrum Revs.*, **5**, 191 (1986).
 110. Cook K. D., Todd P. J., Friar D. J. H., *Biomed. Environ. Mass Spectrum*, **18**, 492 (1989).
 111. Gower J. L., *Biomed. Mass Spectrum*, **12**, 191 (1989).
 112. Callister W. D. Jr., *“Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los Materiales (Tomo II)”*, Reverté, Barcelona, pp. 685-717 (1996).
-

-
113. Mercouroff W., "*Propiétés Magnétiques des Solides et Propiétés Similaires*". En: "*Aspects Modernes de la Physique des Solides*", Masson & Cie, París, pp. 75-103 (1969).
 114. Hunter R. J., "*Foundations of Colloid Science (Vol. I)*", Oxford University Press, Oxford (1987).
 115. Hunter R. J., "*Zeta Potential in Colloid Science*", Academic Press, New York (1981).
 116. Lyklema J., "*Structure of the Solid/Liquid Interface and the Electrical Double Layer*". En: "*Solid/Liquid Dispersions*", Ed.: Tadros T. F., Academic Press, London, pp. 63-90 (1987).
 117. Lyklema J., "*Fundamentals of Interface and Colloid Science (Vol. II): Solid-Liquid Interfaces*", Academic Press, London (1995).
 118. Van Olphen H. J., "*An Introduction to Clay Colloidal Chemistry*", 2º Ed., Wiley, New York (1977).
 119. Russel W. B., Saville D. A., Schowalter W. R., "*Colloidal Dispersions*", Cambridge University Press, Cambridge (1989).
 120. Dukhin S. S., "*Development of Notions as to the Mechanism of Electrokinetic Phenomena and the Structure of the Colloid Micelle*". En: "*Surface and Colloid Science (Vol. VII)*", Ed.: Matijević E., Wiley, New York, pp. 1-47 (1974).
 121. López García J. J., Moya A. A., Horno J. J., Delgado A., González-Caballero F., *J. Colloid Interface Sci.*, **183**, 124 (1996).
 122. Lyklema J., *J. Colloid Interface Sci.*, **58**, 242 (1977).
-

-
123. Dukhin S. S., Derjaguin B. V., “*Equilibrium Double Layer and Electrokinetic Phenomena*”. En: “*Surface and Colloid Science (Vol. VII)*”, Ed.: Matijević E., Wiley, New York, pp. 49-272 (1974).
 124. Zukoski IV C. F., Saville D. A., *J. Colloid Interface Sci.*, **114**, 32 (1986).
 125. Mangelsdorf C. S., White L. R., *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **86**, 2859 (1990).
 126. Mangelsdorf C. S., White L. R., *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **94**, 2441 (1998).
 127. Mangelsdorf C. S., White L. R., *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **94**, 2583 (1998).
 128. Lyklema J., Minor M., *Colloids Surfaces A*, **140**, 33 (1998).
 129. Panofski W. K. H., Phillips M., “*Classical Electricity and Magnetism*”. Addison-Wesley, Reading (1975).
 130. Ohshima H., “*Interfacial Electrokinetic Phenomena*”. En: “*Electrical Phenomena at Interfaces*”, 2° Ed., Eds.: Ohshima H., Furusawa K., Marcel Dekker, New York, pp. 19-55 (1998).
 131. Landau L. D., Lifshitz E. M., “*Fluid Mechanics*”, Pergamon Press, Oxford (1959).
 132. Morrison F. A., *J. Colloid Interface Sci.*, **34**, 210 (1970).
 133. Overbeek J. H. G., *Adv. Colloid Interface Sci.*, **3**, 97 (1950).
-

-
134. James A. M., en: “*Surface and Colloid Science (Vol. IX)*”, Eds.: Good R. J., Stromberg R. S., Plenum Press, New York (1979).
135. Lyklema J., Overbeek J. G., *J. Colloid Interface Sci.*, **16**, 501 (1961).
136. Hunter R. J., *J. Colloid Interface Sci.*, **22**, 231 (1966).
137. Henry D. C., *Proc. Roy. Soc.*, **133A**, 106 (1931).
138. Overbeek J. T. G., *Kolloid Beih.*, **54**, 287 (1943).
139. Booth F., *Trans. Faraday Soc.*, **44**, 955 (1948).
140. Booth F., *Nature*, **161**, 83 (1948).
141. Booth F., *Proc. Roy. Soc.*, **203A**, 514 (1950).
142. Derjaguin B. V., Dukhin S. S., “Nonequilibrium Double Layer and Electrokinetic Phenomena”. En: “*Surface and Colloid Science (Vol. VII)*”, Ed.: Matijević E., Wiley, New York, pp. 273-335 (1974).
143. Wiersema P. H., Loeb A. L., Overbeek J. T. G., *J. Colloid Interface Sci.*, **22**, 78 (1966).
144. O’Brien R. W., White L. R., *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **274**, 1607 (1978).
145. Regazzoni A. E., Blesa M. A., Maroto A. J. G., *J. Colloid Interface Sci.*, **91**(2), 560 (1983).
146. Müller R. H., Lherm J., Herbort J., Blunk T., Couvreur P., *Int. J. Pharm.*, **84**, 1 (1992).
-

-
147. James R. O., Parks G. A., “*Characterization of Aqueous Colloids by their Electrical Double-Layer and Intrinsic Surface Chemical Properties*”. En: “*Surface and Colloid Science (Vol. XII)*”, Ed.: Matijević E., Plenum, New York, pp. 119-216 (1982).
 148. Greenwood N. N., Earnshaw A., “*Chemistry of the Elements*”, cap. 25, Pergamon Press, Oxford (1986).
 149. Castro P. A., Vago E. R., Calvo E. J., *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **92**, 3371 (1996).
 150. Garcell L., Morales M. P., Andrés-Vergés M., *J. Colloid Interface Sci.*, **205**, 470 (1998).
 151. Plaza R. C., Arias J. L., Espín M., Jiménez M. L., Delgado A. V., *J. Colloid Interface Sci.*, **245**, 86 (1998).
 152. Kittaka S., Morimoto T., *J. Colloid Interface Sci.*, **75**, 398 (1980).
 153. Parks G. A., *Chem. Rev.*, **65**, 177 (1965).
 154. Van Oss C. J., Good R. J., Chaudhury M. K., *J. Colloid Interface Sci.*, **111**, 378 (1986).
 155. Keesom W. H., *Physik*, **22**, 129, 643 (1921).
 156. Debye P., *Physik*, **22**, 302 (1921).
 157. London F. Z., *Physik*, **63**, 245 (1930).
 158. Overbeek J. Th. G., “*Electrokinetic Phenomena*”. En: “*Colloid Science (Vol. I)*”, Ed.: Kruyt H. R., Elsevier, Amsterdam (1952).
-

-
159. Fowkes F. M., *J. Phys. Chem.*, **67**, 2538 (1963).
 160. Fowkes F. M., Mostafa M. A., *I. E. C. Prod. Res. Div.*, **17**, 3 (1978).
 161. Chaudhury M. K., Good R. J., *J. Colloid Interface Sci.*, **94**, 292 (1983).
 162. Chaudhury M. K., *J. Controlled Interface Sci.*, **119**, 174 (1987).
 163. Lifshitz E. M., *Zh. Eksp. Teo. Fiz.*, **29**, 94 (1955).
 164. Israelachvili J., “*Intermolecular and Surface Forces*”, 2° Ed., Academic Press, London (1991).
 165. Ninhan B. W., Parsegian V. A., *J. Biophys.*, **10**, 646 (1970).
 166. Parsegian V. A., Ninhan B. W., *Nature*, **224**, 1197 (1969).
 167. Van Olphen H., “*Clay Colloid Chemistry*”, Wiley, New York (1977).
 168. Allen L. M., Matijević E., *J. Colloid Interface Sci.*, **31**, 287 (1969).
 169. Durán J. D. G., Guindo M. C., Delgado A. V., *J. Colloid Interface Sci.*, **173**, 436 (1995).
 170. Vera P., Gallardo V., Salcedo J., Delgado A. V., *J. Colloid Interface Sci.*, **177**, 553 (1995).
 171. Laskowski J. S., Pugh R. J., “*Dispersions Stability and Dispersing Agents*”. En: “*Colloid Chemistry in Mineral Processing*”, Elsevier, London (1992).
-

172. Pashley R. M., “*Interparticulate Forces*”. En: “*Colloid Chemistry in Mineral Processing*”, Ed.: Laskowski J. S., Ralston J., Elsevier, London (1992).
173. Christenson H. K., *J. Disp. Sci. Technol.*, **9**, 171 (1988).
174. Christenson H. K., Horn R. G., *Chemical Scripta*, **25**, 37 (1985).
175. Horn R. G., Israelachvili J., *J. Chem. Phys.*, **75**, 1400 (1981).
176. Good R. J., “*Contact Angle, Wetting and Adhesion: A Critical Review*”. En: “*Contact Angle, Wettability and Adhesion*”, Ed.: Mittal K. L., Utrecht, The Netherlands (1993).
177. Adamson A. W., “*Physical Chemistry of Surfaces*”, 4^o Ed., John Wiley & Sons, New York (1982).
178. Van Oss C. J., *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **78**, 1 (1993).
179. Van Oss C. J., “*Interfacial Forces in Aqueous Media*”, Marcel Dekker Inc., New York (1994).
180. Van Oss C. J., Good R. J., *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A26**, 1183 (1989).
181. Van Oss C. J., Good R. J., Chaudhury M. K., *Sep. Sci. Technol.*, **22**, 1 (1987).
182. Van Oss C. J., Chaudhury M. K., Good R. J., *Adv. Colloid Interface Sci.*, **28**, 35 (1987).
183. Van Oss C. J., Chaudhury M. K., Good R. J., *Chem. Rev.*, **88**, 927 (1988).
-

-
184. Van Oss C. J., Good R. J., Chaudhury M. K., *Langmuir*, **4**, 884 (1988).
185. Good R. J., Girifalco L. A., *J. Phys. Chem.*, **64**, 561 (1960).
186. Derjaguin B. V., *Dis. Faraday Soc.*, **18**, 85 (1954).
187. Hamaker H. C., *Physica*, **4**, 1058 (1937).
188. Visser, *J. Advan. Colloid Interface Sci.*, **3**, 331 (1972).
189. Neumann A., Omenyi S. N., van Oss C. J., *Colloid Polymer Sci.*, **257**, 413 (1979).
190. Chibowski E., Kerkeb M. L., González-Caballero F., *Langmuir*, **9**, 2493 (1993).
191. Durán J. D. G., Delgado A. V., González-Caballero F., Chibowski E., *Mater. Chem. Phys.*, **38**, 42 (1994).
192. Neumann A., Good R. J., *J. Colloid Interface Sci.*, **38**, 341 (1972).
193. Janczuk B., Chibowski E., Bialopiotrowicz T., *J. Colloid Interface Sci.*, **102**, 553 (1984).
194. Janczuk B., Chibowski E., Bialopiotrowicz T., *Mater. Chem. Phys.*, **15**, 489 (1987).
195. Janczuk B., Chibowski E., Bialopiotrowicz T., González-Caballero F., *Colloids and Surfaces*, **35**, 41 (1989).
196. Good R. J., *J. Colloid Interface Sci.*, **59**, 3 (1977).
-

-
197. Chibowski E., González-Caballero F., *Langmuir*, **9**, 330 (1993).
198. Plaza R. C., Zurita L., Durán J. D. G., González-Caballero F., Delgado A. V., *Langmuir*, **14**, 6850 (1998).
199. Chibowski E., *J. Adhesion Sci. Technol.*, **6**, 1069 (1992).
200. Chibowski E., Holysz L., *Langmuir*, **8**, 710 (1992).
201. Janczuk B., Chibowski E., Guindo M.C., Wójcik W., González-Caballero F., *Mater. Chem. Phys.*, **37**, 64 (1993).
202. Flórez J., “*Quimioterapia Antineoplásica I. Principios Fundamentales. Antimetabolitos, Fijadores de la Tubulina, Inhibidores de Topoisomerasas*”. En: “*Farmacología Humana*”, 3º Ed., Ed.: Flórez J., Maason S. A., Barcelona, pp. 1019-1038 (1997).
203. Couvreur P., Grislain L., Lenaerts V., Brasseur P., Guiot P., Biernacki A., “*Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Carrier for Antitumor Agents*”, En: “*Polymeric Nanoparticles and Microspheres*”, Ed.: Guiot P., Couvreur P., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 27-93 (1986).
204. Chiannikulchai N., Drionich Z., Benoît J. P., Parodi A. L., Couvreur P., *Select. Cancer Ther.*, **5**, 1 (1989).
205. Chiannikulchai N., Ammoury N., Caillon B., Devissaguet J. Ph., Couvreur P., *Cancer Chem. Pharm.*, **26**, 122 (1990).
206. de Verdière A. C., Dubernet C., Nèmati F., Soma E., Appel M., Ferté J., Bernard S., Puisieux F., Couvreur P., *British J. Cancer*, **76**(2), 198 (1997).
-

-
207. Nèmati F., Dubernet C., Fessi H., de Verdière A. C., Poupon M. F., Puisieux F., Couvreur P., *Int. J. Pharm.*, **138**, 237 (1996).
208. Juliano R. L., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2**, 31 (1988).
209. Lemaire L., Arellano M., Malet-Martino M. C., Martino R., De Forni M., *Bull. Cancer*, **81**(12), 1057 (1994).
210. Sikora K., Advani S., Koroltchouk V., Magrath I., Levy L., Pinedo H., Schwartzmann G., Tattersall M., Yan S., *Annals of Oncology*, **10**, 385 (1999).
211. Bertolini A., *Minerva Cardioangiol.*, **47**(7-8), 269 (1999).
212. Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A.. “*Principios de Análisis Instrumental*”, 5º Ed., Mc Graw Hill, Madrid, pp. 322-352 (2001).
213. Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A.. “*Principios de Análisis Instrumental*”, 5º Ed., Mc Graw Hill, Madrid, pp. 353-378 (2001).
214. Barberi-Heyob M., Watelet M., Merlin J. L., Bleyer C., Schroeder B., *Bull. Cancer.*, **82**(12), 1025 (1995).
215. Peracchia M. T., Fattal E., Desmaële D., Besnard M., Noël J. P., Gomis J. M., Appel M., d’Angelo J., Couvreur P., *J. Control. Rel.*, **60**, 121 (1999).
216. McCarron P. A., Woolfson A. D., Keating S. M., *J. Pharm. Pharmacol.*, **52**, 1451 (2000).
217. Zhuo R. X., Du B., Lu Z. R., *J. Control. Rel.*, **57**, 249 (1999).
-

218. Fawaz F., Guyot M., Laguény A. M., Devissaguet J. Ph., *Int. J. Pharm.*, **154**, 191 (1997).
219. Müller R. H., Lherm C., Herbort J., Couvreur P., *Colloid Polym. Sci.*, **269**, 147 (1991).
220. Soppimath K. S., Aminabhavi T. M., Kulkarni A. R., Rudzinski W. E., *J. Control. Rel.*, **70**, 1 (2001).
221. Radwan M. A., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **21**(20), 2371 (1995).
222. Baszkin A., Couvreur P., Deyme M., Henry-Michelland S., Albrecht G., *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 973 (1987).
223. Llovet M. I., Egea M. A., Valero J., Alsina M. A., García M. L., Chauvet A., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **21**(15), 1761 (1995).
224. Stolnik S., Illum L., Davis S. S., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **16**, 195 (1995).
225. <http://bioprocess.apbiotech.com>.
226. Fontana G., Pitarresi G., Tomarchio V., Carlisi B., San-Biagio P. L., *Biomaterials*, **19**, 1009 (1998).
227. Losa C., Calvo P., Castro E., Vila-Jato J. L., Alonso M. J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **43**, 548 (1991).
228. Gulati M., Grover M., Singh S., Singh M., *Int. J. Pharm.*, **165**, 129 (1998).
229. Gibaud S., Rousseau C., Weingarten C., Favier R., Douay L., Andreux J. P., Couvreur P., *J. Control. Rel.*, **52**, 131 (1998).
-

