



I Congreso Nacional Multidisciplinar de Jóvenes Investigadores

Web Congreso: <http://comujin.blogspot.com>



Universidad de Granada
19, 20 y 21 de Febrero de 2014

Colaboran:

Financia:



Libro de Actas

Libro de Actas

I Congreso Nacional Multidisciplinar de Jóvenes Investigadores

Facultad de Ciencias
Universidad de Granada
19, 20 y 21 de febrero de 2014

Asociación de Investigadores Extranjeros, AINVEX
Asociación Nacional de Estudiantes e Investigadores SIGLO XXI
Grupo de Investigación Techné, Ingeniería del Conocimiento y del Producto
Asociación Granadina de Estudiantes de Farmacia, AGEF
ArabWays
Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada
Vicerrectorado de Estudiantes de la Universidad de Granada

Comités

Presidente del Comité Científico

Dr. Rafael Bailón Moreno (Director del Grupo de Investigación Techné, Ingeniería del Conocimiento y del Producto. Universidad de Granada. España)

Comité Científico

- Dr José Pino Diaz (Grupo de Investigación Techné, Ingeniería del Conocimiento y del Producto. Universidad de Málaga. España)
- Dr Imad Absaoui (Universidad Complutense de Madrid. España)
- Dr Abdelouahid Samadi (Instituto de Química Orgánica, CSIC - Madrid. España)
- Dr Jauad El Kharraz (General Secretary ArabWays y Information responsible of EMWIS (Euro-Mediterranean Information System on know-how in the Water sector)

Comité Organizador

- PRESIDENTA: Laila Chiadmi (Presidenta de la Asociación de Investigadores Extranjeros, AINVEX. Grupo de Investigación Techné, Ingeniería del Conocimiento y del Producto. Universidad de Granada)
- VICEPRESIDENTA: Mariam Gracia Mechbal (Escuela de Estudios Árabes - CSIC, Granada)
- SECRETARIO: Luis Morales Fernández (Secretario de la Asociación Granadina de Estudiantes de Farmacia, AGEF. Universidad de Granada)
- Dr. María Eugenia García Rubiño (Facultad de Farmacia, Universidad de Granada)
- Verónica López Ramírez (Asociación Granadina de Estudiantes de Farmacia, AGEF. Universidad de Granada)
- Dr. Jauad El Kharraz (General Secretary ArabWays)
- Dr. Ernesto Caballero Garrido (Presidente Asociación Nacional de Estudiantes e Investigadores SIGLO XXI. Universidad New Mexico - UNM)

Colaboradores

- Nuria Pérez Villares (Grupo de investigación Techné, Ingeniería del Conocimiento y del Producto. Universidad de Granada)
- María Esther García García (Facultad de Farmacia. Universidad de Granada)
- María del Mar Fuentes González (Presidenta de la Asociación Granadina de Estudiantes de Farmacia, AGEF. Universidad de Granada)
- Adrián García Burgos (Asociación Granadina de Estudiantes de Farmacia, AGEF. Universidad de Granada)
- María Belén Guimaraens Gallino (Asociación Granadina de Estudiantes de Farmacia, AGEF. Universidad de Granada)
- Sara Cejudo Nieto (Asociación Granadina de Estudiantes de Farmacia, AGEF. Universidad de Granada)
- Yolanda Torres Enríquez (Lda. en Farmacia)

SUMARIO

Comunicaciones Orales

CO-07 La mobilité urbaine et la sécurité routière	11
CO-08 Substrate effect on Pseudo-MOSFETs capacitance curves	21
CO-10 Estudio de la Capilla Real de Granada por parte de un grupo multidisciplinar de alumnos de Arquitectura, Derecho, Historia del Arte y Óptica mediante trabajo cooperativo	27
CO-12 Applicability of advanced separation techniques in combination with different detection systems to forensic analysis. Empleo de técnicas de separación avanzadas en combinación con diferentes sistemas de detección para análisis forense	35
CO-13 Generating images of caviar flavor from multispectral imaging of autofluorescence ..	43
CO-14 Epistemology in the experimental sciences: how a clear conceptual framework improves scientific reading and writing.....	49
CO-17 Estudio de MGMT, MMR y P-gp como posibles mecanismos de resistencia a la temozolamida en líneas tumorales de glioblastoma	55
CO-19 Estudio de la Actividad Biológica de CETUXIMAB mediante ELISA	61
CO-21 Participación femenina en la política local de la Región de Murcia (1987-2011)	69
CO-22 Web Attacks : Study and comparasion.....	81
CO-25 Impacto Económico de las Reformas en el Impuesto sobre la Renta	85
CO-31 Spin-off	105
CO-41 La pronunciación del árabe como lengua extranjera (ELAE): El caso de la EOI de Granada.....	119
CO-50 Nanotechnology approach for protein delivery.....	127
CO-52 “Chem-NAT: a unique chemical approach for nucleic acid testing”	135
CO-53 Development of conjugation strategies for delivery of nucleic acids mediated by polystyrene nanoparticles	143
CO-56 Ensayo In Vivo de Sistemas Terapéuticos Transdérmicos.....	153
CO-59 Magnetite/Polyethylenimine non-viral vector as a magnetofection agent	159
CO-61 Diseño de Formas Farmacéuticas Sólidas de Liberación Modificada	165
CO-62 <i>Lavatera maritima</i> : filogeografía y modelos de distribución de una especie poliploide endémica de la Cuenca Mediterránea	171
CO-65 Enantiomers with different apoptosis indexes: the importance of homochirality in anticancer agents	181
CO-69 Estudio Tecnológico de Comprimidos de Clorhidrato de Metadona	191
CO-80 Fluctuations in the Ising Model.....	201
CO-89 External gelation technology: An approach for the encapsulation of cells.....	207
CO-90 Radioactivity Environmental Monitoring (REM) results in southeast Spain	211
CO-109 La responsabilidad social del joven investigador: El falsafén histórico, la política investigadora y la libertad.....	219
CO-99 Nanopartículas de Poli (ϵ -caprolactona) portadoras de 5-Fluorouracilo para mejorar el tratamiento del cáncer de colon avanzado	227
CO-104 EVALUATION OF WATER QUALITY OF TAFNA RIVER	233
CO-115 Zinc Oxide-layered hydroxide used as delivery machine for phenoxyherbicides-based nanocomposites; nano mixed phases from 4-chloro- and 2,4-Dichloro phenoxy acetates).....	243
CO-121 Aplicación de Técnicas Analíticas Avanzadas en el Desarrollo de Nuevas Formulaciones para la Limpieza de Barnices en Obras de Arte.....	255
CO-124 Sistemática del orden Physarales: Revisión morfológica y primeros avances moleculares	269
CO-126 Securitization, credit and house prices: Spanish evidence	277
EP-04 Association of perceptual and physiological responses during incremental treadmill exercise in women with fibromyalgia.....	303
EP-15 Nuevos merosequiterpenos ejercen una potente actividad antitumoral frente células de cáncer de mama in vitro e in vivo mediante inducción de estrés oxidativo, bloqueo del ciclo celular y apoptosis.....	304
EP-16 Study of genes related with obesity in human differentiated adipocytes	305

EP-20 Nuevos biomarcadores con utilidad diagnóstica identificados en sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma ductal pancreático	306
EP-23 Metodologías para determinar la similitud de cromatogramas	307
EP-34 New anti-cancer purine derivatives: Design and synthesis of seven eight-membered rings	308
EP-38 Riesgo de incendios en función de la vegetación y formas de prevención	309
EP-42 Estudio preliminar de las proteasas de Anisakis Simplex s.l.	310
EP-43 Estudio intraespecífico de las 2 líneas mitocondriales de Phlebotomus Sergenti presentes en España mediante PCR-RFLP	311
EP-44 Aplicación de la microencapsulación de probióticos en nutracéutica	312
EP-48 Study of the main variables affecting the regeneration process of amberlite IRA-67 resin	313
EP-49 Impact of initial concentration on the uptake of iron, chloride and sodium ions for the purification of olive mill wastewater by ion exchange.....	314
EP-51 Vaginitis: Una alternativa terapéutica a los antibióticos.....	315
EP-54 Procesos avanzados de oxidación basados en el uso de radiación solar para la eliminación del diatrizoato de sodio de las aguas	316
EP-55 Adsorción de compuestos farmacéuticos en solución acuosa sobre carbón activado preparado a partir de residuos de café y cáscara de almendra.....	317
EP-57 Diseño y síntesis de nanopartículas de Si	318
EP-60 Monitorizado remoto de ejercicios de rehabilitación en tiempo real con sensores de profundidad 3D y tecnologías semánticas	319
EP-63 Estudio arqueométrico de los vidrios de ventana romanos de la Villa de Ronda del Marrubial, Córdoba.....	320
EP-64 Synthesis of coumarin-triazole hybrids	321
EP-66 Homochiral adenines obtained through microwave conditions.....	322
EP-67 Physico-chemical quality parameters of several grown or imported tropical fruits, marketed in the coast of Málaga and Granada	323
EP-68 Acción de distintos productos naturales sobre Anisakis Tipo I.....	324
EP-70 Diseño de sistemas terapéuticos transdérmicos de metadona	325
EP-71 Presencia de flebotomos Phlebotomus perniciosus y P. ariasi vectores de Leishmania infantum durante el periodo invernal en el área Termomediterránea del sur de España.....	326
EP-72 Drainage of water droplets: role of boundary walls.....	327
EP-74 Procesos avanzados de oxidación basados en el uso de sales de hierro para la eliminación de contaminantes de las aguas.....	328
EP-76 Nanopartículas de PBCA para mejorar la eficacia del 5-fluorouracilo en el tratamiento del cáncer de colon	329
EP-77 Expresión de MGMT y CD133 como biomarcador pronóstico en adenocarcinoma colorrectal	330
EP-81 Uso de biomateriales en la encapsulación de células para uso clínico.....	331
EP-83 Aceite de Argán: nueva perspectiva en la prevención de Enfermedades Cardiovasculares	332
EP-86 Complejos octaédricos de molibdeno (VI) con ligandos polifuncionales derivados de α -pineno. Síntesis y propiedades catalíticas.....	333
EP-87 Aplicaciones de la vehiculización de prednisolona en liposomas en enfermedades inflamatorias articulares.....	334
EP-88 Development of a system for the vaginal treatment of Candida albicans.....	335
EP-91 Nueva ruta sintética del principal metabolito cerebral de la melatonina.....	336
EP-92 An open-source MATLAB code to support the learning process of acid-base titration concepts for university students	337
EP-93 Kinetic study of the degradation of organic pollutants in two-phase olive oil mill wastewater by photocatalysis with ferromagnetic-core dioxide titanium nanoparticles	338
EP-94 Impact of permeate recirculation on fouling build-up during reverse osmosis of olive mill wastewater by a low-pressure membrane	339
EP-95 Desarrollo y validación de un método Elisa para cuantificar la actividad biológica del anticuerpo monoclonal Inflimab.....	340

EP-96 Realization of an inexpensive embedded Mini-Datalogger for measuring and controlling Photovoltaic System.....	341
EP-101 Immunogenetic study of cervical lymph nod tuberculosis in children	343
EP-122 Efectos del Bisfenol A en genes implicados en muerte y supervivencia celular en corteza de rata adulta	345
EP-123 Semantic and Fuzzy Modelling of Human Behaviour in Smart Spaces. A case study on Ambient Assisted Living and Remote Rehabilitation	346
EP-125 New approach: Exploitation of non-conventional water in irrigation	347

Comunicaciones orales

CO-07 La mobilité urbaine et la sécurité routière

C. BOULAHSEN, Ecole Mohammedia des Ingénieurs, Rabat, Maroc, chaimae.boulahsen@gmail.com

Y. BEDRAOUI, Faculté des Sciences Ain Chock, Casablanca, Maroc, bedraouiyoucef@gmail.com

K. BABA, Ecole Mohammedia des Ingénieurs, Rabat, Maroc, baba.khadija@gmail.com

L. OUADIF, Ecole Mohammedia des Ingénieurs, Rabat, Maroc, jd.l3gie@gmail.com

Résumé

La mobilité urbaine est un élément clé du développement durable où les villes sont une organisation d'individus, des institutions et des industries. De ce fait elles ont besoin d'une stratégie bien fondée.

Le problème de la sécurité routière prend de plus en plus d'ampleur, en particulier dans les métropoles qui reçoivent un grand nombre de personnes.

La Congestion, le stationnement, et le manque de développement des espaces publics et des infrastructures mettent en question le système mobilité urbaine et la compétitivité des villes. Le plan de déplacement urbain est considéré comme la composante fondamentale de la stratégie nationale de transport urbain. Sur ce plan, nous avons quatre éléments de base: le cadre institutionnel, les transports publics, le financement durable, la planification de la mobilité urbaine et la gestion optimale de l'espace public.

Bien que ce plan peut apporter des changements, mais nous devons enseigner une nouvelle culture de la mobilité urbaine du plus jeune au plus vieux, nous devons nous respecter, respecter la circulation et respecter les autres personnes.

Mots clés :

Mobilité urbaine, développement durable, sécurité routière, métropole, circulation

Abstract

Urban Mobility is a key element of sustainable development where cities are an organization of individuals, institutions and industries which need a well-founded strategy.

The problem of road safety is becoming increasingly important, especially metropolises which encompassed a lot of people.

Congestion, parking anarchy, and the lack of development roads and public spaces endanger the urban mobility system and the competitiveness of cities. The urban transport plan is considered like the fundamental component of the National Strategy of urban transport. On this plan we have four basic parts: the institutional framework, the attractively public transport, sustainable funding and Planning of urban mobility and optimal management of public space.

In fact, that this plan can make lot of changes, but we have to found a new culture of urban mobility from the youngest to the oldest, we have to respect the traffic and respect the other people.

Keywords

Urban mobility, sustainable development, road safety, metropolis, traffic

1 Introduction:

Le Maroc, un pays face au développement urbain

Le développement urbain que connaissent les pays en développement nous incite à penser durablement, à penser aux générations futures qui ne cessent de s'accroître du jour au lendemain.

Depuis les années 80, les spécialistes des transports évoquent la notion de mobilité urbaine durable au lieu des transports urbains ou de circulation, la raison étant la demande intense engendrée par la migration du milieu rural vers le milieu urbain ce qui a inversé la modalité de déplacements. Selon l'OCDE, la mobilité urbaine durable est « une mobilité qui ne met pas en danger la santé publique et les écosystèmes, respecte les besoins de transport

tout en étant compatible avec une utilisation des ressources renouvelables à un taux inférieur à celui nécessaire à leur régénération et une utilisation des ressources non renouvelables à un taux inférieur à celui nécessaire à la mise au point de ressources renouvelables de remplacement »¹.

Un pays comme le Maroc, en voie de développement compte une augmentation annuelle des habitants estimée à 300.000 habitants, dont une évolution démographique principalement urbaine, avec une population en âge de travail (18-59 ans) de 236.000 personnes/an². Cette tendance à la hausse se concentrant en milieu urbain notamment dans les grandes villes, rend du développement urbain durable un enjeu prépondérant au développement du pays. Néanmoins, les victimes des accidents de circulation dans la dernière décennie représentent plus de 1% de la population annuelle, ce qui est un indicateur alarmant de la sécurité routière, soit 3919 personnes tuées en moyenne³.

La sécurité routière est une préoccupation mondiale, vu le nombre et la tranche d'âge des victimes et des handicapés qui représentent plus de 30% de la population active⁴, ce qui met en évidence le fait d'être de plus en plus vigilant vis-à-vis des accidents de la circulation.

Aujourd'hui, il faut plutôt parler de mobilité que de circulation, car la notion de mobilité englobe tous les paramètres humains et matériels, ainsi ajouter à la notion de mobilité tous les aspects du développement urbain durable.

Casablanca, une métropole en pleine croissance

Casablanca, est une métropole qui atteint 3,9 millions d'habitants en 2012 soit une concentration de 19,8% de la population urbaine nationale avec un taux d'activité de 44,3%². La population casablancaise est en décroissance dans le centre, en croissance dans les arrondissements péri-centraux, et en forte croissance dans les périphériques, avec une densité de population de **2414 hab. /Km²**. Cet accroissement reflète une forte demande en logement, ainsi des déplacements urbains importants.

La population active du Grand Casablanca se situe dans le milieu urbain avec un taux de 93,6% et 21,2% du total de cette population au niveau national², ceci étant un indicateur de l'activité et de la pertinence que représente l'étude de la métropole. L'exemple du Grand Casablanca est un échantillon considérable dans l'analyse de la problématique objet de cet article.

2 Matériels et Méthodes

1.1 Problématique de la mobilité urbaine :

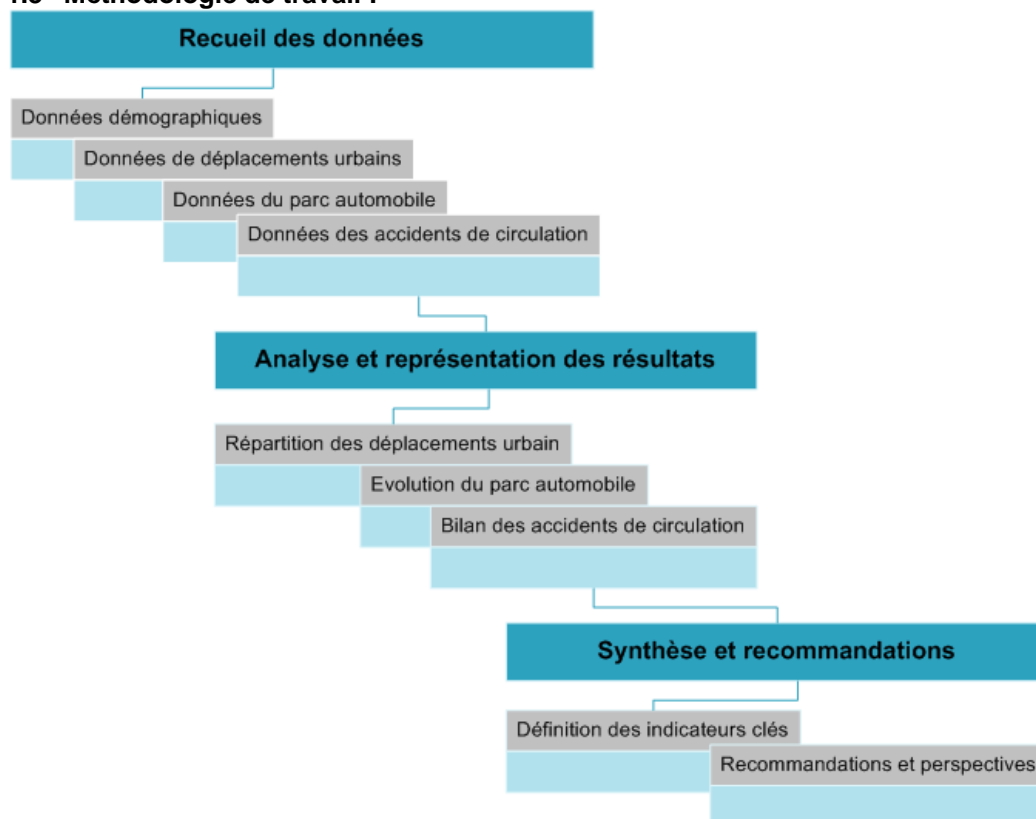
Les méthodes utilisées pour traiter cette problématique ayant de définir les espaces de mobilité, le nombre de déplacements urbains, l'énumération des catégories de déplacements selon les différents types de transports.

L'analyse étant de mener un comparatif qualitatif et quantitatif de ces indicateurs par rapport aux indicateurs clés mobilité urbaine ;

1.2 Problématique de la sécurité routière :

Cette partie étant de traiter l'aspect général de la sécurité routière, analyser et décortiquer le nombre d'accidents de circulation selon le type de routes, le type de victimes, le sexe, l'âge et la catégorie d'usagers.

1.3 Méthodologie de travail :



3 Résultats

Les résultats présentés ci-après sont les résultats définitifs de l'année 2012 dans la Wilaya du Grand Casablanca, à titre d'information les résultats de l'année 2013 sont provisoires et ne peuvent être communiqués.

1.4 Déplacements urbains dans la métropole :

Les déplacements urbains sont le fruit d'un diagnostic fait sur un échantillon de la population déterminant le nombre de déplacements par personne et par jour. Ce diagnostic a été établi sous la supervision de l'Autorité Organisatrice de Déplacements Urbains à Casablanca.

La modélisation de ces déplacements permet aux décideurs d'établir un plan de déplacements urbains PDU, qui est en cours de finalisation dans cette période. Ce plan dresse une stratégie organisant les déplacements urbains en projetant des scénarios sur 10 ans selon l'évolution démographique, économique et sociale de la population^{5,6}.

Ci-après le nombre de déplacements urbains selon les types de déplacements :

Déplacements à pieds	Déplacements en deux roues	Déplacements en voitures individuelles	Déplacements en taxis 1ère et 2ème catégorie	Déplacements en transports collectifs
5 830 000	440 000	1 600 000	1 700 000	1 430 000

Tableau 1. Répartition des déplacements urbains selon le type de déplacement⁷

1.5 Bilan des transports routiers :

Parc automobile en circulations Casablanca	Total du parc automobile en circulation	Pourcentage %
1 079 721	3 124 402	34,56%

Tableau 2. Le parc automobile à Casablanca/Maroc⁸

1.6 Bilan des accidents de circulations⁹ :

	Nb des accidents	Nb des accidents non mortels	Nb des accidents mortels	Nb de tués	Nb de blessés légers	Nb de blessés graves	Nb de tués/100 accidents
En agglomération	12 354	12 116	238	245	16 334	549	1,98
Hors agglomération	1015	941	74	91	1473	239	8,96
Grand Casablanca	13 369	13 057	312	336	17 807	788	5,47

Tableau 3. Bilan des accidents selon la gravité

1.7 Bilan des victimes par catégorie d'usagers :

	Piétons	Bicyclettes	Motocyclettes	Voitures	Camions	Bus	Cars	Engins	Autres	Totaux
Nb de tués	147	20	88	60	14	3	1	0	3	336
Nb de blessés	4716	587	8006	4467	248	250	166	1	154	18595
Totaux	4863	607	8094	4527	262	253	167	1	157	18931

Tableau 4. Répartition des victimes selon la catégorie d'usagers

4 Discussion :

Les résultats présentés ci-dessus montrent l'importance d'une métropole telle que Casablanca, en termes de déplacements urbains, et en termes d'accidents de circulation par rapport aux résultats nationaux, ci-après les diagrammes présentant ces résultats :

1.8 La répartition des déplacements urbains par type de véhicule :

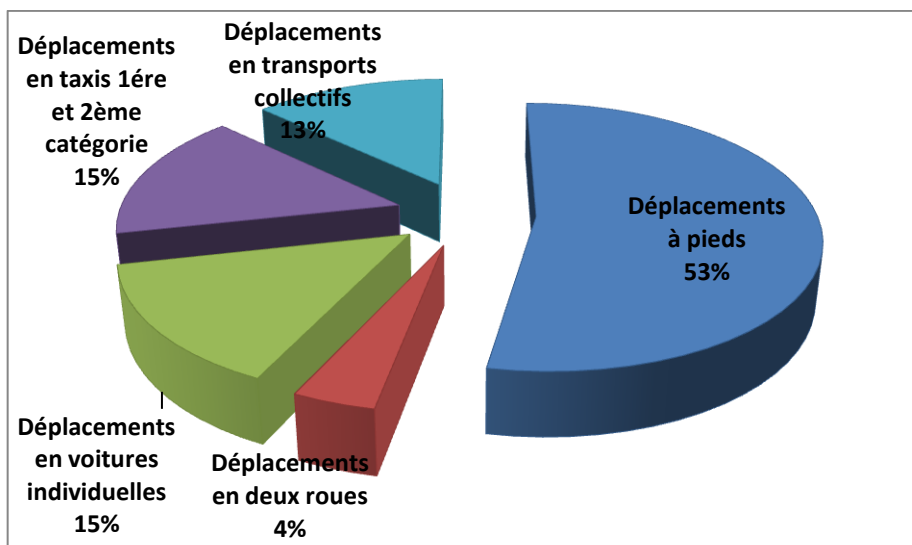


Diagramme 1. Répartition des déplacements par type de véhicule⁵

La marche à pied représente plus de la moitié des déplacements urbains de la métropole, après viennent les déplacements en voitures individuelles et en taxis de 1^{ère} et 2^{ème} catégo-

ries avec **15%**, et puis les transports collectifs **13%** et les deux roues en dernier rang avec **4%**. La tendance de connaît ces déplacements est expliqué par la concentration de la population à côté de leur centre d'intérêt d'une part et d'autre part de l'offre inadapté des transports en commun, qui ne représente actuellement après la mise en service du tramway que **30%** des déplacements. Ceci implique que les plans de déplacements urbains doivent inclure ces paramètres pour équilibrer entre l'offre et la demande.

Le nombre total des déplacements de 11 millions implique que les casablancais se déplacent presque **7.92 fois/jr**, ce qui explique la concentration de la population active en milieu urbain.

1.9 Le parc automobile :

Le parc automobile a nettement évolué dans la dernière décennie, il est passé de **705 161** en **2004** à **1 079 721** en **2012** avec une évolution annuelle estimée approximativement à **40 000** véhicules. Ce parc automobile en nette croissance représente **34.56%** de l'ensemble du pays, cette représentativité explique le développement socio-économique et urbain d'une métropole comme Casablanca⁶.

Un indicateur clé de l'évolution du parc automobile peut être mesurée en étant le nombre de véhicules par 1000 habitants, dans le cas de Casablanca, il existe **276 véhicules/1000 hab.**, ce chiffre est monstrueux par rapport aux infrastructures de la ville, ce taux est toujours en nette croissance.

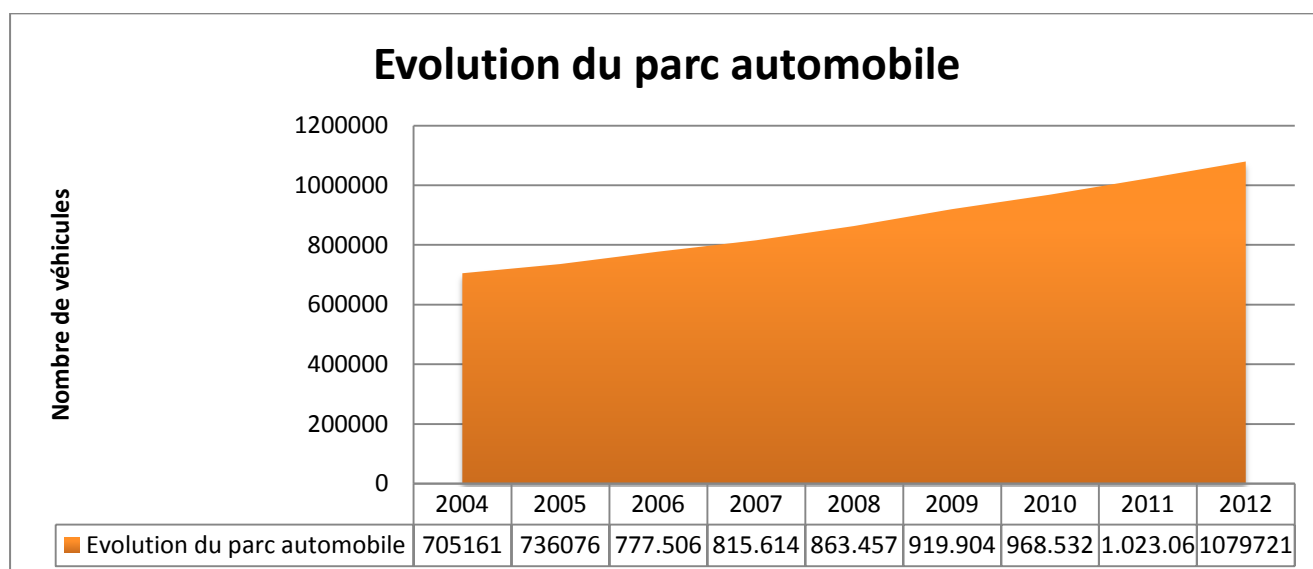


Diagramme 2. Evolution du parc automobile à Casablanca de 2004 à 2012

1.10 Bilan des accidents de circulations :

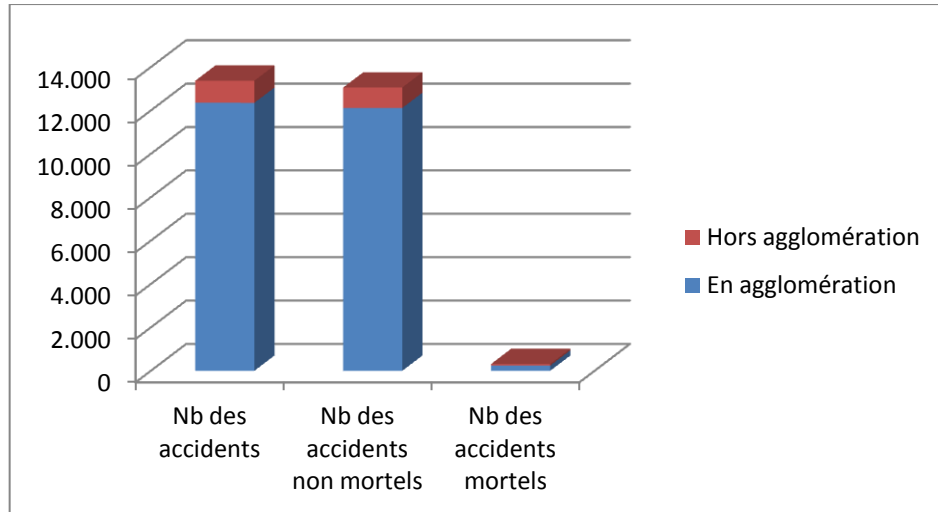


Diagramme 2. Typologie d'accidents en/ hors agglomération

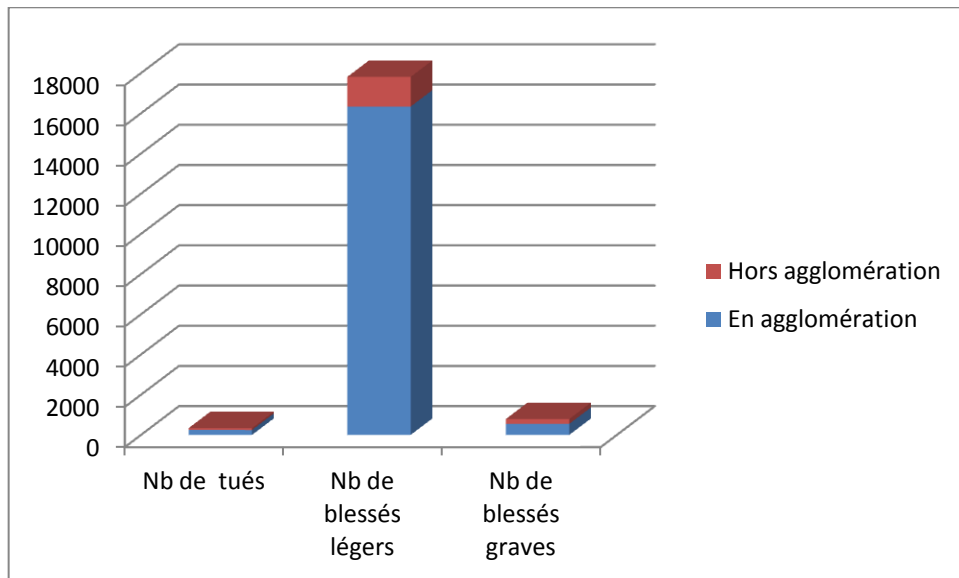


Diagramme 3. Typologie des victimes en/hors agglomération

Selon les diagrammes 2 et 3, que se soit pour le nombre d'accidents ou le nombre de victimes, la concentration des accidents de la circulation est essentiellement en agglomération, le nombre de tués atteint 245 personnes soit 18.13% des tués en agglomérations, ceci est dû à la concentration des déplacements accentués des périphéries vers les centres et les péri-centres, la densité de la population urbaine et l'importance du Grand Casablanca comme pôle économique et dynamique.

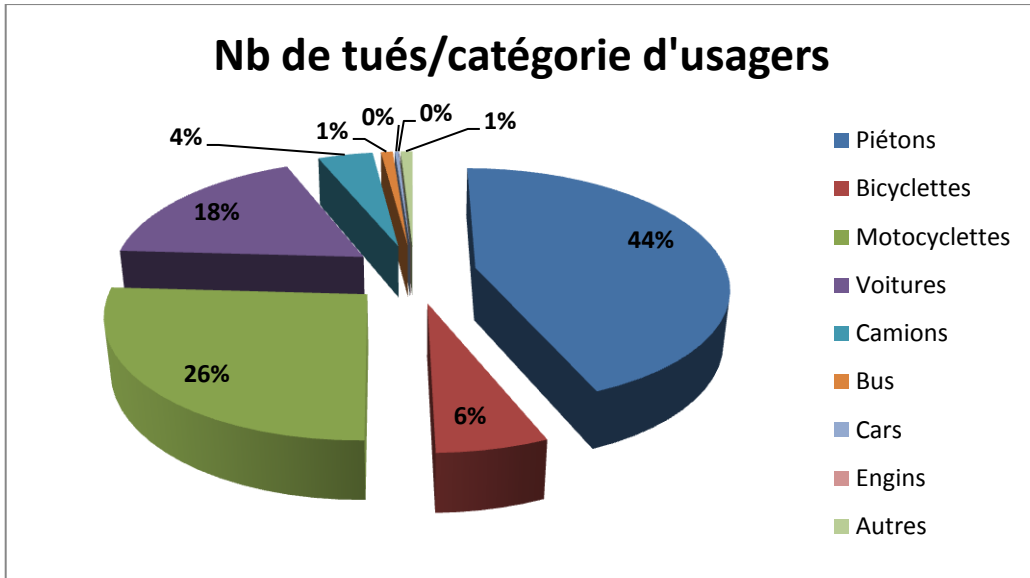


Diagramme 4. Répartition de tués par catégorie d'usagers

Les piétons sont au premier rang des tués, cela explique les 53% des déplacements qui se font à pieds, ce qui met en risque d'accidents en particulier cette catégorie d'usagers, suivi par les motocyclistes, les voitures et les bicyclettes. Les bus, les cars et les engins ou autres ne représente que 6% des tués vu que l'emplacement des personnes vulnérables est étendu dans ce type de véhicules, ainsi le risque est moindre.

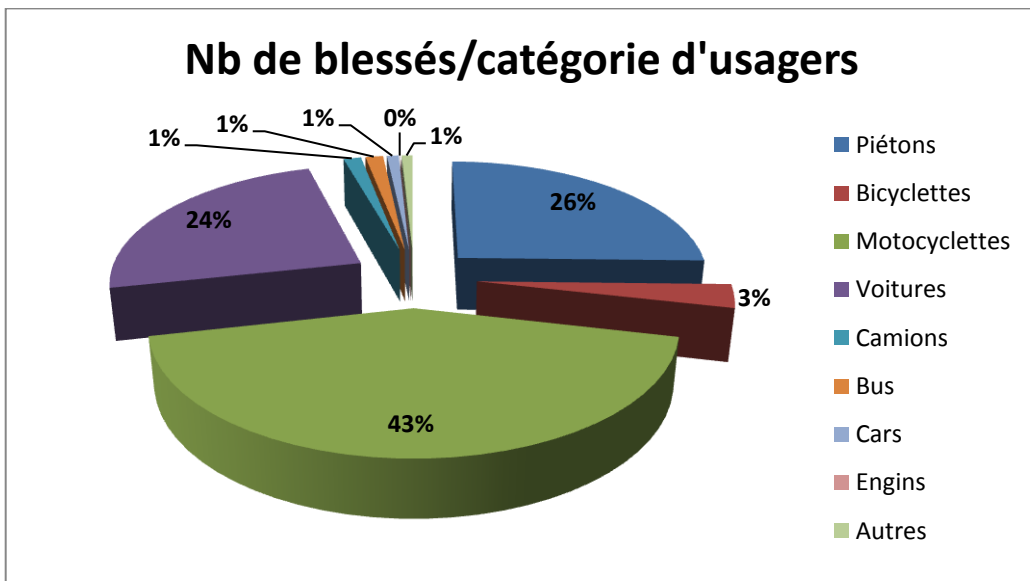


Diagramme 5. Répartition des blessés par catégorie d'usagers

Les motocyclistes cette fois-ci prennent le premier rang des blessés avec 43%, suivi respectivement des piétons 26%, voitures 24%, bicyclettes 3%, bus, cars et engins ou autres de 4%.

Il est à noter que sur tout le territoire national, les victimes des accidents sont de sexe masculin près de 78,05% selon les statistiques de la Direction des routes, et que les personnes les plus touchées sont ceux qui ont un permis de conduire entre 4 ans et 8 ans d'ancienneté.

L'âge des victimes les plus touchées est comprise entre 25 et 34 ans, 10,9% moins de 14 ans et 47,47% moins de 34 ans, ce chiffre est énorme, les jeunes sont exposés à la mort, ceci est alarmant dans une société qui en pleine croissance, qui a besoin des jeunes pour participer au développement économique, humain et social.

1.11 Indicateurs clés de la sécurité routière :

Indicateur Clés	Taux
Nb de tués/100 accidents	5.47
Nb de blessé/100 accidents	139
Nb de tués/jr	0.94
Nb d'accidents/jr	37.55
Nb de tués/100.000 d'hab.	8.61
Nb de blessés/100.000 d'hab.	476.79

Chaque jour une personne meurt, près de 38 accidents se produisent, pour 100 accidents qui se produisent près de 6 personnes meurent et 139 sont blessés, et pour 100.000 habitants de la métropole 8.61 personnes meurent et 477 personnes se trouvent blessés. Ces indicateurs définis par la communauté mondiale et par le Comité Nationale de Prévention Contre les Accidents de la Circulation³ montrent les enjeux de la sécurité routière à Casablanca.

5 Conclusions :

De l'analyse des indicateurs clés du développement urbain, de mobilité et de sécurité routière, il en découle les recommandations et les perspectives suivantes :

- Les déplacements urbains des casablancais se font à pieds, ceci n'est pas un signe de durabilité, mais plutôt ça reflète la faible attractivité des systèmes de transports collectifs en terme de leur fréquence, de leurs services et de leur étendue, ainsi que la plupart des personnes ont du mal de se procurer des voitures particulières. Aujourd'hui, il faut travailler les plans de déplacements urbains pour en tenir compte de la migration de la population vers les périphéries ce qui va accroître les déplacements en deux roues ou en voitures particulières dans des temps record, et va contribuer de plus à la congestion dans les artères principaux, à l'anarchie du stationnement et aux accidents de circulations. Malheureusement, nous ne possédons pas des données sur les distances parcourues par jour et par personne, ni sur le coût annuel qu'engendre les déplacements par catégorie de revenus, mais **7.92 déplacement/jr/personne** est indicateur de taille qui mène à penser mille fois un plan de déplacement urbain.
- Les plans de déplacements urbains au Maroc manquent de cadre institutionnel ou réglementaire, ceci retarde de plus en plus leur mise en œuvre, leur respect, et leur suivi par les autorités concernées, ne prennent toujours pas en compte le paramètre social, humain et durable.
- L'évolution du parc automobile de **180 véhicules/1000hab en 2004 à 257 véhicules/1000 hab. en 2012**, soit une évolution de **77 véhicules/1000 hab.** dans l'espace de 8 ans, n'est qu'un début. Si aujourd'hui nous ne maîtrisons pas les achats de voitures particulières, l'âge du parc automobile, son immatriculation, et le système de visites techniques, nous allons se retrouver devant un nombre plus marquants manquant de toute sécurité et tout contrôle.
- le développement urbain durable est conditionné par l'intégration des trois paramètres essentiels qui sont le paramètre économique social et environnemental, ainsi les plans de déplacements urbains doivent aussi tenir compte de la sécurité routière comme étant un élément clés de tout développement.
- Un projet métropolitain n'intégrant pas dans tous ces aspects les problèmes majeurs de la mobilité urbaine et du développement durable comme la congestion, le stationnement ou le développement d'infrastructures et des espaces publics, ne peut en aucun cas s'inscrire dans une vision de compétitivité, de bonne gouvernance ou de régionalisation avancée.

- Une mobilité urbaine bien réfléchi relèvera les défis de la sécurité routière, il faut donc scinder entre l'espace de mobilité et l'espace sécurisé⁸, car un espace de mobilité où se déplacent les personnes via tous les moyens de transports n'est sécurisé qu'en partie. De ce fait un espace sécurisé est un espace où la mobilité est étroitement encadrée notamment celle des conducteurs qui représentent un risque énormes (deux roues et automobiles).
- Selon un rapport sur l'action internationale des collectivités en matière de mobilité urbaine¹², d'ici 2020 la cinquième cause de mortalité serait les accidents, les victimes étant des jeunes et des enfants, ceci en l'absence d'une réglementation sévère qui punit sur les cinq causes d'accidents : le port de la ceinture, l'alcool, le port du casque, la vitesse et les conditions particulières de transport des enfants. Au Maroc, la rentrée en vigueur nouveau code de la route en 2010 a pu baisser le nombre de victimes dans le premier trimestre, mais après les résultats définitifs de 2011 et 2012 le nombre est en nette croissance. De ce fait, il faut sensibiliser les conducteurs, et surtout les personnes vulnérables, des risques et des conséquences, il faut ainsi développer un système de signalisation intelligent, densifier les passages piétons à côté des centres d'intérêts, et mettre en œuvre une matière de l'éducation à la sécurité routière¹³.
- Toute réglementation incitant et responsabilisant les conducteurs du danger et des risques des accidents n'est qu'un premier pas vers une sécurité routière.
- Le défi que relève cet article est de combiner entre la stratégie de mobilité urbaine qui est pilotée par les autorités compétentes en partenariat avec l'UE¹⁰, du développement durable et de la sécurité routière, une équation appliquée sur une métropole telle que Casablanca, cette équation qui est en cours de développement dans des pays qui ont franchi de grands pas en mobilité urbaine et sécurité routière tels que les pays adhérents à l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques OCDE, ou à l'Union Internationale des Transports Routiers IRU¹¹.

Les travaux futurs intègrent cette équation pour en sortir un modèle de mobilité urbaine fondé sur les lignes de la sécurité routière et de la durabilité de la métropole de Casablanca, ainsi basé sur l'utilisation et le développement des outils des systèmes d'informations géographiques.

6 Références

1. C.KELBEL, A.MAHIEU, C.BRANDELEER, L.BUFFET ; Mobilité durable : enjeux et pratiques en Europe ; Bruxelles ; Think tank européen « Pour la Solidarité » ; 2009 ; CDU CD100314
2. Haut Commissariat Au Plan ; Activité, Emploi et Chômage du Grand Casablanca année 2012 ; Direction Régionale de Casablanca ; 2013 ; p : 10-23
3. Comité national de prévention des accidents de la circulation ; Bilan décennal des accidents de la circulation au Maroc 2000 – 2010 ; 2012 ; p : 3-12
4. Fondation Abertis ; La sécurité routière exige une bonne politique urbaine et de mobilité ; note d'informations ; 2009 ; Madrid ; Espagne ; p : 2
5. Direction Générale des Collectivités Locales, Direction de la Planification et de l'Équipement ; La politique de déplacements urbains au Maroc ; Ministère de l'intérieur ; Maroc

6. A.SOUDOU ; La mobilité Urbaine Durable ; Agence Urbaine de Salé, Union Européenne, Coopération du développement urbain et du dialogue ; 2013 ; p : 4-7
7. M. N'GADI; Le Rôle des Plans de Déplacements Urbains dans la Sécurité Routière ; direction générale des collectivités locales- direction de la planification et de l'équipement ; Ministère de l'Intérieur ; Maroc
8. Ministère de l'équipement, du transport et de la logistique, Transports en chiffres 2013 ; 2013 ; Maroc ; p : 3
9. Direction des Routes ; Recueil des accidents 2012 ; Ministère de l'équipement du transport et de la logistiques ; 2013 ; Maroc ;
10. Commission Européenne ; Mise œuvre de la Politique Européenne de Voisinage au Maroc, Progrès réalisés en 2012 et actions à mettre en œuvre ; Bruxelles, le 20.3.2013 SWD(2013) 81 final
11. Union Internationale des Transports Routiers ; IRU en 2013 un progrès depuis 1948 ; 2013 ; p : 34-76
12. B. GALLET ; L'action Internationale des Collectivités en matière de Mobilité Urbaine ; 2012 ; p : 25-45
13. Comité Permanent de la Sécurité routière ; Plan Stratégique Intégré d'urgence de la Sécurité Routière (PSIU III) 2011-2013 ; 2012 ; p : 52-53

CO-08 Substrate effect on Pseudo-MOSFETs capacitance curves

Cristina Fernandez Sanchez, Departamento de Electrónica y Tecnología de Computadores, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Spain, email: cfsanchez@ugr.es

Noel Rodriguez Santiago, Departamento de Electrónica y Tecnología de Computadores, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Spain, email: noel@ugr.es

Francisco Gámiz Pérez, Departamento de Electrónica y Tecnología de Computadores, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Spain, email: fgamiz@ugr.es

Abstract

The Pseudo-MOSFET technique has been used during decades for the monitoring of unprocessed Silicon-On-Insulator (SOI) wafers. Until now, this characterization method had been only used for the extraction of electrical parameters from DC results. Recently, the Pseudo-MOSFET was combined with AC measurements through Split-CV technique. This allowed to extract capacitance curves varying the gate bias applied, and to study the frequency dependence of the structure. Nevertheless, there exist several aspects not yet studied.

In this work, the effect of the gate bias on capacitance measurements is analyzed in terms of the variability of the depletion region thickness under the BOX. To do this, a theoretical model will be proposed and discussed with experimental results obtained in laboratory. Finally, for the purpose of benchmarking, the study will be carry out for various wafers with different layer thicknesses.

Keywords

Silicon-on-Insulator (SOI), Pseudo-MOSFET, Split-C(V), substrate thickness, effective area

1 Introduction

The Pseudo-MOSFET technique is a well-established simple method for the electrical characterization of bare Silicon-On-Insulator (SOI) wafers. The method takes advantage of the MOSFET-like configuration implicit in any SOI wafer (Fig. 1.a)) [1][2]: the substrate serves as the gate terminal, the Buried-Oxide (BOX) plays the role of the gate insulator, and the Silicon film acts as the transistor body. For the source and drain contacts two metallic needles are placed on the wafer surface. Thus, when a gate bias is applied, a channel can be induced in the film and current curves can be extracted.

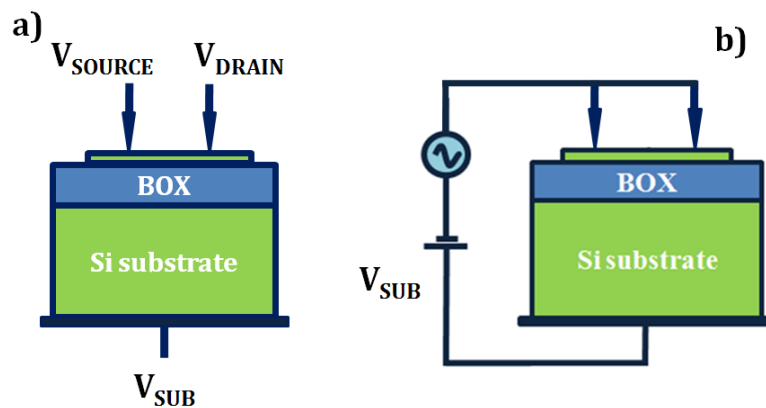


Figure 1: a) usual Pseudo-MOSFET configuration, b) double-needle capacitance experiment.

Recently, this method has been combined with Split-C(V) measurements (Fig 1.b)). Split-C(V) technique enables to obtain the inversion or accumulation charge in a MOSFET, Q_i , integrating the direct measurement of the gate-to-channel capacitance, C_{GC} , [3].

One of the most recent research of this double characterization (DC and AC) was the determination and modeled of the effective surface, S_{eff} [4]. This effective area represents the maximum region around the needles where the carriers (electrons or holes) are able to follow the AC input signal (Fig 1.a)). The present work uses these previous and reported results in a deeper study of the frequency dependence of the Pseudo-MOSFET capacitance curves where the substrate thickness makes its appearance on the scene.

1.1 Pseudo-MOSFET as a capacitor

When AC measurements are performed, the Pseudo-MOS transistor can be modeled as a set of planar capacitors. A simple approximation is the sum of the capacitance associated to the BOX, and that formed by the depletion region under the BOX (Fig 1.a)). Unlike the BOX capacitance, the second capacitor is only created when the frequency is high enough. The reason comes from the coefficient diffusion of electrons and holes. At higher frequencies, the diffusion of carriers is limited and those far from the needles are not able to follow the AC signal, generating a depletion region [5].

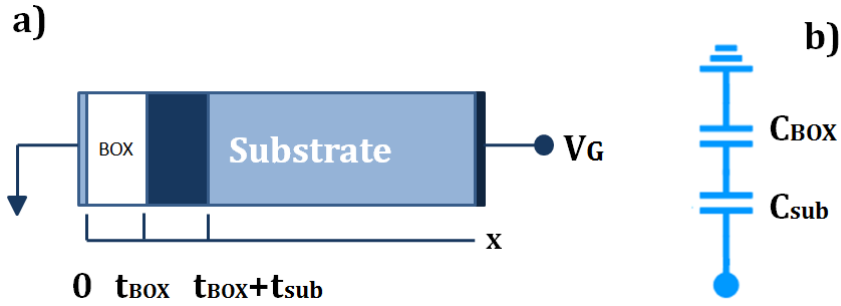


Figure 2: a) when the frequency is high enough a depletion region in the substrate appears, b) electrical circuit equivalent

1.2 Substrate thickness

The electrical circuit associated to this approach is shown in Fig. 2.b): two capacitors in series form the Pseudo-MOS transistor. From this scheme, the theoretical total capacitance can be represented as:

$$\frac{1}{C_T} = \frac{1}{C_{BOX}} + \frac{1}{C_{sub}} \quad [1]$$

Whether the capacitances are treated as planar capacitors, the substrate depletion thickness can be extracted:

$$\frac{1}{C_T} = \frac{t_{BOX}}{S_{eff} \epsilon_{BOX}} + \frac{t_{sub}}{S_{eff} \epsilon_{sub}} \quad [2]$$

$$t_{sub} = \epsilon_{sub} \left(\frac{S_{eff}}{C_T} - \frac{t_{BOX}}{\epsilon_{BOX}} \right) \quad [3]$$

The dielectric constants ϵ_{BOX} and ϵ_{Si} are those associated to the SiO_2 buried oxide and the Silicon substrate. The maximum value of capacitance, C_T , is obtained from experimental curves at strong inversion or accumulation depending on the gate terminal value: at high positive values electrons determined the capacitance value, and at high negative gate biases will

be the holes. Finally, the effective area, S_{eff} , has been reported being possible to calculate its value for any frequency [4]. Therefore, t_{sub} can be extracted as a function of the frequency.

2 Materials and Methods

To carry out the calculations, capacitance curves were performed employing some material of the Nanotechnology Laboratory placed in CITIC (University of Granada). In particular, it was necessary to use the Jandel probe station where the samples are placed and biased through the metallic chuck and the needles (Fig. 3).

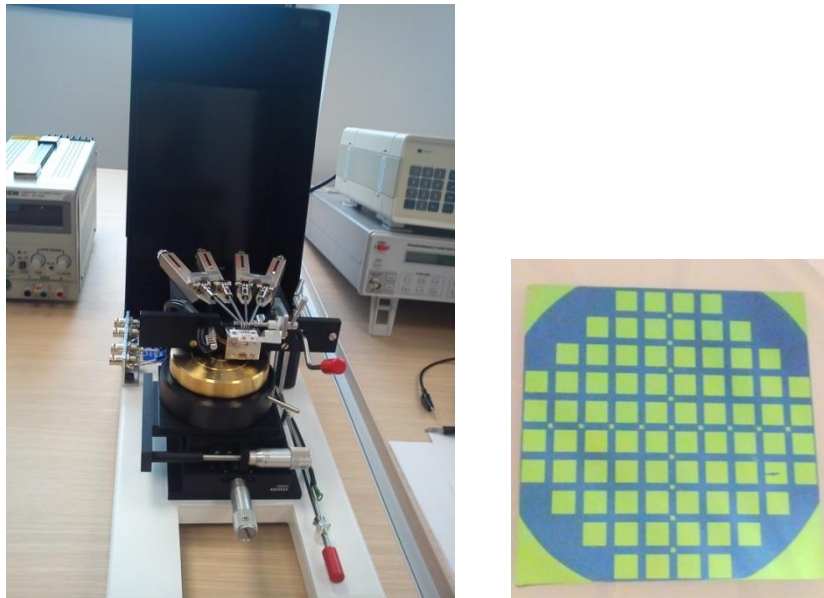


Figure 3, Jandel probe station and the Pseudo-MOS sample used

Furthermore, an impedance analyzer as well as various cables and connectors were utilized (Fig. 4). The analyzer allows us to modified the frequency of the input signal as well as the bias of the substrate (chuck in the probe station).



Figure 4: Impedance analyzer and connectors used to extract capacitance curves from the Pseudo-MOSFET samples.

3 Results and discussion

3.1 Capacitance curves and effective area

Capacitance measurements varying the frequency of the signal were performed on a non-passivated [6] Pseudo-MOSFET sample with 145nm-thick BOX and 88nm-thick Si film. In or-

der to explore and compare several results two configurations were studied: using one needle on the surface and two. The curves extracted are represented in Fig. 5.

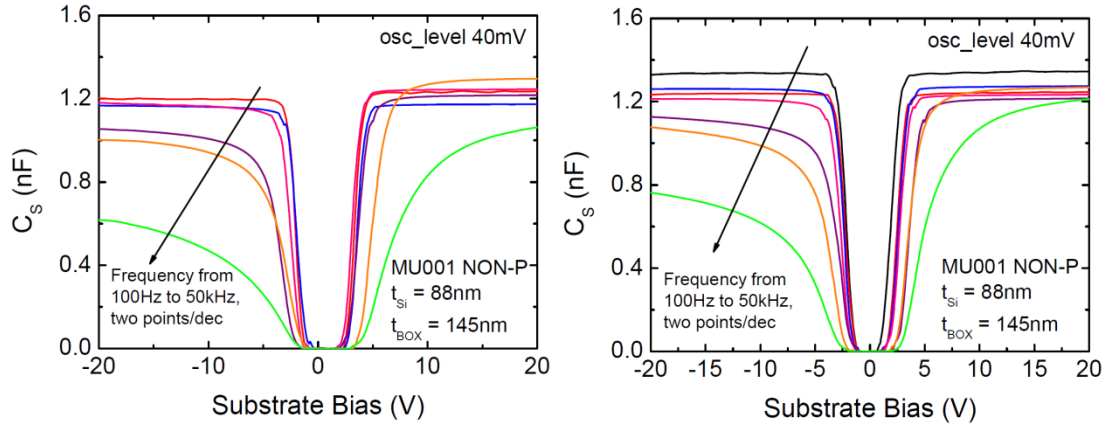


Figure 5. Capacitance curves obtained using one needle on the Pseudo-MOSFET surface (left) and two probes (right).

After extracting the maximum value of the curves (C_T) for both electrons and hole channels (using a substrate bias positive and negative respectively) the effective area was calculated from [4]. The results for these curves are depicted in Figure 6. As observed, the area remains as a constant at low frequencies, which indicates that carriers are still able to follow the AC signal. Nevertheless, for higher frequencies they are limited and S_{eff} decreases.

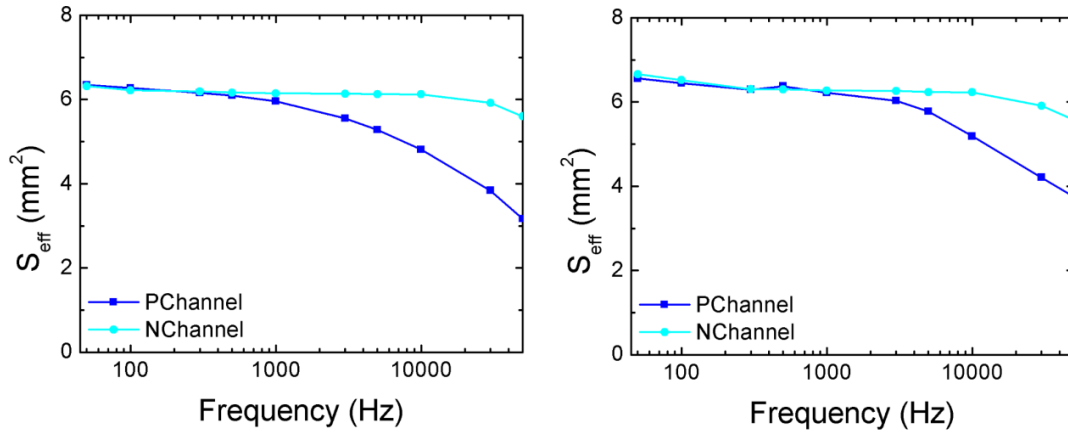


Figure 6. Effective area obtained from [3] using the capacitance curves extracted in our experiment for one needle on the surface (left) and two (right).

3.2 Substrate thickness

To complete the study, the substrate thickness associated with the depletion region at high frequencies was calculated by Eq. [3] (Fig. 7). The data demonstrate that t_{Sub} begins to increase with the frequency. The results are those expected since when the frequency increases so does the region t_{Sub} .

4 Conclusions

Since its invention, the Pseudo-MOSFET has been used for the characterization and optimization of SOI wafers. Its current curves are similar to those for an usual MOSFET, being possible to employ the same parameter extraction methods to determine the material parameter.

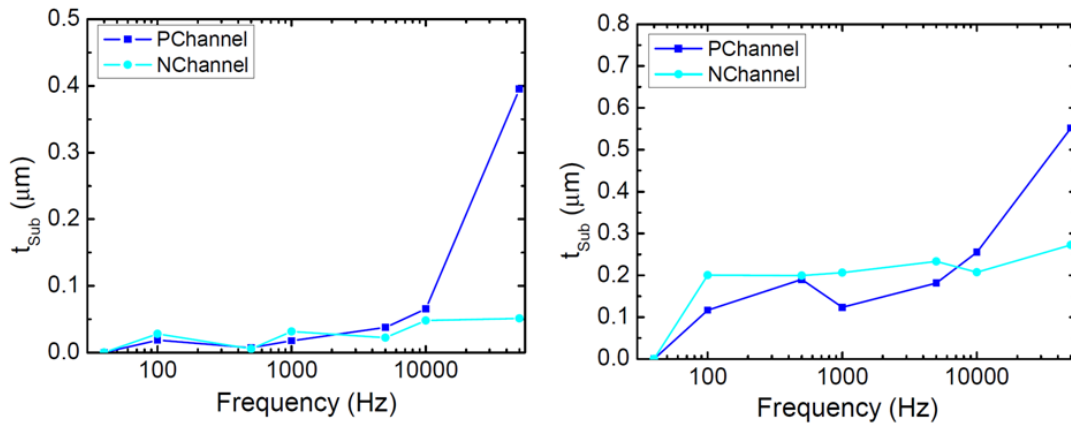


Figure 7. Substrate thickness values obtained as a function of the frequency employing one needle on the surface (left) and two (right).

Recently, this characterization has been expanded to a capacitance analysis through the Split-C(V) technique. In this work, the behavior of the transistor with respect to the frequency of the AC input signal has been further studied. In particular, how the thickness of the depleted region under the BOX has been analyzed. Capacitance measurements were carried out using lab material and the area effective from the curves was calculated. The results satisfied our hypothesis about the carriers: since carriers are not able to diffuse when the frequency is high, the depleted zone increases its thickness.

5 References

1. S. Cristoloveanu, D. Munteanu, M. S. T. Liu, A review of the Pseudo-MOS transistor in SOI wafers: operation, parameter extraction, and applications, *IEEE Trans. Electron Dev.*, 47, 5, 2000.
2. S. Cristoloveanu, S. Williams, Point contact Pseudo-MOSFET for in situ characterization of as-grown SOI wafers, *IEEE Elec. Dev. Lett.*, 13, 2, pp. 102-104, 1992.
3. C. G. Sodini, T. W. Ekstedt, J. L. Moll, Charge accumulation and mobility in thin dielectric MOS transistors, *Sol-Sta. Elec.*, 25, 9, pp. 833841. 1982.
4. C. Fernandez, A. Diab, N. Rodriguez, A. Ohata, F. Allibert, I. Ionica, F. Gamiz, S. Cristoloveanu, Impact of Effective Capacitance Area on the Characterization of SOI Wafers by Split-C(V) in Pseudo-MOSFET Configuration, *ECS Trans.*, volume 53, issue 5, 209-217, 2013.
5. A. Diab, C. Fernández, A. Ohata, N. Rodriguez, I. Ionica, Y. Bae, W. Van Den Daele, F. Allibert, F. Gámiz, G. Ghibaudo, C. Mazure, S. Cristoloveanu, A new characterization technique for SOI wafers: Split C(V) in pseudo-MOSFET configuration, *Solid-State Electronics* 90, 127–133, 2013.
6. G. Hamaide, F. Allibert, H. Hovel, S. Cristoloveanu, Impact of freesurface passivation on Silicon On Insulator buried interface properties by pseudotransistor characterization, *J. Appl. Phys.*, 101, 11, pp. 114 513:1114 513:6, 2007.

CO-10 Estudio de la Capilla Real de Granada por parte de un grupo multidisciplinar de alumnos de Arquitectura, Derecho, Historia del Arte y Óptica mediante trabajo cooperativo

Cristina Ortiz Martínez, Grado en Óptica y Optometría, Universidad de Granada, naliop@hotmail.com
 M. Teresa García Gallardo, Departamento de Historia del Arte, Universidad de Granada, maitegg@ugr.es
 José Juan Castro Torres, Departamento de Óptica, Universidad de Granada, jicastro@ugr.es
 Nicolás E. Berbel Callejas, Grado en Óptica y Optometría, Universidad de Granada, zhirk29@hotmail.com
 Jesús Villar Quintana, Grado en Arquitectura, Universidad de Granada, jesusvillarquintana@correo.ugr.es
 Laura González Urbano, Grado en Arquitectura, Universidad de Granada, gulaura_95@hotmail.com
 Sheila Salquero Dorado, Grado en Historia del Arte, Universidad de Granada, sheila20@correo.ugr.es
 Sara Maldonado Muñoz, Grado en Historia del Arte, Universidad de Granada, msara@correo.ugr.es
 Roberto Carlos Ordóñez Plazuelo, Licenciatura en Derecho, UGR, robertocarlosop@gmail.com
 Álvaro Martínez Tellez, Grado en Derecho, Universidad de Granada, amartel@correo.ugr.es
 Fátima Cabrera Arance, Grado en Arquitectura, Universidad de Granada, fati_laujar15@hotmail.com
 Luis M. Domenech Rodríguez, Grado en Arquitectura, Universidad de Granada, luismi_92@hotmail.com

Resumen

En el siguiente trabajo se describe una nueva forma de apreciar la arquitectura de diferentes obras arquitectónicas de Granada, en concreto, de la Capilla Real de Granada. Normalmente, los análisis arquitectónicos e histórico-artísticos se recurren a bocetos, dibujos, imágenes y fotografías en 2D. En este trabajo se utilizará la fotografía en 3D como método gráfico de apreciación de la estructura arquitectónica y artística del edificio en cuestión. Se realizaron fotografías en las cuales se introduce un cierto valor de disparidad mediante dos métodos de fotografiado diferentes, el primero de ellos se realiza con dos cámaras independientes montadas en un trípode con todos sus parámetros sincronizados y con una alineación vertical perfecta o cuasi perfecta. Por otro lado, se tiene una cámara con dos objetivos separados aproximadamente 50mm, que realiza la fotografía con una disparidad relativa a la distancia entre ambos objetivos. Una vez que se tiene la fotografía, resultado de dos fotografías con una leve diferencia angular horizontal superpuestas, se procede al tratamiento de la misma coloreando la disparidad creada, de colores complementarios (rojo-cian) obteniendo así el anaglifo correspondiente a una determinada escena el cual se apreciará con unas gafas rojo-cian.

Con la ayuda de los anaglifos la apreciación de la estética del edificio, la arquitectura, los detalles y demás escenas significativas se enriquecen de forma significativa, y a partir de ahí mediante la incurción y cooperación de las ramas pertenecientes a la Historia del Arte, la Arquitectura y el Derecho se procede al análisis profundo del edificio en cuestión. Todas estas ramas del conocimiento se entrelazan entre ellas utilizando tanto para la explicación gráfica de sus argumentos como para la mejor comprensión de los mismos, la fotografía 3D.

Palabras Clave

Capilla Real, fotografía tridimensional, Arquitectura, Historia del Arte, Derecho, Óptica, análisis 3D, interdisciplinariedad, trabajo cooperativo

1 Introducción

Durante este proyecto interdisciplinar se han desarrollado diferentes técnicas y modos de colaboración entre los integrantes del mismo. Cada individuo ha aportado el conocimiento específico y particular de las disciplinas que trabaja en su día a día pero con un matiz muy especial; se ha especializado en un tema muy concreto, aportando una visión centrada y particular en el tema a tratar. Se ha trabajado con el mayor ahínco y destreza posibles con el objetivo de aunar la mayor cantidad y variedad de conocimientos acerca del monumento en

cuestión, ayudándose de las ventajas que implica el uso de la fotografía en 3D intentando que cada una de nuestras perspectivas culmine en una unidad hegemónica y coordinada.

1.1 Marco Histórico-Artístico

En torno a 1500 Granada expresa mejor que ninguna otra ciudad de España el conflicto entre dos épocas. Con la ocupación de la ciudad por los Reyes Católicos se quiso cerrar un ciclo de la historia de España donde convivieron y también se enfrentaron gentes de diversa religión. Se pasaba del mundo medieval al moderno, exaltándose ideas de unidad, en una urbe donde luchaban por sobrevivir formas que parecían anticuadas a la vez que llegaban desde Italia nuevos estilos. Muy pocas semanas después de la entrada de los cristianos en la Alhambra se iniciaban obras de restauración en el Patio de los Leones respetando su decoración, pero implantando los emblemas de Fernando e Isabel. Así se auguraba la permanencia del estilo nazarí y se confirmaba una vez más el respeto y hasta la afición de los monarcas cristianos por los palacios musulmanes. Al iniciarse un vasto programa, para sustituir las mezquitas por sencillas iglesias de nueva planta, se tuvieron en cuenta técnicas de tradición morisca para levantar los pesados muros de ladrillo, enlucirlos las más de las veces, y cubrirlos con techos de madera dando ocasión a magníficos artesonados. A la par se empezaron a realizar templos más ostentosos, a los cuales se les imponía el uso de materiales nobles, técnicas y estilos que venían desarrollándose en el Occidente cristiano desde hacía más de tres siglos. Igual que el arte musulmán, el gótico quería imponerse en Granada y lo consiguió, en gran medida, en la Capilla Real, la cual a través de una cédula dada en Medina del Campo, el 13 de septiembre de 1504, se decide la fundación de esta. Los RRCC crearon la cédula de don Fernando y de doña Isabel, expedida en Medina del Campo el 13 de septiembre de 1504 bajo su patronazgo de la Real Capilla de Granada, para sepultura de sus cuerpos, bajo la advocación de San Juan Bautista y de San Juan Evangelista. Su servicio estaría a cargo de trece capellanes perpetuos, uno de los cuales, ejercería el cargo de capellán mayor, con la obligación de officiar tres misas diarias por las almas de los fundadores, así como por las de sus antecesores, y la de celebrar, asimismo, tres aniversarios en las fechas de sus respectivos fallecimientos y en el día de Todos los Santos.

1.1.1 Pinturas

Tríptico de la pasión es la famosa obra de Dierick Bouts y una de las joyas pictóricas de éste templo que, Gómez Moreno, compara y cree solo comparable, con el Descendimiento del Escorial de Van der Weyden. Este tríptico perteneció a la colección de cuadros donados por la Reina Católica a la Capilla y, por su tamaño (1,91m de alto y 1,55 de ancho la hoja central y 0,66 las laterales) y su calidad, constituye la obra pictórica más importante de Granada. Las escenas que se representan en él son: el Descendimiento, en el paño central; la Crucifixión, en la hoja derecha; y la Resurrección, en la izquierda.



Figura 1. Tríptico de la Pasión.

En el “**descendimiento**”, aparecen bajando de la cruz, el cuerpo muerto de Jesús, Arimathea y Necedemus, mientras la Virgen, sostenida por San Juan, besa la mano de su hijo y la Magdalena acude a soportar sus pies. Al lado de ésta, quedan dos Santas Mujeres y enfondando la escena y bajo un cielo nuboso, se observa un austero paisaje admirable, con montes y árboles y una ciudad recortando el horizonte.

La hoja de la “**Crucifixión**”, presenta un fondo accidentado, de montes, peñas y riachuelos, en el que destacan sus perfiles las torres de una ciudad y cuatro figuras de hombre contemplando la escena. En el aire, aparecen dos ángeles en adoración de Jesús, a un lado y otro lado de la Cruz, a cuyo pie, se abraza la Magdalena y, junto a ella, dos Santas Mujeres. En primer término la virgen, cae desfallecida al suelo, sosteniéndola San Juan, mientras al otro lado se agrupan siete figuras masculinas.

La escena de la “**Resurrección**”, está dominada por un cielo oscuro, que rompe en el horizonte en claridad de amanecer, dibujando un paisaje de rocas, en el que se ve a las tres Marías y, ocupando el centro de la tabla, Cristo, acabado de salir del sepulcro, sobre el que queda un ángel en pie. El señor, envuelve su cuerpo en un manto rojo y avanza, ante el estupor de tres soldados, que ruedan por el suelo, aterrados del prodigio.

Las figuras, están agrupadas con singular arte y facilidad, sin artificio ni rigideces y ejecutadas con fina y delicada gracia correcta y hondo sentimiento dramático, dominando en todas las composiciones una interesante tonalidad, en la que predominan los rojos.

1.1.2 El Barroco en la Capilla Real

En el siglo XVI se cierra la época más brillante en la historia de este monumento. Al dejar de ser el gran panteón de los reyes de España, la historia de la Capilla queda vinculada a la del arte granadino que muestra sin embargo aquí algunas importantes experiencias. Los altares relicarios, debidos a Alonso de Mena y realizados en 1630, tienen indudable valor en el proceso de desarrollo del retablo barroco granadino además de ofrecer rasgos de gran originalidad. En la Capilla de Santa Cruz, un lienzo con una Inmaculada réplica de Alonso Cano, centra un retablo realizado en 1752 en abigarrado estilo churrigueresco. A los lados de él las esculturas del *Ecce Homo* y la Dolorosa por José Risueño son testimonio magnífico de la exaltación del dolor en el arte de lo último grandes imagineros granadinos. Otros altares barrocos en las capillas hornacinas insisten en fórmulas decorativas muy recargadas en vísperas de la reacción neoclásica, pero todas estas y otras obras que podrían citarse nos sitúan en un ambiente más limitado, más localista que aquel que fructificó en la primera mitad del siglo XVI gracias a la voluntad de los Reyes Católicos y a la devoción por sus abuelos del Emperador Carlos V.

1.2 Marco Jurídico o del Derecho

La importancia que los Reyes Católicos le otorgaron a la Capilla Real es evidente y muy trascendente pues la dotación y la magnitud de la obra así lo hacen patente. Esta importancia también se la otorgaría Carlos V que mediante la cédula expedida en Zaragoza, el 13 de octubre de 1518, eleva hasta veinticinco las capellanías colativas, “para así honrar mejor a los monarcas que ganaron la ciudad y Reino de Granada, poniendo a sus personas a mucho peligro y trabajo, por la honra de Dios y ensalzamiento de la fe católica e acrecentamiento de estos reinos”.

El testamento de la reina Isabel, poco tiempo antes de que falleciera el 26 de noviembre, se vuelve a insistir en la decisión política de que Granada sea elegida como el mausoleo de la dinastía. Provisionalmente, en este documento el convento elegido fue el de San Francisco, que se encuentra en la Alhambra y fue realizado en diciembre de 1504 y, como se ha mencionado anteriormente, sería una construcción provisional hasta la finalización de la Capilla Real

La Capilla Real, mausoleo de los Reyes Católicos, representa en sí el vínculo personal bajo el que se articuló la Monarquía Universal. Entre los principales motivos por los cuales los monarcas decidieron Granada para establecer su mausoleo podemos destacar que en Granada culmina un esfuerzo secular colectivo, nace el impulso expansivo hacia oriente, y se innova con la creación de diversas instituciones como la Real Chancillería, la Capitanía General y el Patronato Regio y nuevas formas de gobernar que marcarán el inicio de la modernidad.

Es importante destacar que el matrimonio de Isabel y Fernando no significó una fusión de ambas Coronas ya que éstas siguieron conservando su propia estructura jurídico-política y conservaron así, sus leyes e instituciones, es decir, sus propias Cortes, milicias, monedas, etc. En Castilla se siguió con el peculiar régimen de unión accesoria de todos los territorios que la integraban, régimen que Alfonso García Gallo describió de la siguiente manera: “se funden en un todo principal, las instituciones políticas son comunes a todos ellos y todos se rigen por un mismo Derecho, excepto en lo que respecta al de cada ciudad”. Y por otra parte, Aragón continuó con su sistema de reinos separados en los que los reinos conquistados de Valencia y de Mallorca tuvieron instituciones políticas propias y se rigieron por un sistema jurídico propio. Podemos ver cómo el objetivo principal de los Reyes Católicos fue el de una profunda y total remodelación de sus órganos ejecutivos, para evitar la pillería y el desfalco por parte de los ejecutores de sus políticas, organismos anquilosados que provocarían dos tipos de disputas tanto las internas entre el Gobierno y sus funcionarios y externa entre la población y los propios funcionarios.



Figura 2. Entrada a Capilla Real.

1.3 Marco Arquitectónico

Se compone de una planta en cajón, pues todo el edificio se enmarca en un rectángulo, cuyas dimensiones son las de 50,80 metros de longitud y 21,8 metros de anchura. Las naves tienen forma de cruz latina con cabeza absidal, cuatro capillas laterales y un coro dispuesto sobre parte de la nave. Esta divide la altura del edificio con una bóveda muy rebajada de crucería enriquecida con rosetones de madera en los cruzamientos de los nervios.

A la derecha se encuentra adosada la sacristía formada por una sala dividida en dos, y a sus pies tiene una puerta que comunica al sagrario y a dos capillas laterales (en el pasillo). Finalmente bajo los cenotafios, unas escaleras conducen a la cripta abovedada subterránea, caracterizada por su austeridad, tan solo decorada con un crucifijo alemán del siglo XVI y la corona y el cetro real.

1.3.1 Materiales

El principal material es el sillar de caliza de la zona, con argamasa para su unión. También se ha utilizado, pero poco, mármoles de Macael para algunos detalles y piedra de Sierra Elvira para la puerta que da a la Madraza.

1.3.2 Estructura

Es una típica estructura gótica, con esbeltos pilares que soportan el peso de la bóveda. Tiene cinco pares de pilares para las cuatro bóvedas de la nave principal. Estas (bóvedas) son estrelladas, una evolución de la bóveda de crucería nervada.

Los muros, aunque no son portantes en su mayoría, son pesados por estar también contruidos por grandes sillares de caliza. En ellos no se abren ventanas excesivas, sino medianas de tamaño. Quizás la mayor originalidad arquitectónica sea su gran tamaño, inspirada en iglesias franciscanas por su eficacia constructiva y su sencillez estructural, ya que los altos pilares fasciculados del crucero son capaces de descargar la amplia bóveda estrellada.

En el exterior se observan los contrafuertes en los que se apoya toda la estructura y las bóvedas, rematados con ricos pináculos. Sus sobrios muros se rematan con ricas y virtuosas cresterías y balaustradas. Mientras que su interior es característicamente sobrio.

1.4 El monumento en la actualidad

En la actualidad la Capilla Real forma parte de un conjunto de monumentos de fuerte importancia histórico-cultural y generadores de gran afluencia turística. Además de los complejos religiosos, varios edificios de la zona han evolucionado hacia un enfoque cultural. La Madraza alberga exposiciones temporales regidas por la UGR.

Se han añadido otras entidades, como el centro José Guerrero, dedicado a diversos actos y exposiciones culturales y que alberga parte de la obra de este pintor.

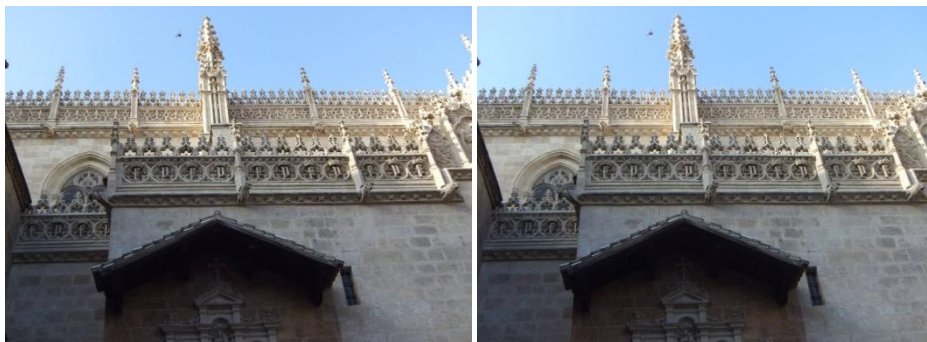


Figura 3. Par esteoroscópico correspondiente a la parte delantera de la fachada de la Capilla Real vista desde la entrada.

2 Métodos y materiales

Los métodos y materiales utilizados en este trabajo difieren en gran medida dependiendo del área de enfoque de la información vertida en el trabajo. Si nos remitimos al marco histórico artístico vale mencionar la metodología, que a su vez, incluye los materiales. Así mismo, desde esta área del conocimiento lo que se ha hecho ha sido realizar una profunda investigación histórico artística del monumento en cuestión refiriéndose a la bibliografía presente en este trabajo. Del mismo modo se ha procedido al referirse a la Capilla Real desde el punto de vista jurídico y político. Por otro lado, a la hora de analizar este edificio desde el marco arquitectónico, no solo se ha realizado una investigación bibliográfica sino que además, se han valido de bocetos, dibujos y fotografías tanto en 3D como en 2D. La interacción resultante de estos 3 ámbitos del conocimiento tan amplios dan lugar a un análisis global de la Capilla Real rico en de detalles y puntos de vista que se encadenan entre sí.

No obstante, desde el punto de vista de la Óptica, la metodología y los materiales utilizados tomaron un rumbo distinto. Para realizar las fotografías en 3D con la cámara FUJIFILM FinePix Real 3D W3. Se ha requerido, además de la propia máquina, un programa procesador de los archivos .MPO que facilita la extracción del archivo con la imagen que posee la disparidad de la escena. Además se requerirá de un programa creador de anaglifos en el

cual la disparidad que proporciona una imagen se ve tintada de un color y la disparidad de la otra en un color opuesto. Para las fotografías realizadas con las dos cámaras *Canon PowerShot SX270* se procederá con el creador de anáglifos. Así mismo. Se crearon pares estereoscópicos que incluían dos imágenes con cierta disparidad, con el fin de apreciar una única imagen en 3D. Para dichos pares estereoscópicos, se utilizaron soportes en cartón pluma y dos lentes oftálmicas orgánicas. Además de los anáglifos, las imágenes con disparidad colocadas en los estereogramas, también se crearon gafas con filtros rojo-cian para poder apreciar los anáglifos, tanto en color como en blanco y negro.

3 Resultados

La integración de la información dada por cada disciplina, da como resultado un único bloque en el que se intercalan los conocimientos de cada área enriquecidos por la propia interacción de cada una de ellas. La introducción de la fotografía en 3D supone una apreciación de las posiciones de los objetos, de los relieves, de los detalles arquitectónicos y artísticos de una determinada parte de la escena con un nuevo parámetro añadido; la percepción de la profundidad. La percepción de la profundidad dotará al observador de una información extra acerca de la posición relativa de unos objetos con otros.

4 Discusión

A continuación se analizarán las mejoras reales de la apreciación de una obra arquitectónica con fotografía 3D:

- En los relieves: Gracias a la apreciación de la profundidad estereoscópica mediante la observación directa de anáglifos, se obtiene una información visual mucho más fina de la escena que la que se podría obtener con una fotografía en 2D. La información que da la imagen en 2D se basa en el sombreado del relieve, rasgo que no se pierde al observar la imagen en 3D, si no que se añade.
- En los objetos: Puede apreciarse su posición relativa real con respecto a otros objetos o detalles dentro de la Capilla.
- En el fondo: La sensación visual resultante de la apreciación de los anáglifos cuya imagen global se centra en el fondo de la capilla, es la sutil percepción del hueco de las bóvedas así como las distancias entre ellas.

Al comparar los anáglifos realizados en blanco y negro y los realizados a color, la mejor percepción estereoscópica se logra con los primeros. Esto es debido a que, cuando realizamos los anáglifos, la disparidad entre las dos fotos originales se tiñe de colores oponentes, al aparecer en escena un mayor número de colores, el sistema visual se puede llegar a confundir a no saber que correspondencia retiniana tiene un color con respecto a otro. Además, a esto le añadimos que, el sistema visual, analiza por una vía neural la estereopsis y por otra diferente la apreciación del color. Cuando se fomenta la excitación de una de ellas se evita la confusión que puede producir la activación de las dos.

En cuanto a la apreciación de los estereogramas en el estereoscopio, estos aspectos no importan, ya que en este caso no estamos hablando de anáglifos si no de dos imágenes con diferente disparidad.

5 Agradecimientos

Nuestro agradecimiento al Proyecto de Innovación Docente 13-38 aprobado en el Programa de Innovación y Buenas Prácticas Docentes 2013 de la Universidad de Granada. Agradecer además a la Capilla Real de Granada el permitir el acceso y la visita a los alumnos y los profesores participantes en este proyecto, por habernos invitado a participar en él, además de habernos ayudado enormemente durante el trascurso y realización del mismo.

6 Referencias

1. GALLEGO BURÍN, Antonio. "La Capilla Real de Granada"- Granada: Comares de Granada.
2. HENARES CUELLAR, Ignacio. "La Capilla Real, La Catedral y su entorno", Granada: Los Libros de la Estrella de Diputación de Granada.
3. GOMEZ-MORENO et al., 2006 "Granada en tus manos, Centro Histórico I" Granada: Ideal.
4. TOMÁS Y VALIENTE, Francisco. Manual de Historia del Derecho Español. España: Tecnos; 1979
- a. AGUITA CANTERO, Ricardo. "L Ciudad Construida". Granada: Los Libros de la Estrella de Diputación de Granada
- b. GOMEZ-MORENO CALERA, Manuel. "Guía de Granada " Granada: Universidad de Granada
5. E. ROSENTHAL, Earl. "El Primer Contrato de la Capilla Real" Cuadernos de Arte de la Universidad de Granada XI
6. GALLEGO BURÍN, Antonio. "Guía Artística e Historia de la Ciudad" Granada: Editorial Comares.
- a. LOPEZ et al. 2006 "Guía Artística de Granada y su Provincia: Tomo I" España: Los Libros de la Estrella de Diputación de Granada
7. PITA ANDRADE, José Manuel "La Capilla Real de Granada". Obra cultural de la caja de ahorro de Granada.
8. HENARES CUÉLLAR, Ignacio "La capilla real, la catedral y su entorno". Granada guías de historia y arte.
9. www.capillareal/granada.com
10. <http://www.artehistoria.jcyl.es/v2/monumentos/1530.htm>
11. <http://www.ucm.es/data/cont/docs/446-2013-08-22-10%20reforma.pdf>

CO-12 Applicability of advanced separation techniques in combination with different detection systems to forensic analysis. Empleo de técnicas de separación avanzadas en combinación con diferentes sistemas de detección para análisis forense

D. Airado-Rodríguez^{1,*}, C. Cruces-Blanco¹, A.M. García-Campaña¹

1) Department of Analytical Chemistry, University of Granada. Campus Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

* airado@ugr.es

Abstract

It is a fact that the use of drugs of abuse is increasing worldwide, and millions of individuals are reported to be users of cannabinoids, amphetamine-like stimulants, ketamine, and LSD among others, which implies significant consequences for human health and social behavior. Because of this, it is necessary to develop analytical methodology to monitor the presence of these drugs in biological samples.

Here we present developed and validated analytical methodologies based on the combination of miniaturized separation techniques such as capillary electrophoresis (CE) and ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled with different detection techniques as Diode Array Detection (DAD), Laser Induced Fluorescence (LIF) and tandem Mass Spectrometry (MS/MS), which constitute an alternative to the well-established methodologies employed in forensic laboratories.

In these laboratories, it is possible to study both, chronic or punctual drugs consumption, and this fact precondition in a huge extension the kind of sample that the analyst has to deal with. Recent consumption is normally investigated in whole blood, blood serum or urine, while hair is an interesting sample to study chronic consumption. Sample treatment is a must when dealing with such a complex samples. Solvent microextraction (ME) methodologies are the current trend for sample treatment. They are considered green sample pretreatment techniques, since they involve the reduction of the volume of organic solvents. The applicability of these novel sample treatment techniques prior to the application of CE or UHPLC has been also demonstrated, being an important contribution in the analytical toxicology forensic laboratories.

Palabras clave

Drogas de abuso, fluidos biológicos, técnicas separativas, tratamiento de muestra.

1 Introducción

El término droga de abuso tiene un amplio significado relacionado con la ingesta de una droga psicoactiva con fines no terapéuticos ni médicos. En los últimos años, el aumento del consumo de drogas de abuso está causando serios problemas sociales y de salud en todos los países del mundo, aumentando también su accesibilidad, sus implicaciones en el comportamiento social y la importancia de su determinación clínica y forense.

La investigación toxicológica de drogas de abuso puede realizarse bien por un consumo reciente o por un uso crónico de las mismas y, según el caso, las muestras biológicas a utilizar son diferentes. Desde el punto de vista clínico y/o judicial pueden presentarse ambas situaciones¹ (Bermejo *et al.*). Cuando se trata de demostrar un consumo reciente de drogas, es decir, en las últimas horas, bien al tratarse de un caso de intoxicación aguda o porque el consumo está relacionado con alguna actividad delictiva, las muestras biológicas más recomendadas son la sangre, orina, contenido gástrico y saliva; cuando lo que se pretende es demostrar la existencia de un consumo crónico de drogas, o un consumo esporádico pero continuado en el tiempo, las muestras citadas anteriormente no son útiles y habrá que recu-

rrir al análisis de peloⁱⁱ (*Wada et al., 2006*). Esta es la única muestra biológica que permite constatar un consumo prolongado con anterioridad a la toma de muestra

El papel fundamental de la Química Analítica dentro de la Toxicología Forense sería el de proporcionar datos analíticos concretos y fiables en una variedad de muestras biológicas, acerca de las drogas presentes y/o sus metabolitos. Los laboratorios periciales deben ser capaces de detectar cada vez mayor número de sustancias diferentes y de usar métodos de identificación y detección que sean rápidos y, al mismo tiempo, fiables y específicosⁱⁱⁱ (*Taberner Duque et al., 2009*).

En los últimos años, las técnicas de separación miniaturizadas han cobrado gran interés debido a las numerosas ventajas que presentan, tales como la reducción del consumo de disolventes, el incremento en la resolución e incluso una mejora en la sensibilidad. Igualmente es de destacar los bajos volúmenes de muestras requeridos. Esta comunicación en concreto se centra en la Electroforesis Capilar (CE) y la Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (UHPLC) que implica el uso de columnas de reducido diámetro de partícula y sistema de alta presión se presenta como una poderosa alternativa que proporciona elevadas eficacias y cortos tiempos de análisis. Estas técnicas acopladas a sistemas de detección como detectores fotométricos de batería de diodos (DAD), de fluorescencia (FL), fluorescencia inducida por láser (LIF) o de espectrometría de masas (MS) constituyen una poderosa herramienta analítica en este ámbito.

En esta comunicación, presentamos diversos ejemplos de aplicación de técnicas de separación avanzadas, concretamente CE y UHPLC en comparación con DAD, LIF o MS al análisis de drogas de abuso en fluidos biológicos y pelo.

2 Materiales

2.1 Reactivos

Se adquieren comercialmente patrones de las drogas de interés y metabolitos, preparados en metanol o acetonitrilo, en concentración de 100 ó 1000 mg/L y volumen 1.0 mL.

2.2 Aparatos

Electroforesis capilar Agilent HP-3D acoplado a detector de diodos (DAD) y a detector de fluorescencia inducida por láser (Picometrics), el cual opera a 325 nm, por medio de un láser de He-Cd.

UHPLC-MS: Cromatógrafo Agilent 1290 y espectrómetro de masas API 3200 triple cuadrupolo de Applied Biosystem. Paquete de software API 3200/3200QTRAP.

3 Resultados y discusión

3.1 FASI-CZE-DAD

Se ha empleado electroforesis capilar zonal (CZE) con detección UV para la detección de metanfetamina (ME), 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA), fenciclidina (PCP) y la dietilamida del ácido lisérgico (LSD) en orina. En la tabla 1 se muestran las condiciones optimizadas para la separación.

Tabla 1. Condiciones óptimas de separación mediante CE

Separation pH	6.0
Separation buffer	NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄
Buffer concentration	100 mM
Separation temperature	20 °C
Capillary	Extended light path (150 μm)
	Internal diameter: 50 μm
	72 cm total length / 63.5 cm effective length
Separation voltage	30 kV
Capillary pre-conditioning	1) 1 min NaOH 0.1 M (6 bar) 2) 0.5 min H ₂ O (6 bar) 3) 5 min separation buffer (6 bar)
Detection wavelength	205 nm

La Electroforesis Capilar (CE) es una técnica separativa miniaturizada competitiva con la cromatografía, por lo que se ha ido introduciendo progresivamente en los laboratorios forenses en los últimos años, como una opción alternativa y/o complementaria a las anteriores. Entre sus principales ventajas se pueden citar altas eficacias de separación, tiempos de separación cortos, volúmenes de muestra muy pequeños al emplear capilares muy estrechos y cantidades de reactivos muy pequeñas, por lo que el coste y la contaminación ambiental disminuyen considerablemente. No obstante presenta una limitación importante, que es la falta de sensibilidad. Este inconveniente puede solucionarse bien empleando sistemas de detección especialmente sensibles, como LIF ó MS; o bien empleando técnicas de apilamiento de muestra (*stacking*).

En el presente caso, se empleó la inyección mediante amplificación de campo (FASI) como técnica de *stacking*. FASI, básicamente consiste en inyectar la muestra disuelta en un disolvente de conductividad inferior a la del tampón de separación. En estas condiciones, al aplicar voltaje para inyectar electrocinéticamente la muestra, se produce una amplificación del campo eléctrico en la zona de baja conductividad, con el consiguiente aumento de la cantidad de analito (cargado) que se introduce en el capilar. Se optimizaron los valores de tiempo y voltaje de separación a 20 s y 5 KV, respectivamente para realizar FASI. En la figura 1 se muestra el efecto de *stacking* conseguido en las condiciones optimizadas.

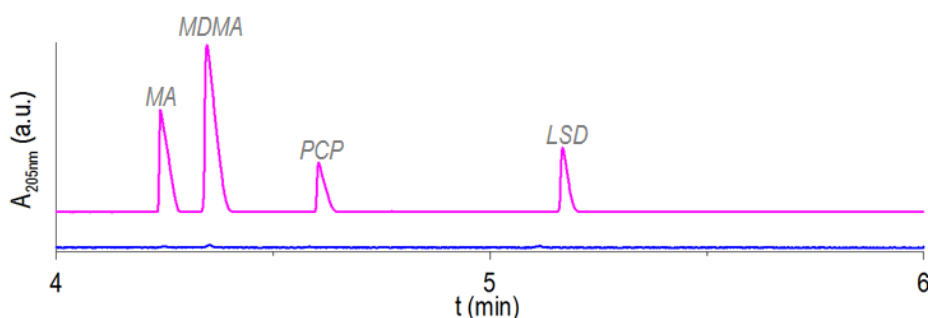


Figura 1. Electroferogramas correspondiente a un patrón conteniendo 874 ng/mL de MA, MDMA, PCP y LSD, preparado en agua ultrapura e inyectado hidrodinámicamente (50 mbar x 10s) (—) y electrocinéticamente a 5 KV durante 20 s (—).

La metodología propuesta se validó en términos de linealidad, límites de detección y repetibilidad, obteniéndose los parámetros analíticos de calidad recogidos en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros analíticos de calidad para la determinación de MA, MDMA, LSD y PCP mediante FASI-CZE-UV

	MA	MDMA	PCP	LSD
Linearity range (ng/mL)	9.00-300	9.00-300	9.00-300	9.00-300
Calibration curve	$y=0.0203x + 0.134$	$y=0.0426x + 0.228$	$y=0.0095x + 0.0328$	$y=0.0065x + 0.0585$
r	0.9994	0.9991	0.9965	0.9962
LOD (S/N=3) (ng/mL)	9.40	9.40	49.7	75.3
LOQ (S/N=10) (ng/mL)	64.6	56.0	178	259

Se aplica el método propuesto a muestras de orina humana. Como técnica de tratamiento de muestra, previa a su análisis mediante CE, se escogió la extracción en fase sólida (SPE), la cual proporcionaba porcentajes de recuperación superiores al 82 % para los cuatro analitos de interés.

3.2 FASI-CZE-LIF

Se ha propuesto un método altamente sensible para la determinación de LSD e iso-LSD en cabello humano, basado en la combinación de la electroforesis capilar zonal (CZE), previa preconcentración en línea de los analitos, con la detección mediante fluorescencia inducida por láser (LIF). La técnica de preconcentración en línea empleada ha sido la inyección de muestra mediante campo amplificado (FASI).

La separación de los dos analitos de interés, junto con la metilergonovina, empleada como patrón interno, se ha llevado a cabo en un capilar de 72 cm de longitud efectiva, empleando tampón citrato 25 mM (pH 6.4) como medio de separación. Se han optimizado las variables químicas e instrumentales intrínsecas al método para conseguir la máxima eficacia en la separación y el máximo rendimiento cuántico de fluorescencia de los analitos. En la tabla 3 se resumen las condiciones optimizadas para la separación y detección de los analitos de interés.

Tabla 3. Condiciones optimizadas de separación y detección

pH de separación	6.40
Tampón de separación	citrato ($C_6H_6O_7Na_2/C_6H_5O_7Na_3$), 25 mM
Temperatura de separación	20 °C
Capilar	Capilar de sílice fundida
	Diámetro interno: 75 μ m
	Longitud total 87-cm / Longitud efectiva 72-cm
Voltaje de separación	20 kV
Acondicionamiento del capilar	1) 0.5 min NaOH 0.1 M (2 bar) 2) 0.5 min H ₂ O (2 bar) 3) 3 min tampón de separación (2 bar)
Detección	LIF (Láser He-Cd, $\lambda_{ex} = 325$ nm)

En este caso, la optimización del voltaje y tiempo de inyección se ha llevado a cabo quimiométricamente a través de diseño de experimentos, analizando los resultados mediante la metodología de superficies de respuesta. Se obtuvieron valores óptimos de 15 s y 7 KV para tiempo y voltaje de inyección, respectivamente. Los factores de preconcentración alcanzados bajo estas condiciones para LSD e iso-LSD fueron 77 y 20, respectivamente.

Se encuentra una relación lineal entre áreas de pico y concentraciones en los rangos 6.9 – 200 pg/mL y 9.0 – 200 pg/mL para LSD e iso-LSD, respectivamente. Se calculan límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de 2.1 y 6.9 pg/mL y 2.7 y 9.0 pg/mL para LSD e iso-LSD, respectivamente.

La metodología FASI-CZE-LIF desarrollada ha sido aplicada al análisis de iso-LSD y LSD en muestras de cabello humano. El procedimiento experimental de tratamiento de la muestra de cabello se resume en la figura 2. En dicha figura se muestran también electroferogramas registrados para un blanco de cabello y muestras fortificadas a dos niveles distintos.

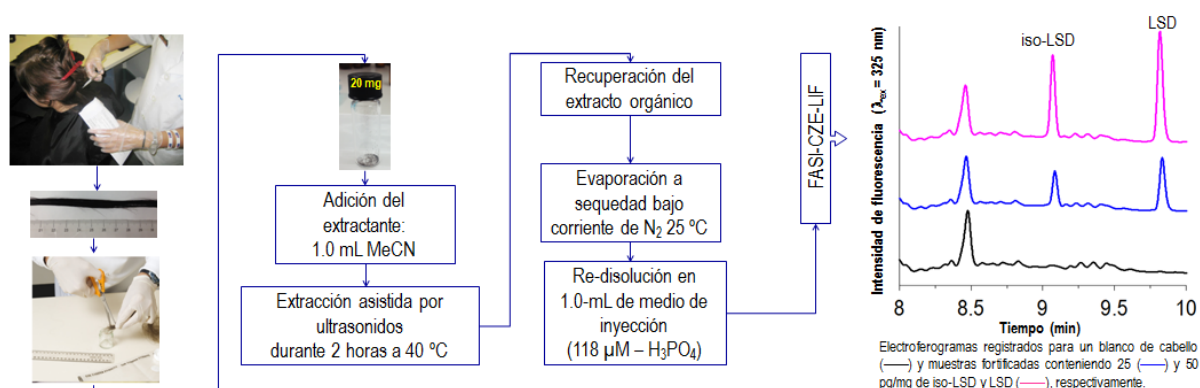


Figura 2. Procedimiento experimental para la determinación de LSD e iso-LSD en cabello

La extracción asistida por ultrasonidos proporciona buenos porcentajes de recuperación para los dos analitos de interés, lo cual posibilita la determinación de LSD e iso-LSD a los niveles típicos encontrados en cabello tras su consumo, suponiendo la presente metodología una buena alternativa para su implantación en laboratorios forenses.

3.3 UHPLC-MS/MS

Se ha desarrollado un método de UHPLC - ionización por electrospray (ESI) - espectrometría de masas en tandem (MS/MS), para la detección, identificación y cuantificación de 21 drogas de abuso. En dicho estudio se han incluido opiáceos, cannabinoides, anfetaminas y compuestos alucinógenos.

La separación se lleva a cabo en un tiempo total de 10 minutos, utilizando una columna Kinetex XB-C18 (100 x 2.1 mm and 1.7 μm particle size) y elución en gradiente con una fase móvil compuesta por ácido fórmico al 0.013 % en agua y acetonitrilo con 0.013 % del mismo ácido. En la tabla 4 se resumen las condiciones óptimas de separación.

Los resultados de la optimización de los parámetros relacionados con la detección mediante MS/MS, así como los iones utilizados para la identificación y cuantificación de cada analito se recogen en la tabla 5.

Así mismo, la figura 3 muestra un cromatograma obtenido en las condiciones optimizadas de separación y detección para una disolución conteniendo 50 ng/mL de los 21 analitos de interés.

Tabla 4. Condiciones óptimas de separación

Column	Kinetex XB-C18 column (100 x 2.1 mm and 1.7 μ m particle size)
Mobile phase	A: 0.013 % aqueous formic acid
	B: acetonitrile with 0.013 % formic acid
	0 min, 2% B; 0 to 3 min, 8% B; 3 to 5.5 min, 25% B; 5.5 to 7 min, 90% B; 7 to 8 min, 90 % B; 8 to 8.20 min, 2% B; 8.20 to 11 min, 2 % B.
Flow rate	0.4 mL / min
Injection volume	19 μ L
Temperature	35 $^{\circ}$ C

Tabla 5. Detección MS/MS

Analyte	Precursor ion (m/z)	DP*	EP*	CEP*	Product ion	CE*	CXP*
MA	180.15	26	6	10	91 (Q**)	25	4
					119.1 (I**)	15	4
MDA	180.15	16	5	12	163.2	13	4
					105	31	4
MDMA	194.20	26	7	10	163.1	19	4
					105	33	4
MDEA	208.16	21	8.5	12	163.2	17	4
					105	39	4
DeHnorKETA	222.1	26	9.5	12	205.1	17	4
					142.2	35	4
norKETA	224.11	26	8	12	125.1	31	4
					207.1	17	4
LIDO	235.23	31	8.5	10	86	27	4
					58	51	4
KETA	238.10	36	8	12	125.1	35	4
					220	19	4
PCP	244.21	21	7	14	85.1	19	2
					91	51	4
MEPI	247.20	31	8	14	98	27	4
					70.1	61	4
TETRA	265.20	26	6.5	12	176.1	23	4
					72.1	37	4
BUPI	289.227	36	8	14	140.2	27	4
					84.1	55	4
nor(iso)LSD	310.22	41	9	16	209.2	35	4
					193.1	55	4
CBN	311.20	36	11	12	223	29	4
					293.2	21	6
THC	315.20	51	9.5	14	193.2	33	6
					123	47	4
CBD	315.26	46	10	14	193.1	27	4
					123.1	47	4
isoLSD	324.26	61	6	14	208.1	41	6
					180.2	49	4
LSD	324.99	46	9	12	223.1	31	4
					208.1	39	4
PAPA	340.14	61	8.5	14	202.1	39	6
					324.1	39	6
THCCOOH	348.20	51	8	12	302.1	27	4
					330.1	19	8
2-OXO-3-OH-LSD	356.20	41	9.5	18	237.1	29	4
					222.1	41	6

*DP (Declustering potencial); EP (Entrance potencial); CEP (Collision cell entrance potencial); CXP (Collision cell exit potencial); CE (Collision energy).

** (Q): product ion for quantification; (I): product ion for identification

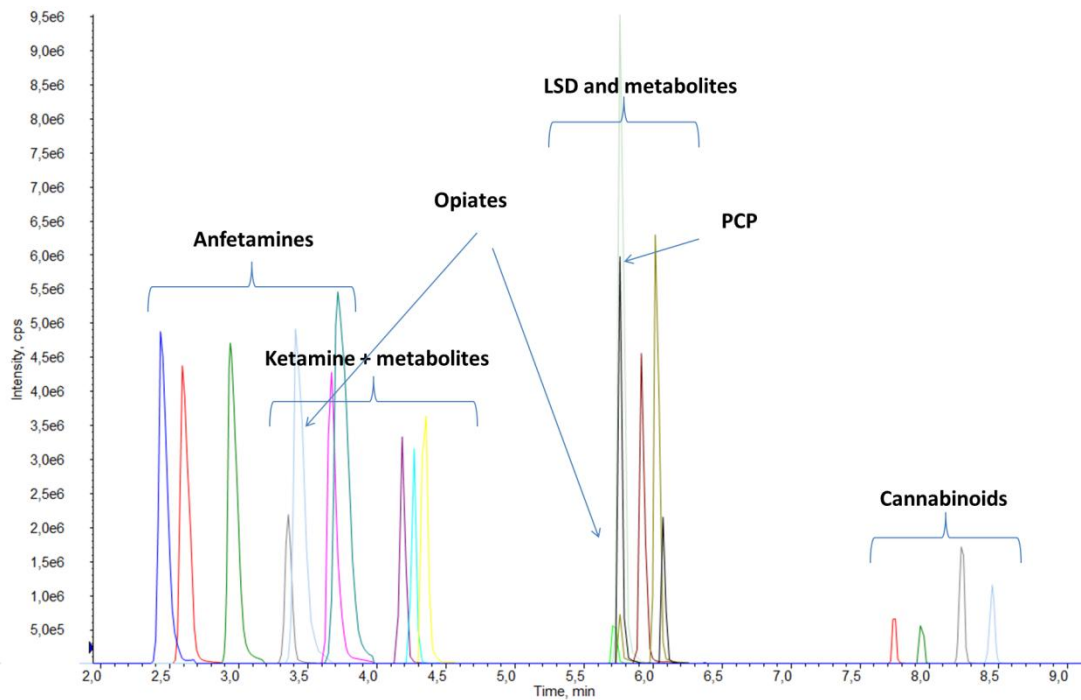


Figura 3.- Cromatograma correspondiente a una disolución patrón conteniendo 50 ng/mL de los 21 analitos de interés.

En este caso, se ha empleado microextracción líquido líquido dispersiva (DLLME) como técnica de pretratamiento de la muestra. La DLLME es una técnica novedosa de microextracción, inicialmente desarrollada por Rezaee y colaboradores^{iv} (Rezaee *et al.* 2006). Básicamente, consiste en la rápida inyección de una mezcla de disolvente extractante y disolvente dispersivo en el seno de la disolución problema (acuosa). Como consecuencia de esta rápida inyección, se genera un estado de nebulosa y los analitos de interés son extraídos en el interior de pequeñas gotas de disolvente extractante. En la figura 4 se muestra una representación esquemática del proceso. Se seleccionaron dibromometano y acetonitrilo como disolventes extractante y dispersivo, respectivamente. Sus proporciones, así como el porcentaje de NaCl en la fase acuosa (para favorecer el efecto *salting-out* en la extracción) fueron quimiométricamente optimizados a través de diseño experimental, resultando valores óptimos de 586 μL CH_2Br_2 , 941 μL MeCN y 510 mg NaCl/5.0 mL fase acuosa.

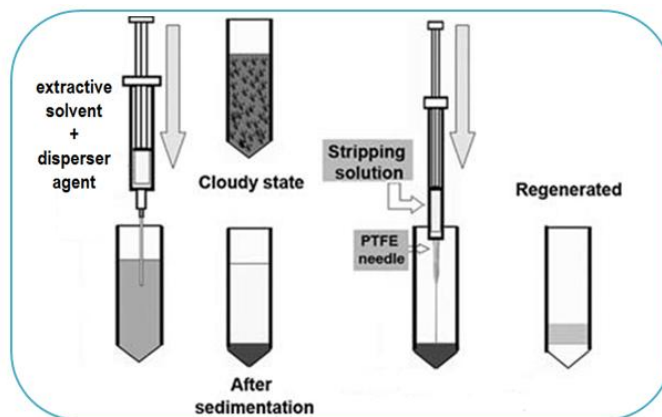


Figura 4. Representación esquemática de DLLME

La metodología propuesta ha sido satisfactoriamente aplicada a muestras de suero y orina humanas. Los porcentajes de recuperación estuvieron en todos los casos por encima del 80 % y los límites de detección y cuantificación alcanzados permitían la monitorización de dichas drogas en suero y orina a niveles reales tras su consumo.

4 Conclusiones

Se comprueba la aplicabilidad de las técnicas de separación avanzadas en combinación con distintos sistemas de detección, previa aplicación de técnicas de tratamiento de muestra, al análisis de drogas de abuso en fluidos biológicos y pelo a los niveles reales encontrados en dichas matrices.

5 Referencias

-
- 1 A.M. Bermejo, B. López de Abajo, C. Pereiro, M.J. Tabemero, « Investigación toxicológica en drogodependencias ». Colección de Drogodependencias, Vol. 14, Plan Autonómico sobre drogodependencias, Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia.
 - 2 M. Wada, K. Nakashima, « Hair analysis : an excellent tool for confirmation of drug abuse », *Anal. Bioanal. Chem.* 2006; 385:413
 - 3 M.J. Tabemero Duque, A.M. Bermejo Barrera, *Boletín Galego de Medicina Lega e Forense*, nº 16 (2009)
 - 4 M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *J. Chromatogr. A* 2006; 1116:1-9

CO-13 Generating images of caviar flavor from multispectral imaging of autofluorescence

D. Airado-Rodríguez^{1,2,*}, M. Høy¹, Josefine Skaret¹, J.P. Wold¹

1) Nofima, Osloveien 1, N-1430 Ås, Norway.

2) Department of Analytical Chemistry, University of Granada. Campus Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

* airado@ugr.es

Abstract

Oxidation of foods is a major cause for limited shelf life. Studies of how oxidation and oxidation processes are affected by packaging, storage conditions and storage time are therefore important to optimize these conditions. A set of methods are established for such, based on chromatography and wet chemistry, however, most of them are destructive and time consuming. Sensory analysis is a highly relevant method and in many cases more sensitive than instrumental methods, however its main drawback is the high cost of a well-trained sensory panel, as well as a rather low sample capacity. Thus, rapid and non-destructive analytical methodology able to detect early stages of protein and lipid oxidation in complex food matrices is highly needed. In this regard, front-face fluorescence spectroscopy is a potentially attractive technique.

In this work, the potential of multispectral imaging of autofluorescence to map sensory properties has been investigated, using cod caviar paste as a case product. We demonstrate that multispectral imaging of autofluorescence in combination with partial least squares regression, is a well-suited methodology to map sensory flavor properties. As far as we know this is the first time that sensory images of sensory attributes are obtained based on multispectral imaging. The approach of making regression models based on homogeneous bulk samples, and then applying these calibrations pixel by pixel to study details in heterogeneous samples is effective and can be recommended for quantitative multispectral imaging of other complex bio-systems, also at the microscopic level.

Keyword

Multispectral imaging, autofluorescence, sensory analysis

1 Introduction

Oxidation of foods is a major cause for limited shelf life. Studies of how oxidation and oxidation processes are affected by packaging and storage conditions are important. A set of methods are established for such, based on chromatography and wet chemistry, however, most of them are destructive, time consuming and not necessarily optimised for complex foods.

Sensory analysis is a highly relevant method and in many cases more sensitive than instrumental methods. However, the high cost of a well-trained sensory panel, as well as a rather low capacity with respect to the number of samples that can be analysed per day are important drawbacks.

Thus, analytical methodologies able to detect early stages of protein and lipid oxidation in complex food matrices are highly needed, with particular interest in those, which are rapid and non-destructive. In this regard, front-face fluorescence spectroscopy is a potentially attractive technique. Fluorescence spectroscopy is an instrumental technique which has been extensively exploited for studies of molecular structure and function in the discipline of chemistry and biochemistry^v (*Strasburg et al., 1995*). Fluorescence measurement can be performed by using either classical right-angle solution fluorescence or front face fluorescence spectroscopy. In classical fluorescence, for sample absorbance lower than 0.05, measure-

ments are performed on solution, where the intensity of the emitted light is proportional to the fluorophore concentration^{vi} (Guilbault, 1990). When the absorbance of the sample exceeds 0.05, fluorescence is quenched and spectra are distorted. It is standard practice to dilute the original sample until obtaining an absorbance less than 0.05, nevertheless, results obtained on diluted samples are not always comparable to those obtained with an original sample. To overcome this problem and examine intact samples directly, the front-face technique is more appropriate. The technique was originally developed in 1968^{vii} (Parker, 1968). In front-face fluorescence spectroscopy, the surface of a sample is simply illuminated by excitation light, and the emitted fluorescence from the same surface is measured, which minimizes reflected light, scattered radiation and depolarisation phenomena.

Spectral imaging is an interdisciplinary field comprising image analysis, spectroscopy and chemistry. Spectral imaging is divided into two main techniques: hyperspectral imaging and multispectral imaging. The hyperspectral technique acquires images at numerous (hundreds) continuous wavebands, while the multispectral technique acquires images only at few (normally around 10 or less) discrete wavebands.

The objective of this article is to demonstrate how multispectral imaging based on front face fluorescence can be used to make images of the spatial distribution of sensory properties related to oxidation. Cod caviar paste was used as a case product and it was stored over time to obtain a relevant span in lipid oxidation and sensory properties. A sensory panel was used to assess the sensory properties of a calibration and a test set based on homogeneous samples. Spectral images of these homogeneous samples were obtained and multivariate models based on partial least squares regression (PLSR) were constructed and tested. These models were then applied on images of heterogeneous samples with gradients in oxidation.

2 Materials and Methods

An experimental design including storage time, light exposure, and O₂ headspace-concentration was created in order to obtain a large but relevant span in quality properties of cod caviar paste. Three different atmospheres were employed for the storage of the samples (anaerobic conditions with 100 % N₂, 1 % O₂, and 21 % O₂). Some samples were exposed to light, while others were stored in the dark. A code was assigned to each sample, indicating the days of storage, the presence (L) or absence (D) of light exposure during storage, and the concentration of O₂ in the headspace. The codes employed in this table will be further used to identify the samples throughout the article. *E.g.* code 1L21 refers to a sample that has been exposed to the light for one day in presence of 21 % of oxygen in the headspace.

Calibration and test sets were generated in this way. A third set of samples was prepared exposing to light only some parts of the samples and not others, inducing in this way heterogeneous exposition patterns. A total of 6 different patterns were assayed, both under short and long term light exposure conditions (20 hours and 14 days, respectively).

2.1 Data analysis

Multivariate regression models were constructed based on the calibration image dataset (X) and the sensory assessed attributes (Y).

Partial least-squares regression (PLSR)^{viii} (Martens & Naes, 1989) was employed to construct the calibration models between fluorescence data and sensory. The optimal number of PLSR factors of the calibration models was determined by segmented cross-validation, leaving out the pixel spectra from two replicates corresponding to the same storage conditions at the same time. The validation method provided a predicted value \hat{y}_i ($i = (1, \dots, i, \dots, N)$) which was compared with the reference value, y_i . The multivariate prediction correlation co-

efficient (R) and the prediction error, expressed as root mean square error of cross-validation (RMSECV), were used as quality criteria to evaluate the models. RMSECV is defined as

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2},$$

Where i denotes the samples from 1 to N . RMSECV represents the average uncertainty that can be expected when predicting Y -values for new samples.

The constructed calibration models were used for the prediction of reference values of sensory attributes for a test set samples. Model performance was reported as the root mean square error of prediction (RMSEP), calculated exactly as RMSECV (being \hat{y}_i a result of prediction and not cross-validation), and the multivariate correlation coefficient (R). PLSR was performed with the software The Unscrambler (v. 9.8, Camo AS, Oslo, Norway).

The employed fluorescence spectra for the construction of these models were the average spectra of each sample in the calibration set. In the case of the regression for sensory attributes, PLS2 regression was employed. PLS2 is a version of PLSR which allows simultaneous modelling of several Y -variables (sensory attributes in this case) taking advantage of possible correlations or co-linearity between them. For validation, the regression vectors were applied on the average fluorescence spectrum of each of the test samples. The regression vectors were then employed pixel-wise on heterogeneous images to obtain sensory images.

3 Results and Discussion

Regression results are summarized in Table 1.

Table 1.- Results from partial least squares regression (PLSR) for some sensory-assessed attributes of interest (PLS2; #Factors = 2) vs fluorescence (mean spectra).

Sensory attributes		Calibration (N = 32)			Prediction (N = 14)		
		R	RMSECV	Y_{cal} range	R	RMSEP	Y_{test} range
Odours	Fresh odour	0.35	1.0	2.5 - 5.5	0.91	0.57	3.2 - 5.3
	Rancid odour	0.62	0.74	1.0 - 3.7	0.86	0.47	1.1 - 3.0
Flavours	Fresh flavour	0.56	1.1	1.8 - 5.6	0.89	0.75	2.8 - 5.6
	Bitter flavour	0.78	0.32	4.6 - 6.1	0.75	0.31	4.6 - 5.6
	Metallic flavour	0.69	0.35	4.1 - 5.3	0.75	0.26	4.2 - 5.2
	Fish oil flavour	0.66	0.66	2.6 - 4.9	0.82	0.35	3.4 - 4.7
	Rancid flavour	0.69	1.1	1.1 - 5.2	0.88	0.58	1.4 - 4.7

Two factors were selected as optimum for the PLS2 model for sensory attributes, which explained 99.87 % and 96.01 % of the total variance in X and Y -blocks, respectively. Fairly good multivariate correlation coefficients (R) were obtained when calibration models were cross-validated, due probably to the reduced number of samples and the low resolution in the employed calibration spectra. RMSECV ranged between 0.32 and 1.1. Nevertheless, high R values, ranging between 0.82 for fish oil flavour and 0.91 for fresh odour, were obtained when

the obtained models were validated by predicting sensory attributes of the test set. The regression models corroborate that the low resolution image spectra successfully captured the spectral information needed to model the assessed sensory attributes related to rancidity.

When applying the regression vectors to the images of heterogeneous samples, sensory images were obtained (Figure 1). Gradients in sensory properties can be observed corresponding to the pattern of light exposure. Within samples subjected to short term light exposure, loss of freshness and increase in rancidity was observed only when the light exposed area was rather big, e.g. for case “e” or “f”. For samples exposed through small holes or a narrow line (cases “a”, “b” and “d”), no changes in sensory attributes were detected. After 14 days of storage, the distribution of sensory properties reflects the patterns of light exposure quite well. A decrease in the fresh flavour and an increase in rancid flavour is obtained in all exposed areas, most easily seen when exposed areas were large. For case “a” and “b” it can be seen a slight overall decrease of fresh flavour, which can be ascribed to autooxidation. Some small darker regions corresponding to the pinholes can also be discerned. These darker regions can be ascribed to photooxidation.

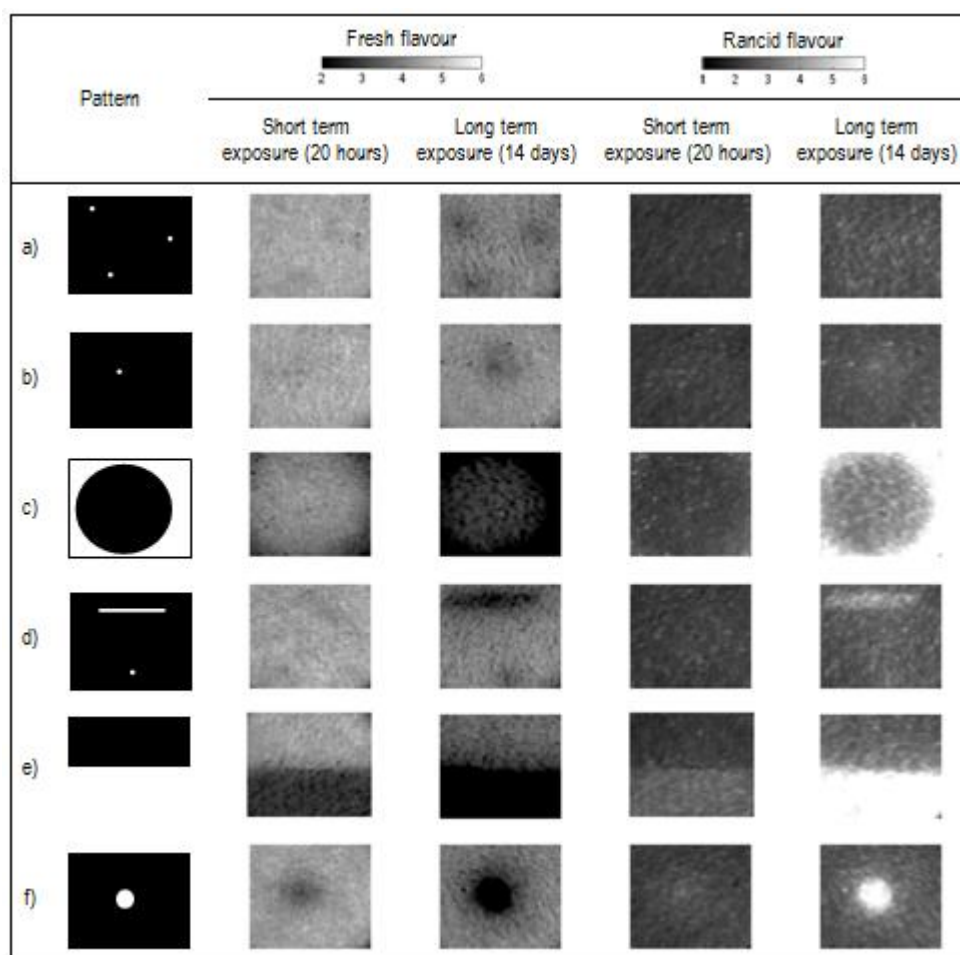


Figure 1. Predicted fresh and rancid flavours for heterogeneous samples exposed to light for 20 hours or 14 days.

4 Conclusions

It is demonstrated that multispectral imaging of autofluorescence in combination with partial least squares regression, is a well-suited methodology to map the distribution of sensory assessed attributes in cod caviar paste. The approach of making regression models based on

homogeneous bulk samples, and then applying these calibrations pixel by pixel to study details in heterogeneous samples is effective and can be recommended for quantitative multi-spectral imaging of other complex bio-systems, also at the microscopic level.

5 References

- 1 Strasburg, G. M.; Ludescher, R. D. Trends in Food Science and Technology. 1995;6, 69-75.
- 2 Guilbault, G. G. In *Practical Fluorescence*; Guilbault, G.G. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., N.Y. 1990
- 3 Parker, C.A. Apparatus and experimental methods. In: Parker, C.A. (Ed.), *Photoluminescence of Solutions with Applications to Photochemistry and Analytical Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1968; pp. 128–302
- 4 Martens, H.; Naes, T. *Multivariate Calibration*; Wiley: Chichester, U.K., 1989

CO-14 Epistemology in the experimental sciences: how a clear conceptual framework improves scientific reading and writing.

Erick García-García, University of Murcia, Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia, Spain.
Department of Cell Biology and Histology. Faculty of Biology. erick.garcia@um.es

Abstract

Epistemology is the branch of philosophy concerned with the nature of knowledge. Among other things, epistemology analyzes what knowledge is, how it is acquired, and its degree of certainty. These areas of epistemology can be summarized in the following questions A) What do we know? B) What do we want to know C) How do we obtain new knowledge? D) How reliable is what we know? These questions clearly address fundamental aspects of the experimental sciences, posing a paradox: No epistemological concepts are typically addressed as part of the experimental sciences curricula.

It is well documented that science students often graduate obviating practical epistemological concepts central to the process of obtaining data and transforming it into knowledge. This lack of conceptual framework often results in students regarding scientific knowledge as something static that is found in books, rather than as a dynamic process that it is constantly revised.

The objective of this paper is to highlight key epistemological concepts, providing students with a practical conceptual framework to improve their learning of science. We illustrate how this basic epistemological framework can be applied to the process of analyzing scientific papers; resulting in a reduction of the time required to read a report, an enhancement of the learning experience, and the broadening the student's scientific scope. We also highlight how possessing clear practical epistemological concepts assists in the process of scientific writing. The use of this conceptual framework will benefit not only young undergraduate students, but also students embarking on post-graduate studies.

1 Introduction

Epistemology is the branch of philosophy concerned with the study of knowledge. Scientific epistemology can be regarded as a description of the nature of scientific knowledge and of its construction.

From a practical perspective, the epistemology of the experimental sciences addresses the following questions: A) What do we know? B) What do we want to know C) How do we obtain new knowledge? D) How reliable is what we know? In general terms, the first question distinguishes the many forms that scientific knowledge may take (e.g. law, theory, observation, or inference). The second question involves the generation of scientific questions that will drive scientific research. The third question addresses the methodological aspects for the generation of scientific knowledge. The fourth question involves the evaluation of scientific knowledge, its predictive power, and its applicability to solve problems outside the academic world.

Epistemological concepts are usually not formally addressed as part of the curricula of the experimental sciences. This often results in a marked difficulty for young science students to recognize that scientific knowledge is constructed by people through a laborious process, and not simply discovered in the world, or found inside books. To the recognition of these facts follows the notion that human creativity is the source of theoretical ideas, aimed at explaining the observations of the natural world. In the experimental sciences, theoretical ideas are tested empirically, evaluated, and continuously revised. Contrary to the notion of many young students, scientific knowledge is not accepted not just because it is "true". Scientific knowledge is actually accepted because people are persuaded of the reliability of its sources, its degree of certainty, and ultimately its value.

When questioned about the information they obtain from a particular scientific article, many students start their answer with the phrase “the authors say that...” This type of answer often reflects the non-critical reading of scientific papers, accepting the new knowledge as indisputable truth, based on the fact that it has been published. The peer-review process required in most cases for the publication of scientific papers constitutes undoubtedly a warrant of the validity of new scientific knowledge. However, the methods used to generate new knowledge can be fallible, and every piece of scientific knowledge can be later reinterpreted in the light of new data, new methodological advances, or new theories. In the light of compelling evidence, a given piece of scientific knowledge once accepted as true can be later regarded as erroneous.

Young science students spend a significant amount of their time reading scientific papers. The non-critical reading of science papers can be a tedious and time-consuming process, derived from the student’s inability to clearly identify key components of scientific publications. The learning of experimental sciences can be greatly optimized if the scientific literature under study is analyzed keeping in mind the questions: A) What did the authors know? B) What did the authors want to know C) How did they acquire new knowledge? D) How reliable is what they know? Once a clear conceptual framework is constructed around these epistemological questions, once these questions are used repeatedly for the analysis of scientific literature, the process of writing scientific papers becomes a simple and straightforward process. In the following sections we will use these questions as conceptual guidelines for optimizing the analysis and production of scientific reports.

Four epistemological questions as a conceptual framework for improving scientific reading and writing

1. What do we know?

Observation and inference are two concepts that are fundamental for the epistemological understanding of science. Observations are descriptive statements about the natural world that are directly accessible to the senses, about which consensus can be reached with relative ease. Inferences, on the other hand, are statements about phenomena that are not directly observable. For example, the notion that objects released above the ground tend to fall down is supported by direct observation. In contrast, the idea that gravity is the cause of objects falling to the ground is inferential, because the concept of gravity can be only measured only through its manifestations on observable entities (e.g. the planetary orbits, the formation of tides, etc.). The understanding of the fundamental distinction between observation and inference is key to the analysis of scientific evidence, and hence key to the learning of the experimental sciences. Through the direct measurement of a limited number of variables the experimentalist often infers causal relationships, mechanisms, effects, etc.

Closely related to the difference between observation and inference is the distinction between scientific laws and theories. Broadly, laws are descriptive statements of relationships among observable phenomena, while theories are inferential explanations for observable phenomena or for regularities observed in those phenomena. For example, Boyle’s law relates the pressure of a gas to its volume and temperature, and the kinetic molecular theory serves to explain it.

Scientific laws are thus generalized descriptions with high predictive value but little explanatory power. Theories, on the other hand, are conceptual frameworks providing higher degrees of explanatory power and varying degrees of predictive value. Contrary to a view that is common among young students, theories and laws are different kinds of knowledge and one does not become the other, irrespectively of the evidence that supports them. It is important to emphasize that theories are at the core of life and inexact sciences. For example, in the biological sciences the difficulty to account for every facet (molecules, cells, individuals, populations, ecosystems, etc.) of a phenomenon under study makes it impossible to draw scientific laws. Moreover, in the experimental sciences new knowledge is often embedded in a number of theories for support. Studies at the cellular level can be embedded in theories of molecular structure; studies at the level of individuals can be embedded in theories related to cellular physiology. New knowledge thus contributes both to the support and the extension of the theories it is embedded in.

Models are another important element in the generation of scientific knowledge. Models are simplified versions of a specific component of the natural world. Models are essential to the experimental sciences, because of the need of controlling or minimizing variables. Experimental models are used in the hope that conclusions drawn from them are generalizable and can be applied in a much broader context. For example, in the life sciences mice are used as an experimental model in the hope that conclusions extracted from them are general to other mammals (including humans); specific cell types are used for *in vitro* experiments in the hope that they reflect their *in vivo* functions.

During the analysis of a scientific paper a student should be able to identify what information serves as direct background for that specific report. Is this information a direct observation of a natural phenomenon? Is it inferential information? If so, what theories underlie the particular aspects of the phenomenon under study? Is this information based on the use of experimental models? Are there limitations to it? In other words, what are the authors assuming to be true when presenting new scientific information? A quick glance at the type of the literature used for support will also give the student important information regarding the solidity of the theoretical framework upon which a research article is constructed. For example, citing review publications to support a given scientific statement usually indicates the availability of several reports pointing in the same direction. Citing a single report, on the other hand, could reflect (among other things) the novelty of the information or simply feeble background. Applying these questions to our own research data (together with a careful revision of the literature) is a necessary step for the quick and efficient writing of scientific reports.

2 What do we want to know?

Scientific knowledge is created by people through research, and human curiosity is the motor that drives it. The examination of what is already known about the natural world usually raises more questions. The progress of science depends on the ability of scientists to find answers to specific questions about natural phenomena. In a way, the origin of each piece of scientific knowledge is a carefully delimited question. In the experimental sciences, the question driving a research project (also the question behind a scientific report) is usually presented as general objective, or sometimes as a series of specific objectives.

Probable answers to scientific questions are presented in the form of hypotheses. Hypotheses are of key importance for the experimental sciences, as they drive experimental design. Proving or rejecting a given hypothesis is the reason for every experiment that is performed; which implies that there is a specific question behind each scientific experiment. Students of the experimental sciences should be aware that every scientific report seeks to answer one general question, and that answering it involves designing experiments to answer more and more specific questions; which will be then integrated into a more general answer.

Optimizing the analysis a scientific report requires the clear identification of its objective; that is the identification of the question behind it. Keeping in mind the question behind the report, helps the students to focus on the experiments or observations aimed directly at answering it. This is especially important for the rapid, yet careful, analysis of scientific literature, because most scientific reports present us with information that is corollary to the main objective. Corollary information is usually the basis of further research questions; however it may be dispensable for a young student trying to extract key concepts from numerous scientific papers.

3 How do we acquire new knowledge?

In the experimental sciences, the question of how we acquire new knowledge deals mostly with methodological aspects of scientific research. Due to the difficulty of directly observing many elements of the natural world (e.g. genes, molecules, cells, biochemical reactions, etc.), experimentalists devise strategies or instruments to indirectly observe them, or to observe their effects on more observable entities. Thus empirical scientific knowledge is often constructed from inferences made from observations through specialized apparatus, whose functioning is often embedded in a particular theoretical (i.e. partly inferential) framework. This

sum of inferential reasoning contributes to the potential fallibility of the methods used in the experimental sciences.

The fact that the methodological sections of scientific papers are often ignored by students of the experimental sciences is a paradox. How can we comprehend the knowledge provided by the experimental sciences without a clear understanding of the tools used to construct it? Ignoring the methodological section of a scientific paper has at least two consequences that are detrimental for the learning of science: a) the non-critical acceptance of the interpretation of the data presented by the manuscript's author, b) limited knowledge of experimental strategies that could be used by the student to conduct a scientific project, or at least to evaluate the true value of a scientific report.

Students tend to obviate the fact that there are only a limited number of experimental strategies used to gather knowledge in a scientific discipline. Knowing the fundamentals of these experimental methods provides students with the ability to learn directly from the data presented in a manuscript, rather than from the author's interpretation of the data that is presented throughout the text. After reading, and understanding, the methodological section of a manuscript students know what type of evidence to expect, and key information (focused on the main objective of the manuscript) is quickly extracted from the visual analysis of figures and tables. Lacking this methodological background requires the students to extract information solely from the text, which can become tedious and time-consuming. Being aware of the fundamentals, the scope, and the limitations of the experimental strategies in our fields, is also a key asset for writing clear scientific reports and presenting novel scientific knowledge. It is also worth mentioning that, to the awareness of the limitations of our experimental strategies follows an honest evaluation of the true value of our own research.

4 How reliable is what we know?

The generation of reliable information about the natural world is inherent to scientific research. In the experimental sciences there are many different ways of assessing the reliability of scientific information. Repeated measurements or observations, the introduction of proper control conditions in every experiment, comparisons between experimental models, statistical analysis of the data, the peer-review process before publication, etc. are just a few examples of strategies used to warrant the reliability of new information. Each one of these strategies has its own value for providing certainty to scientific evidence. However, from an epistemological perspective, each piece of scientific knowledge has different degrees of certainty depending on the history of its construction.

Once the student has evaluated the data presented in a scientific paper and drawn his/her own conclusions (based both on the quality of the data and on the quality of the methodology employed), a broader impression about the reliability of the work under analysis can be achieved by analyzing the discussion section of the manuscript. In this section the authors will present their results in the context of corollary information that either supports or questions their data. In the simplest scenario, the data presented in the manuscript will fit in a specific theoretical framework. In a more complicated scenario, solid data sets do not entirely fit the current theoretical framework, which could be an indication about the need of some part(s) of these theories to be revised. Students recognizing the idea that scientific knowledge varies in its degree of certainty become more critical, acquire a broader scientific scope, and take responsibility for their own learning.

An additional benefit to the ability to perform critical assessments of the certainty of scientific knowledge is the possibility to evaluate its applicability to solve problems outside the academic world. This ability is an important asset for science students seeking a professional career.

5 Concluding Remarks

The present essay constitutes a revision of some of the most basic concepts of the epistemology of science. Although concepts like observation and inference, or theory and law are commonly used in scientific or non-scientific argot, the fundamental differences between them are often obviated by science students. We have used these concepts to create a simple

conceptual framework to help students focus on key elements composing scientific reports for a critical analysis. By focusing on key information, and the discrimination of the different types of information presented in a scientific report, students should be able to easily extract the core pieces of knowledge present in every scientific paper. The repeated use of the epistemological questions presented above for the analysis of the student's own experimental data, will significantly improve their ability to write scientific reports. The use of this conceptual framework for the teaching of the experimental sciences at the undergraduate level, would undoubtedly create more critical and enthusiastic students, better prepared to embark on post-graduate studies; but also professionals with more critical and broader scientific scopes.

6 Supporting literature

Epistemologically Authentic Inquiry in Schools: A Theoretical Framework for Evaluating Inquiry Tasks. Clark A. Chinn, Betina A. Malhotra. 2002. *Science Education* 86:175-218.

Conceptual and Epistemic Aspects of Students' Scientific Explanations. William A. Sandoval. 2003. *The Journal of the Learning Sciences*, 12:5–51.

Understanding Students' Practical Epistemologies and Their Influence on Learning Through Inquiry. 2005. William A. Sandoval. *Science Education* 89:634- 656.

Views of Nature of Science Questionnaire: Toward Valid and Meaningful Assessment of Learners' Conceptions of Nature of Science. Norm G. Lederman, Fouad Abd-El-Khalick, Randy L. Bell, Rene´ e S. Schwartz. 2002. *Journal of Research in Science Teaching*. 39:497-521.

Complexity of epistemology: Theory of knowledge or philosophy of science? Marie-Joëlle Browaeys. 2004. Paper presented at the Fourth Annual Meeting of the European Chaos and Complexity in Organisations Network (ECCON) 2004.

CO-17 Estudio de MGMT, MMR y P-gp como posibles mecanismos de resistencia a la temozolamida en líneas tumorales de glioblastoma

Perazzoli, Gloria. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Anatomía Humana y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada
wannea@correo.ugr.es

Jiménez-Luna, Cristina. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Anatomía Humana y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada
crisjilu@correo.ugr.es

Oliver Esteve, Jaime. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Anatomía Humana y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada
jaoe@correo.ugr.es

Zafra Camacho, Inmaculada. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Anatomía Humana y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada
inma.zafra.camacho@gmail.com

Ortiz Quesada, Raúl. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén
rortiz@ujaen.es

Melguizo, Consolación. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Anatomía Humana y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada
melguizo@ugr.es

Resumen

El Glioblastoma multiforme (GBM), es el tumor cerebral primario más frecuente en adultos, con una supervivencia global de menos de 1 año tras su diagnóstico. Existen estudios que demuestran que el silenciamiento epigenético mediante metilación del promotor del gen O6-methylguanine ADN metiltransferasa (MGMT) está asociado con una mayor supervivencia en pacientes con GBM. Sin embargo, en la clínica hay pacientes que no cumplen este patrón cuando se les trata con temozolamida (TMZ). Este hecho ha dado lugar al estudio de nuevos mecanismos de resistencia como pueden ser el mecanismo de reparación de errores (MMR) o proteínas transportadoras como p-glicoproteína (P-gp). En este estudio se analizan los tres mecanismos de resistencia anteriormente mencionados en cuatro líneas tumorales de sistema nervioso, comparando la variación de expresión de cada uno de ellos tras el tratamiento con TMZ. Los resultados obtenidos muestran una relación entre la modificación de la expresión de MGMT y MMR tras la administración de la TMZ mientras que P-gp parece no tener relación con la resistencia de estos tipos de tumor al fármaco.

Palabras Clave

Glioblastoma Multiforme, MGMT, Sistema MMR, P-gp

1 Introducción

El Glioblastoma multiforme (GBM), es el tumor cerebral primario más frecuente en adultos, con una supervivencia global de menos de 1 año tras su diagnóstico (Tal Shahar et al., 2012). Nuevas estrategias en el tratamiento de dichos tumores se basan en la quimioterapia

con la temozolamida (TMZ) como agente adyuvante (*Friedman et al., 2000*). La mayor limitación de este tratamiento es la existencia de mecanismos de resistencia propios de las células gliales como el gen O6-methylguanine ADN metiltransferasa (MGMT) (*Esteller et al., 2000*). Existen estudios que demuestran que el silenciamiento epigenético mediante metilación del promotor del gen MGMT está asociado con una mayor supervivencia en pacientes con GBM (*Melguizo et al., 2012*). Sin embargo, en la clínica hay pacientes que no cumplen este patrón cuando se les trata con temozolamida (TMZ).

Este hecho ha dado lugar al estudio de nuevos mecanismos de resistencia como pueden ser el mecanismo de reparación de errores (MMR) (*Happoldy et al., 2012*) o proteínas transportadoras como p-glicoproteína (P-gp) englobada dentro de los transportadores de membrana ABC (*Nakagawa et al., 2009*) y que está directamente relacionada con fenómenos de resistencia a multidrogas en otros tipos de tumores como el cáncer de colon (*Weinstein et al., 1991*). En este estudio se analizan los tres mecanismos de resistencia anteriormente mencionados en cuatro líneas tumorales de sistema nervioso, comparando la variación de expresión de cada uno de ellos tras el tratamiento con TMZ.

2 Material y Métodos

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron cuatro líneas neuronales tumorales, A172, LN229, SF268 y SK-N-SH, cultivadas bajo condiciones estándar de cultivo en estufa a 37°C y 5% de CO₂. Dichas líneas se sometieron a ensayos de IC₅₀ de 0-400 µM con TMZ durante 6 días mediante el método de la sulforodamina B. Tras esto, se sometieron a dos ciclos de TMZ de 3 días cada uno (C1 y C2), en valores de IC₅₀ para cada línea, tras los cuales se volvieron a realizar ensayos de IC₅₀.

El análisis de la variación de la expresión de MGMT se llevó a cabo mediante PCR a tiempo real tanto en las líneas basales como tras los ciclos. Para el estudio del sistema MMR, se midió la expresión mediante PCR a tiempo real de algunos de los genes que lo forman, como son MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 y PMS2 en el estado basal como tras los ciclos. Para el estudio de P-gp se llevó a cabo una comparación de la expresión de dicho gen mediante PCR a tiempo real comparando los resultados obtenidos en las líneas de estudio con la línea HCT15 de cáncer de colon, que se caracteriza por presentar una elevada expresión de P-gp.

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo usando una *t* de student con un nivel de significación de 0,05.

3 Resultados

Los primeros resultados que se obtuvieron tras analizar la IC₅₀ de las líneas a la TMZ y tras los sucesivos ciclos con la misma, indican que existen dos tipos de comportamiento bien definidos, líneas con una IC₅₀ baja para la TMZ (A172 y LN229) y líneas con una IC₅₀ alta (SF268 y SK-N-SH) (figura 1A). Correlacionado a esto la expresión de MGMT medida mediante técnicas de PCR a tiempo real revela que aquellas líneas con IC₅₀ alta son las que más expresión de MGMT presentan, mientras que A172 y LN229 tienen una expresión apenas detectable por esta técnica (figura B).

Cuando analizamos lo que sucede en los ciclos de TMZ vemos que en aquellas líneas con expresión basal de MGMT, la expresión de este gen disminuye en un 60% en la línea SF268 y en un 80% en la línea SK-N-SH, siendo al contrario en aquellas líneas donde no hay una expresión basal detectable de MGMT, en la que la línea A172 aumenta la expresión de MGMT tras el segundo ciclo hasta 14 veces más que en su estado basal, mientras que en la

línea LN229 el aumento no es tan acentuado incrementándose 3 veces más en relación a su estado basal.

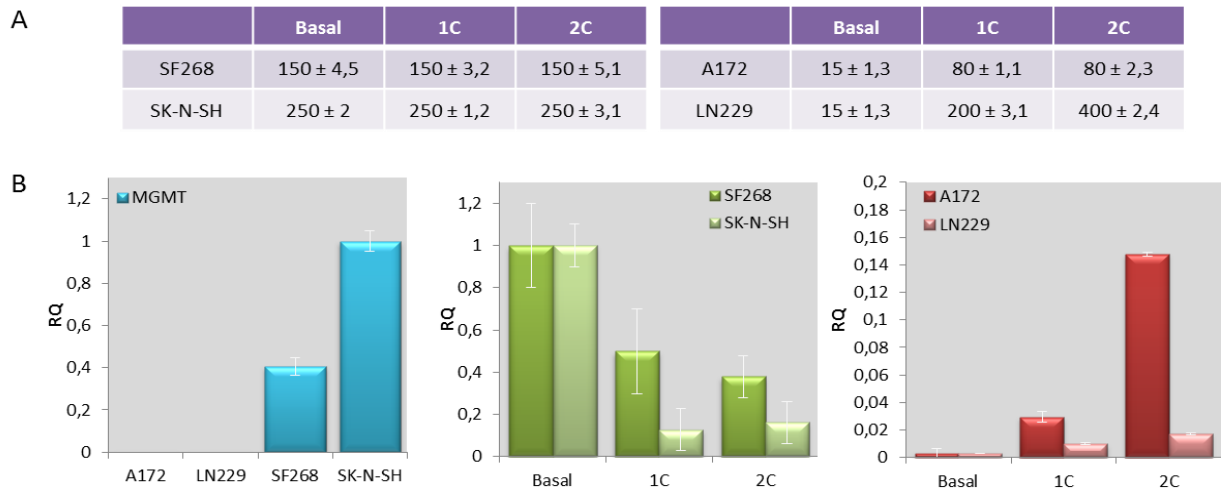


Figura 1. Variación de los valores de IC₅₀ de las líneas A172, LN229, SF268 y SK-N-SH en el estado basal y tras los ciclos con TMZ (A). Variación de la expresión de MGMT mediante análisis por PCR a tiempo real (B) en el estado basal de las líneas y tras los ciclos de TMZ.

Los resultados obtenidos a la hora de analizar los genes del complejo MMR indicaron que aquellas líneas que carecían de expresión de MGMT eran las que mayor expresión tenían de todos los genes analizados de dicho complejo. Por el contrario, aquellas líneas con una alta expresión de MGMT tenían una expresión casi indetectable de los mismos (figura 2A). Cuando se analizaron los ciclos de exposición a la TMZ se observó que la tendencia en todas las líneas era a reducir la expresión del complejo a medida que avanzan los ciclos de TMZ. Por último, el análisis de la expresión de P-gp de las líneas tumorales de sistema nervioso muestra que no existen niveles detectables de ARNm de esta proteína en comparación con la línea HCT15 (figura 2B)

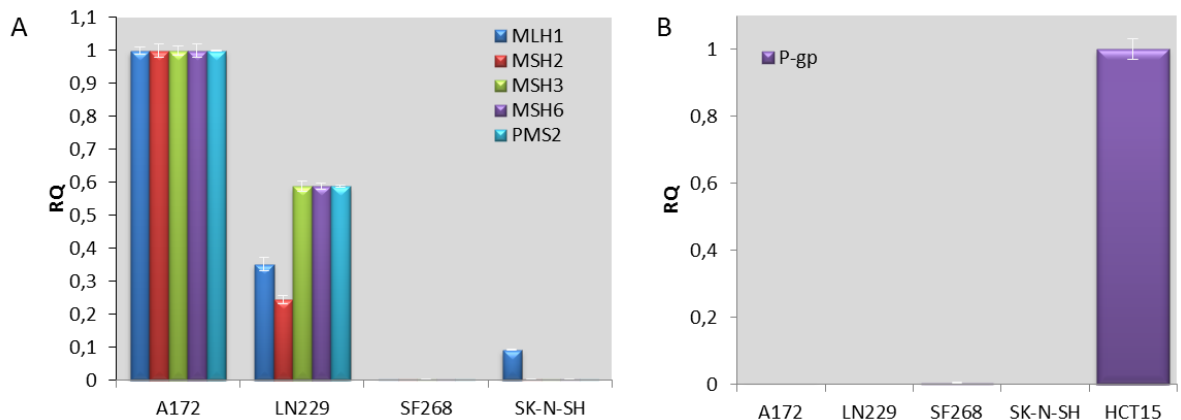


Figura 2. Expresión de los genes del complejo MMR, MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 y PMS2, en las líneas basales A172, LN229, SF268 y SK-N-SH (A). Comparación de la expresión de P-gp en las líneas A172, LN229, SF268 y SK-N-SH comparadas con la línea de cáncer de colon HCT15 mediante PCR a tiempo real (B).

4 Discusión

Los resultados obtenidos tras la realización del estudio en las líneas A172, LN229, SF268 y SK-N-SH, indican que hay una relación entre la expresión de la proteína reparadora MGMT y el complejo de reparación de errores MMR (*Zhang et al., 2012*). Esta relación indica que en aquellas líneas celulares que expresan de forma basal la proteína MGMT, la expresión del complejo MMR es muy baja tal y como sucede en las líneas SF268 y SK-N-SH, y al contrario, aquellas líneas celulares que no expresan la proteína MGMT de forma basal, muestran una gran expresión del MMR como sucede en el caso de las líneas A172 y LN229.

Cuando se estudia el comportamiento de ambos sistemas tras los ciclos de TMZ se ve por un lado una disminución en todas las líneas del sistema MMR, en cambio, la expresión de MGMT varía en relación a si la línea lo expresaba de forma basal o no, disminuyendo o aumentando su expresión respectivamente tal y como sucede en los resultados obtenidos por *Yoshino et al., 2010*. Los valores de IC₅₀ de las líneas A172 y LN229, líneas sin expresión de MGMT se ven incrementados significativamente con respecto a los basales, llevando a pensar que un aumento en esta proteína es la causante del incremento de la resistencia al fármaco. En las líneas SF268 y SK-N-SH, hay una disminución de la expresión de MGMT tras los ciclos de TMZ, aunque su IC₅₀ no se ve modificada. Esto podría deberse a la disminución que experimenta el complejo MMR, probando así una compensación a la disminución de MGMT.

5 Conclusiones

Los datos obtenidos en este estudio sugieren que P-gp parece no tener relación con la resistencia de estos tipos de tumor al fármaco mientras que puede haber una relación entre la proteína MGMT y el complejo MMR frente a la resistencia a la TMZ.

6 Referencias

1. Esteller, M.; Garcia-Foncillas, J.; Andion, E.; Goodman, S.N.; Hidalgo, O.F.; Vanaclocha, V.; Baylin, S.B. and Herman, J.G. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *The New England Journal of Medicine*. 2000; 343:1350–1354
2. Friedman, H.S.; Kerby, T. and Calvert, H. Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma. *Clinical Cancer Research*. 2000; 6:2585–2597
3. Huppold, C.; Roth, P.; Wick, W.; Schmidt, N.; Florea, A.M.; Silginer, M.; Reifenberger, G. and Weller, M. Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*. 2012; 122(2):444-55
4. Melguizo, C.; Prados, J.; González, B.; Ortiz, R.; Concha, A.; Alvarez, P.J.; Madeddu, R.; Perazzoli, G.; Oliver, J.A.; López, R.; Rodríguez-Serrano, F. and Aránega, A. MGMT promoter methylation status and MGMT and CD133 immunohistochemical expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with temozolomide plus radiotherapy. *Journal of Translational Medicine*. 2012; 10:250
5. Nakagawa, T.; Ido, K.; Sakuma, T.; Takeuchi, H.; Sato, K. and Kubota, T. Prognostic significance of the immunohistochemical expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, P-glycoprotein, and multidrug resistance protein-1 in glioblas-

tomas. *Neuropathology*. 2009; 29:379–388

6. Shahar, T.; Nossek, E.; Steinberg, D.M.; Rozovski, U.; Blumenthal, D.T.; Bokstein, F.; Sitt, R.; Freedman, S.; Corn, B.W.; Kanner, A.A. and Ram, Z. The impact of enrollment in clinical trials on survival of patients with glioblastoma. *Journal of Clinical Neurosciencie* 2012; 19(11):1530–1534
7. Weinstein, R.S.; Jakate, S.M.; Dominguez, J.M.; Lebovitz, M.D.; Koukoulis, G.K.; Kuszak, J.R.; Klusens, L.F.; Grogan, T.M.; Saclarides, T.J.; Roninson, I.B. and Coon, J.S. Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. *Cancer Research*. 1991; 51:2720
8. Yoshino, A.; Ogino, A.; Yachi, K.; Ohta, T.; Fukushima, T.; Watanabe, T.; Katayama, Y.; Okamoto, Y.; Naruse, N.; Sano, E. and Tsumoto, K. Gene expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas. *International Journal of Oncology*. 2010; 36(6):1367-77
9. Zhang, J.; Stevens, M.F. and Bradshaw, T.D. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current Molecular Pharmacology*. 2012; 5(1):102-14

CO-19 Estudio de la Actividad Biológica de CETUXIMAB mediante ELISA

Inmaculada Suárez González¹, Natalia Navas Iglesias², Antonio Salmerón García³, José Cabeza Barrera⁴, Luís Fermín Capitán Vallvey¹

1. *Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias, Universidad de Granada*
2. *Departamento de Química Analítica e Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada*
3. *UGC Farmacia Granada e Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.*
4. *UGC Farmacia Granada e Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, Hospital Universitario San Cecilio, Granada.*

Avda. Fuentenueva s/n. CP: 18071. Granada. Tlf: 958240796. e-mail:inmasg82@correo.ugr.es corresponding author: Inmaculada Suárez González

RESUMEN

Cetuximab (CTX) (Erbix[®]), es un anticuerpo monoclonal quimérico (Ab) tipo IgG1, usado en el tratamiento de patologías como el cáncer colorrectal metastásico (CCRM) y otros tipos de cánceres de células escamosas que afectan a la cabeza y el cuello. Se une de forma específica al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) bloqueándolo. La sobreexpresión o hiperactivación de EGFR da lugar a diferentes tipos de cánceres, por tanto, CTX, debido a su mecanismo de acción es usado en el tratamiento de los mismos.

Debido a la naturaleza y el elevado coste de CTX, en el presente trabajo se ha desarrollado y validado un método ELISA de tipo indirecto para cuantificar específicamente su actividad biológica, de manera que pueda ser aplicado en posteriores estudios de estabilidad. Esta investigación se enmarca en los estudios requeridos para extender su uso más allá de la fecha de caducidad indicada por el fabricante. El inmunoanálisis propuesto se basa en la reacción específica entre EGFR y CTX. La cantidad biológicamente activa del Ab se pone de manifiesto mediante espectrofotometría, por medidas de absorbancia.

Teniendo en cuenta que CTX es un fármaco, el método ELISA desarrollado ha sido validado de acuerdo con las recomendaciones de una de las principales organizaciones internacionales que regulan los requisitos que deben cumplir los fármacos de uso humano, incluidos los métodos mediante los cuales se estudian. Por tanto, se han seguido las recomendaciones de la International Conference on Harmonization (ICH guidelines), evaluando linealidad, límite de detección y cuantificación, precisión (reproducibilidad intra-día e inter-día), exactitud (% recuperación) y especificidad, estimada mediante estudios acelerados de degradación, al objeto de evaluar la actividad biológica remanente del Ab.

El método está siendo aplicado en un estudio de estabilidad en el tiempo de disoluciones de CTX preparadas en las condiciones habituales de uso hospitalario: esto es 5.0 mg mL⁻¹.

Palabras clave: Cetuximab, Cáncer colorrectal, EGFR, ELISA

1. INTRODUCCIÓN

Cetuximab (Erbix[®]) (CTX) es un anticuerpo IgG1 monoclonal quimérico (humano-murino) producido en una línea de células de mamíferos (Sp2/0) mediante tecnología de ADN recombinante, cuya forma farmacéutica es una solución para perfusión. Cada mL de solución para perfusión contiene 5 mg de CTX (cada vial de 100 mL contiene 500 mg). Actúa de forma específica frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mediante su unión al dominio extracelular de éste con una afinidad aproximadamente 5 a 10 veces superior a la de los ligandos endógenos, lo cual da lugar al bloqueo de la unión de los ligandos endógenos al EGFR, provocando la inhibición de la función del receptor. Además induce la internalización de EGFR lo que puede conllevar una disminución de los receptores disponibles en la superficie celular (*downregulation*). Dado este mecanismo de acción, CTX está indicado en España, en combinación con irinotecan, para el tratamiento de pacientes

con cáncer colorrectal metastásico (CCRm), con expresión del EGFR después del fracaso de un tratamiento citotóxico que haya incluido irinotecan (European Medicines Agency, 2006) y en el tratamiento de pacientes con cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, administrado por vía intravenosa solo o combinado con otros tipos de terapias (quimiorradioterapia entre otros) (Ficha técnica CTX European Medicines Agency, 2004), (M. J. Huertas Fernández et al., 2007).

Actualmente se cuestiona la correlación lineal entre el grado de expresión del EGFR y la respuesta a CTX, ya que son varios los autores que han descrito respuesta en pacientes con EGFR negativo (Vallböhmer D. et al., 2005), (Scartozzi M. et al., 2004), (Chung KY. et al., 2005).

El EGFR (170.000 Dalton) fue el primero identificado de una familia de receptores conocidos como tirosín-kinasa de tipo I o receptores ErbB o HER-1. La unión del factor de crecimiento epidérmico con su receptor produce la fosforilación de la tirosín-kinasa y pone en marcha una cascada de señales de transducción que afectan a la síntesis de ADN, al crecimiento celular y a mecanismos de apoptosis. Las vías de señalización del EGFR están implicadas en el control de la supervivencia celular, la progresión del ciclo celular, la angiogénesis, la migración y la invasión o metástasis celular (M. J. Huertas Fernández et al., 2007). La desregulación de la vía del EGFR se produce en una gran variedad de formas, incluyendo la mutación genética, amplificación de genes, sobreexpresión de la proteína, reorganización estructural y la producción de ligando autocrino (K. Ng and A. X. Zhu, 2008) (Efat Azizi et al., 2012).

El diseño de una terapia contra el cáncer empleando un inhibidor de la función de EGFR fue impulsado por hipótesis basadas en los conocimientos disponibles en la década de 1980 (J. Mendelson, 2002). Estudios posteriores demostraron que el EGFR es un oncogén celular y que los niveles altos de éste están correlacionados con un peor pronóstico en tumores sólidos (J. Mendelson, 2002). Estudios preclínicos plantearon la hipótesis de que el bloqueo del EGFR en los sitios de unión con un anticuerpo monoclonal (mAbs) "antirreceptor" daría lugar a la inhibición del crecimiento celular, siendo por tanto, una terapia eficaz contra el cáncer (Efat Azizi et al., 2012) (J. Mendelson, 2002).

El CTX es uno de los mAbs que ha demostrado beneficios clínicos y ha obtenido la aprobación de la FDA para el tratamiento paliativo de CCRm resistente a la quimioterapia (Saltz LB. et al., 2004).

El CCR es una de las causas más comunes de muerte por cáncer en el mundo occidental, ocupando el segundo lugar en Europa y tercero en los Estados Unidos (Jemal A, et al., 2005) (Nicolas Azzopardi et al., 2011) y CTX muestra actividad clínica relevante en el tratamiento de pacientes con CCR resistente a la quimioterapia (Saltz LB et al., 2004) (Cunningham D. et al, 2004) (Lenz HJ. et al., 2006) aunque recientemente los datos de un creciente número de estudios sugieren que la respuesta a CTX parece limitarse a pacientes con CCRm portadores de tumores con KRAS no mutado, pero los resultados aun no son concluyentes (Lievre A. et al., 2006) (Benvenuti S. et al., 2007) (Di Fiore F. et al., 2007) (De Roock W. et al., 2008). Incluso en pacientes con tumores KRAS de tipo salvaje se observa variabilidad en la respuesta a CTX (Nicolas Azzopardi et al., 2011).

En España se diagnostican anualmente 19.000 nuevos casos de CCR y, si se consideran ambos sexos, ocupa el primer lugar en incidencia, representando la segunda causa de muerte por cáncer. La supervivencia en nuestro país es ligeramente superior a la media europea, que se sitúa en torno al 50% a los 5 años, y próxima o superior a la de los países más desarrollados, como Suiza, Francia o Alemania (Coleman MP. et al., 2003) (M. J. Huertas Fernández et al., 2007). En términos generales, la cirugía con o sin tratamiento adyuvante consigue curar a la mitad de los pacientes afectados de CCR, desarrollando la otra mitad una recurrencia de la enfermedad, siendo necesario tratamiento paliativo (Viñes JJ. et al., 2003). La mediana global de supervivencia de pacientes con CCR avanzado ha aumentado de 12 meses a 18-21 meses desde la pasada década. Este incremento se ha basado fundamentalmente en la aparición de nuevos fármacos como irinotecán, oxaliplatino y fluoropirimidinas orales. Pero incluso con el avance que esto supone respecto a la quimioterapia tradicional, aún quedan limitaciones con estos tratamientos (Vallböhmer D. et al., 2005). Recientemente, el descubrimiento de factores de crecimiento involucrados de for-

ma importante en la modulación de la proliferación y diferenciación celular, ha conducido al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer (M. J. Huertas Fernández et al., 2007) como es el caso de CTX.

La actividad de CTX puede ser cuantificada por diferentes técnicas, siendo el ELISA una de las más usadas. Por ello y debido a la importancia que presenta el fármaco biotecnológico CTX, además del elevado coste que supone el tratamiento con el mismo, en el presente trabajo se propone el desarrollo y validación de un método ELISA que permite cuantificar específicamente su actividad biológica, de manera que pueda ser aplicado en estudios de estabilidad en el tiempo para poder así establecer datos de uso posteriores a los indicados por el fabricante.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Anticuerpos

El Ab IgG anti-humano (molécula completa) conjugado con peroxidasa y producido en conejo (solución en tampón fosfato salino 0.01 M pH 7.4, contiene timerosal 0.01%) fue adquirido de Sigma-Aldrich® (Barcelona, España).

2.2. Muestras de CTX

Erbitux® (Merck Serono, Madrid, España) fue usado como estándar de referencia del mAbs CTX (conteniendo 50.0 mg de principio activo) y fue cedido amablemente por el Servicio de Farmacia Hospitalaria del Hospital Universitario San Cecilio (Granada, España). Las disoluciones patrones de trabajo se preparan a partir de ésta por dilución con disolución acuosa de NaCl 0.9 %.

2.3. Reactivos

EGFR fue obtenido a través de Sigma-Aldrich® (Barcelona, España). Se usó un tampón madre de hidrógenocarbonato/carbonato de sodio de pH 9.6 y un tampón madre fosfato salino de pH 7.4 preparado a partir de NaCl y fosfato potásico y sódico adquiridos de Panreac S.A (Barcelona, España). Otros reactivos fueron: agua inyectable estéril en ampollas de 10 mL (B. Braun Medical S.A, Barcelona, España), NaCl 0.9% 100 mL (Baxter, España), Tween® 20- 250G de Sigma-Aldrich®, o-fenilendiamina clorhidrato de Sigma Aldrich®, ácido sulfúrico de Panreac y leche en polvo La Asturiana (Asturias, España).

2.4. Medida de absorbancia

Las muestras se situaron en placas de microtitulación (microtiter) de 96 pocillos fabricadas en polietileno y con fondo de alta transparencia (DeltaLab, Barcelona, España) y la absorbancia fue medida a dos longitudes de onda, 450 (longitud de onda media) y 620 nm (longitud de onda de referencia), usando para ello los filtros adecuados. El parámetro utilizado para cuantificar fue la diferencia entre las medidas de absorbancia hechas a 450 nm y 620 nm mediante el software XFluor4™ y los resultados analizados mediante el software Statgraphics 5.0.

2.5. Metodología ELISA - Cetuximab

Este inmunoensayo se basó en el uso de placas ELISA sensibilizadas con EGFR. Las placas fueron incubadas durante la noche a 4°C usando 100 µl de EGFR preparado a una concentración de 1 µg mL⁻¹ con tampón carbonato 0.1M de pH 9.6. A continuación, y tras realizar cuatro lavados con el correspondiente tampón de lavado PBS (pH 7.4) - Tween 20 (0.3 % v/v) alternados con cuatro aspiraciones, se adicionó el tampón de bloqueo, consistente en leche en polvo 2% (w/v) diluida en PBS (pH 7.4) - Tween 20 (0.3 % v/v) y se incubó durante 2 horas a 37°C. Tras finalizar la incubación, las placas fueron lavadas de nuevo cuatro veces con el mismo tampón de lavado citado anteriormente y cada lavado fue alternado con su correspondiente aspiración. El siguiente paso consiste en la adición de 100 µl de CTX diluido en tampón carbonato 0.1M, ajustado a pH 9.6, para dar lugar a concentraciones finales de 50.0, 25.0, 15.0, 10.0, 5.0, 1.0, 0.25, 0.175 y 0.1 µg mL⁻¹ con el fin de obtener la función de calibrado. Estas placas fueron entonces incubadas durante 45 minutos a 37°C. Seguidamente, y tras los correspondientes lavados y aspiraciones, fueron adicionados 100 µl del anticuerpo de detección IgG anti-humano (molécula completa) marcado con peroxidasa y diluido a una concentración de 10.0 µg mL⁻¹ en tampón carbonato 0.1M de pH 9.6. Dichas placas fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C. Tras este

periodo de incubación, las placas fueron sometidas de nuevo a cuatro ciclos de lavado y aspiración y finalmente fueron dispensados en cada pocillo 100 µl de disolución de o-fenilendiamina (OPD), sustrato de la reacción. Esta disolución de sustrato fue preparada según indicaciones del fabricante, para obtener una concentración final de trabajo de 0.4 mg mL⁻¹ OPD, 0.4 mg mL⁻¹ urea- peróxido de hidrógeno, y fosfato-citrato 0.05M de pH 5.0. A continuación, las placas fueron incubadas en oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos, finalizando la reacción mediante la adición de 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 1M. Por último, la absorbancia fue medida como se indicó anteriormente.

2.6. Validación del ensayo

El método ha sido validado de acuerdo con las guías ICH para productos biotecnológicos (International Conference on Harmonization (ICH guidelines) ICH Q6B). La validación del ensayo se llevó a cabo mediante la obtención de los parámetros: función de calibrado; límites de detección y cuantificación; precisión como reproducibilidad intra-día e inter-día; exactitud como porcentaje de recuperación y especificidad estimada mediante estudios acelerados de degradación, al objeto de evaluar la actividad biológica remanente del Ab.

❖ **Función de calibrado:** para establecer la función de calibrado fueron preparadas una serie de disoluciones patrón de CTX de concentraciones comprendidas entre 50.0 y 0.1 µg mL⁻¹. Cada nivel de concentración fue preparado por duplicado. Además de la función de calibrado, se calculó el coeficiente de correlación al objeto de evaluar el ajuste de los datos experimentales a la función obtenida.

❖ **Límites de Detección y Cuantificación:** El límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del método fueron obtenidos mediante las ecuaciones (1) y (2),

$$LOD=s_c \cdot K= s_c \cdot 3 \quad (1) \quad LOQ=s_c \cdot K= s_c \cdot 10 \quad (2)$$

donde s_c es la desviación estándar de una concentración de 0.1 µg mL⁻¹ (la concentración más pequeña estudiada) y K es un factor numérico cuyo valor es elegido en función del nivel de confianza deseado, así LOD y LOQ fueron calculados como $3 \cdot s_c$ and $10 \cdot s_c$ respectivamente, valores que otorgan un nivel de confianza del 99.86%.

❖ **Rango dinámico lineal e intervalo de detección:** El rango dinámico lineal se define como el intervalo de concentraciones entre el límite más bajo de concentración que puede ser cuantificado mediante el método analítico y el nivel más elevado de concentración estudiado (50.0 µg mL⁻¹); el intervalo de detección, viene dado por el límite de detección y cuantificación calculados anteriormente.

❖ **Precisión:** La precisión del ELISA desarrollado fue evaluada en términos de reproducibilidad intra-día (repetibilidad) e inter-día. Dicha repetibilidad se obtuvo mediante el análisis de cinco réplicas de muestras de CTX a diferentes concentraciones: 25.0, 5.0 y 0.1 µg mL⁻¹ durante el mismo día y bajo las mismas condiciones experimentales. La precisión intermedia inter-día fue estimada mediante el análisis de dos réplicas de disoluciones patrón de CTX a tres concentraciones diferentes (25.0, 5.0 y 0.1 µg mL⁻¹) durante cuatro días distintos y bajo idénticas condiciones experimentales. La precisión se evaluó mediante el cálculo de la desviación estándar relativa (expresada como porcentaje, RSD %) correspondiente a la respuesta de las muestras analíticas ensayadas.

❖ **Exactitud:** La exactitud del método fue estimada mediante el porcentaje de recuperación obtenido al analizar por triplicado muestras patrón de CTX de concentraciones 25.0, 5.0 y 0.1 µg mL⁻¹.

❖ **Especificidad:** La especificidad del ensayo fue estimada mediante estudios acelerados de degradación, al objeto de evaluar las posibles interferencias producidas por los productos de degradación de CTX, además de evaluar la actividad biológica remanente del Ab.

Los estudios de degradación forzada se realizaron con diferentes concentraciones de CTX en NaCl al 0.9% y diluidas en tampón carbonato 0.1M de pH 9.6, para dar concentraciones finales de 5.0 mg mL⁻¹ y 25.0 µg mL⁻¹. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado, usando el valor obtenido de la media de estas tres réplicas.

Las condiciones de estrés evaluadas fueron: elevada temperatura, exposición a luz ultravioleta (UV), adición de un ácido y una base y por último adición de un oxidante.

El estrés en medio ácido y alcalino y medio oxidante se llevó a cabo con HCl 0.1M, NaOH 0.1M y H₂O₂ 1% y 10%. Para el estudio del efecto provocado por la temperatura, las

muestras fueron sometidas a 50 y 70 °C durante 24 horas. Las muestras fueron preparadas de forma que 50 µl de agente de estrés eran adicionados en una muestra de 0.5 mL de la solución patrón de CTX. Todas las muestras fueron analizadas 24 horas después de su preparación.

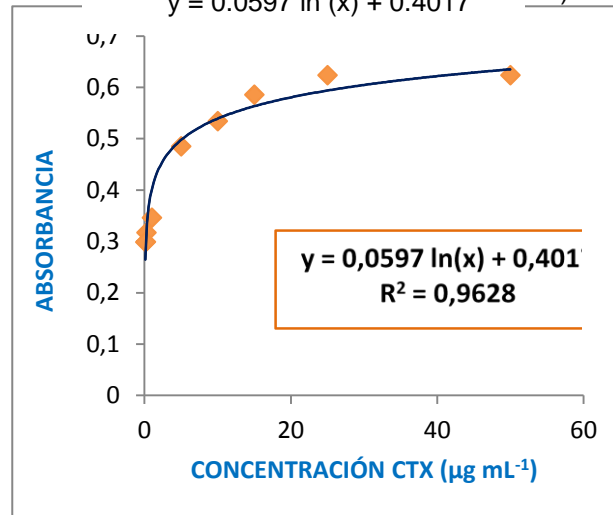
Los efectos de la luz ultravioleta fueron investigados mediante la exposición de diferentes disoluciones estándar del mAb en una cámara de envejecimiento (SUNTEST CPS, Heraeus, Hanau, Alemania) con la pared cubierta de espejos y equipada con una lámpara de xenón. La irradiación a 250 nm fue a 765 W/m². Las muestras fueron sometidas durante 24 horas a dicha irradiación tras la cual fueron analizadas.

3. RESULTADOS

3.1. Función de calibrado, LOD, and LOQ

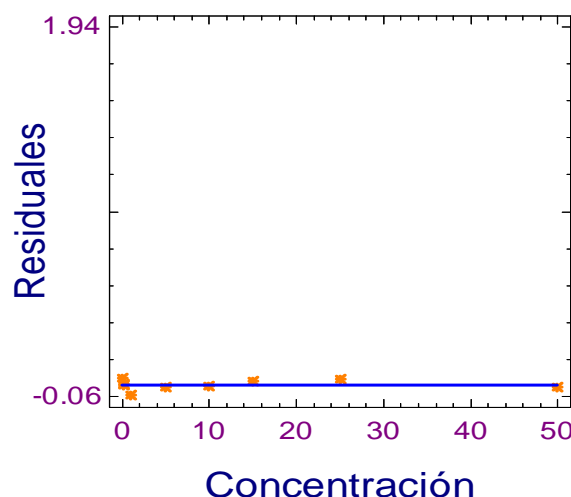
La función de calibrado obtenida mediante la representación gráfica de los valores de la señal analítica (absorbancia) frente a las concentraciones estudiadas (entre 50.0-0.1 µg mL⁻¹), se corresponde con una función logarítmica, cuya ecuación es la siguiente:

El coeficiente de correlación $y = 0.0597 \ln(x) + 0.4017$ 1.A).



Dado que el Valor P para la ordenada en el origen es inferior a 0.01, esto indica que es significativamente diferente de cero para un nivel de confianza del 99%, siendo por tanto su valor el establecido en el modelo.

Para estudiar la homogeneidad de varianzas se hizo el análisis gráfico de los residuos como sugieren Boqué y Rius (Boqué et al., 1994), para obtener la representación gráfica de los residuos frente a la concentración. Mediante esta representación podemos además detectar la presencia de valores atípicos. En la figura 1.B. se muestra la gráfica correspondiente :



El rango dinámico lineal establecido es por tanto 0.3747 - 50.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La sensibilidad del método fue evaluada mediante el cálculo de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). Ambos se calcularon usando el valor de la señal analítica de la concentración más pequeña estudiada (0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) tal y como se ha explicado en la sección anterior. Los resultados obtenidos, 0.1124 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 0.3747 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, indican que el método propuesto es sensible para el rango de concentraciones propuesto. Además se establece un intervalo de detección comprendido entre 0.1124 y 0.3747 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.2. Precisión y exactitud

La exactitud y precisión del método fue evaluada en el intervalo lineal del mismo, tal y como se indica en las guías ICH Q2 (R1). Los resultados fueron satisfactorios tanto para la exactitud como para la precisión intra-día e inter-día del método, expresados como % de recuperación y desviación estándar relativa (RSD), respectivamente.

3.2.1. Exactitud

3.2.1.1. Recuperación

Los resultados obtenidos para el estudio de recuperación de las muestras patrón de CTX a tres concentraciones diferentes (25.0, 5.0 y 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) indican que el promedio de recuperación fue cercano al 90% en los tres casos. Por tanto podemos afirmar que el método propuesto es exacto.

3.2.2. Precisión

3.2.2.1. Repetibilidad

En el presente trabajo la precisión intra-día de las concentraciones estudiadas de CTX 25, 5.0 y 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fue menor al 10%, por tanto, podemos concluir que el método es repetitivo para las condiciones de trabajo seleccionadas, por lo que el método ELISA propuesto es preciso.

3.2.2.2. Reproducibilidad

Se observó que la desviación estándar relativa para las tres concentraciones estudiadas de CTX: 25, 5.0 y 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fue menor del 10%. Así, puede concluirse que el método propuesto es razonablemente reproducible y por lo tanto es preciso.

3.3. Estudio de estrés

Como ya se comentó anteriormente, se obtuvieron muestras diluidas de CTX a partir del medicamento Erbitux®, tal y como es indicado en la ficha técnica del mismo (EMEA, 2004). La concentración ensayada fue la habitual de uso hospitalario: 5 mg mL^{-1} ; además se estudió una concentración de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas estas muestras fueron sometidas a las condiciones de estrés indicadas en el apartado anterior.

Los datos obtenidos en este estudio indican que existe actividad remanente a pesar del estrés al que se someten las muestras de CTX.

3.4. Estudio de estabilidad

El método ELISA indirecto no competitivo desarrollado y validado se aplicó en un estudio de estabilidad en el tiempo de muestras de CTX preparadas y almacenadas en condiciones hospitalarias habituales, es decir, muestras de 5 mg mL^{-1} almacenadas protegidas de la luz a 4°C (refrigeradas) y a - 22°C (congeladas). Este estudio se ha llevado a cabo durante 30 días siendo analizadas las muestras en los días 0, 1, 2, 3, 7, 10, 14, 22 y 30 después de su preparación. Los resultados obtenidos el primer día de análisis (día 0) se emplean como control para evaluar la pérdida de actividad en los siguientes días.

Se observa que a los 14 días de análisis, las muestras conservadas a 4°C han perdido su actividad en un 70% aproximadamente y a los 22 días la pérdida de actividad se mantiene similar a la del día 14 + 5% de variación. Para las muestras conservadas a - 22°C, sorprendentemente la pérdida de actividad se produce de forma similar, habiendo perdido un 70% aproximadamente de actividad a los 14 días de ensayo e incrementándose dicha pérdida en un 10% aproximadamente a los 22 días.

4. CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo exponemos el desarrollo y validación de un método ELISA simple, rápido, sensible y fácil de realizar que permite cuantificar de forma específica la actividad de CTX en su forma farmacéutica, Erbitux®.

El método ELISA desarrollado fue validado de acuerdo a las recomendaciones de la International Conference on Harmonization (ICH guidelines), obteniendo resultados satisfactorios tanto para la precisión como para la exactitud del mismo como indican las guías ICH (ICH Q2 (R1), lo cual lo hace válido para determinar la actividad de CTX en las condiciones habituales de uso hospitalario.

Con este ensayo se estudió la actividad biológica de CTX a la concentración de uso hospitalaria, y que coincide con la formulación del medicamento, esto es 5 mg mL^{-1} CTX. Mediante un estudio de estabilidad en el tiempo se demostró que CTX conservado tanto a 4°C como a -22°C protegido de la acción de la luz, sufre una pérdida considerable de actividad, del orden del 70% aproximadamente a los 14 días de ensayo.

En la actualidad continúan realizándose ensayos mediante el ELISA desarrollado en el presente trabajo con el fin de confirmar y obtener nuevos datos a cerca de la actividad biológica del fármaco biotecnológico CTX.

5. AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado íntegramente por el Proyecto PI 101/00201 (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, España). Agradecemos a la Unidad de Farmacia Hospitalaria del Hospital Universitario San Cecilio de Granada la amable cesión de todas las muestras de CTX empleadas en el mismo.

No existe conflicto de interés por parte de ninguno de los autores.

6. REFERENCIAS

[1] European Medicines Agency. Informe EPAR de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) (publicado 30 de Octubre de 2006; acceso 30 de Octubre de 2006). Disponible en: <http://www.emea.eu.int/humandocs/Humans/EPAR/erbitux/erbitux.htm>

[2] Ficha técnica cetuximab European Medicines Agency

[3] M. J. Huertas Fernández et al., Tratamiento con cetuximab en pacientes con cáncer colorrectal metastásico que no expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Farmacia Hospitalaria. 2007; Vol. 31. N.º 5, pp. 264-269.

[4] Vallböhmer D, Zhang W, Gordon M, Yung Yang D, Yung J, Press O, et al. Molecular determinants of cetuximab efficacy. J Clin Oncol 2005; 23: 3536-44.

[5] Scartozzi M, Bearzi I, Berardi R, Mandolesi A, Fabris G, Cascinu S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR expression in related metastatic sites: implications for treatment with EGFR- Targeted monoclonal antibodies. J Clin Oncol 2004; 22: 4772-8.

[6] Chung KY, Shia J, Kemeny E, Shah M, Schwartz GK, Tse A, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. J Clin Oncol 2005; 23: 1803-10.

[7] K. Ng and A. X. Zhu, "Targeting the epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 65, no. 1, pp. 8–20, 2008.

[8] Efat Azizi, Adam Kittai and Peter Kozuch, "Review Article Antiepidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies: Applications in Colorectal Cancer" Hindawi Publishing Corporation, Chemotherapy Research and Practice. Volume 2012, Article ID 198197, 15 pages

[9] J. Mendelson, "Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 20, no.18, supplement, 2002.

[10] Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. J Clin Oncol 2004; 22: 1201-8.

[11] Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. CA Cancer J Clin 2005;55:10–30.

[12] Nicolas Azzopardi, Thierry Lecomte, David Ternant, et al. Cetuximab Pharmacokinetics Influences Progression-Free Survival of Metastatic Colorectal Cancer Patients *Clinical Cancer Research* 2011;17:6329-6337

[13] Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 2004; 351:337–45.

[14] Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, Mayer RJ, Gold P, Stella P, et al. Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol* 2006; 24:4914–21.

[15] Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006;66:3992–5.

[16] Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res* 2007;67:2643–8.

[17] Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* 2007;96:1166–9.

[18] De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, et al. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 2008;19:508–15.

[19] Coleman MP, Gatta G, Verdecchia A, Esteve J, Sant M, Storm H and the EUROCARE Working Group. The EUROCARE-3 study: Cancer survival in Europe at the end of the 20th century Group. *Ann Oncol* 2003; 14: 128-49.

[20] Viñes JJ, Ardanaz E, Arrazola A, Gaminde I. Epidemiología clínica del cáncer colorrectal: la detección precoz. *Cir Esp* 2003; 73: 2-8.

[21] C. Bardin et al., Guidelines for the practical stability studies of anticancer drugs: A European consensus conference. *Annales Pharmaceutiques Françaises* (2011) **69**, 221—231

[22] Guía ICH Q2-R1, 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology. International Conference on Harmonization, Food and Drug Administration, USA, November 1996 and November 2005.

[23] International Conference on Harmonization (ICH guidelines) ICH Q6B, Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products.

[24] Boqué R. y Rius F. X. “Avances en Quimiometría Práctica”, Servicio de Publicaciones e Intercambio científico de la Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela (1994).

[25] James N. Miller et al. Estadística y quimiometría para química analítica (4ª ED.) 2002.

[26] EMEA. Scientific discussion cetuximab (2004)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Scientific_Discussion/human/000558/WC500029113.pdf

CO-21 Participación femenina en la política local de la Región de Murcia (1987-2011)

Juan Bautista Martínez Fernández, Universidad de Murcia, jbaumar@hotmail.com

Resumen

En esta comunicación presentamos los resultados de una investigación empírica sobre la participación y representación de la mujer en las elecciones municipales en la Región de Murcia entre 1987 y 2011.

Según los resultados de esta investigación vemos como la presencia femenina ha aumentado en las listas electorales de todos los partidos políticos de la Región de Murcia entre 1987 y 2011. Del mismo modo vemos la dificultad para trasladar esa presencia femenina en las listas electorales a las corporaciones locales, debido a que las mujeres suelen estar alejadas de los tres primeros puestos de las listas electorales. Esta dificultad para trasladar la presencia femenina de las listas electorales a las corporaciones locales se hace más evidente en los partidos minoritarios.

La Ley de Igualdad ha tenido un efecto positivo, en la Región de Murcia, en cuanto a la presencia femenina en las listas electorales, pero no en lo que a la presencia femenina en las corporaciones locales se refiere, pues los partidos políticos han reaccionado, según los datos resultantes de este estudio, disminuyendo la presencia femenina en los tres primeros puestos de sus listas, a excepción del PSOE y, en menor medida, el PP.

Palabras Clave

Participación, representación, mujer, cuotas de género, Ley de Igualdad, Región de Murcia.

Abstract

In this paper we present results of empirical research on participation and representation of women in local elections in the Region of Murcia between 1987 and 2011.

According with the results of this research we can see how the presence of women has increased in the electoral lists of all political parties in the Region of Murcia between 1987 and 2011. Similarly we see the difficulty to translate the female presence in the electoral lists to local corporations, because women tend to be far from the top three of electoral lists. This difficulty to translate the female presence of electoral lists to local corporations is most evident in the minority parties.

The Equality Act has had a positive effect, in the Region of Murcia, in terms of the presence of women on electoral lists, but not as far as the presence of women in local government is concerned, because the political parties have reacted, according to the data resulting from this study, decreasing the female presence in the top three of their lists, except PSOE and to a lesser extent, PP.

Key Words

Participation, representation, woman, gender quotas, Equality Act, Region of Murcia.

1 Introducción

Aunque el debate en torno al voto femenino vino de la mano del concepto de ciudadanía surgido durante la Ilustración, no es hasta el siglo XX cuando los distintos países reconocen en su legislación el derecho al voto de la mujer, así Estados Unidos lo reconoce en 1920, Reino Unido en 1928, España en 1931, Francia en 1946, Argentina, México y Japón en 1947, Suiza en 1971 o Sudáfrica en 1994. En otros países todavía hoy no se reconoce a las mujeres el derecho al voto.

En España el derecho al sufragio femenino tuvo poca continuidad, ya que cinco años después de su aprobación estalló la guerra civil, seguida de una larga dictadura que se extendería hasta 1975. La dictadura franquista no sólo privó a hombres y mujeres de su derecho a vivir y a participar en un sistema político democrático, sino que su ideología conservadora y ultracatólica desarrolló una rígida diferenciación de los roles femenino y masculino que hizo más difícil la incorporación de la mujer española a las distintas esferas de la vida pública española una vez finalizada la dictadura.

Tras la dictadura se reconoció el derecho a sufragio femenino activo y pasivo en 1977^{ix}, ratificado por la Constitución Española de 1978 y la ley electoral vigente en la actualidad^x. Esto no quiere decir que la incorporación de la mujer a la plena participación política fuese inmediata, si bien es cierto que desde el primer momento la mujer ejerció su derecho al voto, no es menos cierto que el hecho de conseguir la misma representatividad que el hombre en las listas electorales ha constituido, tanto en España como en el resto de países de su entorno sociopolítico, un lento proceso, todavía hoy inacabado.

Así, hay que esperar hasta diciembre de 1981 para ver a la primera mujer nombrada ministra en España (Soledad Becerril, UCD) y hasta 1988 para ver a las dos siguientes (Matilde Fernández y Rosa Conde, PSOE). En las cuatro primeras legislaturas de la democracia (1977-1989), las diputadas en el Congreso sólo representan un 7% del total, llegando al 14.5% en 1989 y al 22% en 1996, según datos aportados por Frutos Balibrea y García Escribano^{xi}. Mientras, Margaret Thatcher ya era líder del Partido Conservador británico en 1975 (y Primera Ministra del Reino Unido desde 1979) y Gro Harlem Brundtland era Primera Ministra de Noruega en 1981, aunque hay que reconocer que esta tampoco es la tónica general de nuestro entorno sociopolítico.

Aunque existen numerosos estudios sobre participación femenina en la política española, participación femenina en las distintas instituciones democráticas españolas, también para el caso de Murcia, e incluso varios estudios sobre el impacto de la Ley de Igualdad^{xii} en las distintas elecciones, es necesario, porque viene a cubrir un hueco existente en la literatura científica sobre la cuestión, un estudio empírico exhaustivo sobre la evolución de la participación femenina en la política local de la Región de Murcia, relacionando su presencia en las distintas listas electorales con su presencia en los plenos de las distintas corporaciones locales, teniendo en cuenta los distintos tipos de partidos políticos que concurren a estas elecciones, y analizando el impacto de la Ley de Igualdad, que establece que ninguno de los dos sexos puede representar menos de un 40% de cualquier lista electoral, en la participación y representación femenina.

2 Materiales y métodos.

El término *participación* política es muy abstracto, ya que existen muchas formas de participación política, incluso más allá de la participación formal en política. Para José María Maravall^{xiii} constituyen la participación política “aquellas actividades mediante las que los ciudadanos pretenden influir en la elaboración de las decisiones políticas, en la selección de los responsables políticos y en las acciones de estos. Las actividades participativas en una democracia incluyen el comportamiento electoral, pero no solo este; pueden abarcar tanto formas convencionales (tales como el voto o el apoyo a una campaña electoral) como formas no convencionales (tales como una ocupación de fábrica)”, por su parte Frutos Balibrea y García Escribano^{xiv} indican que “la participación política hace referencia al ejercicio del poder en situaciones sociales”.

Para este estudio se ha utilizado el término *participación* en un sentido restrictivo, y se entiende participación política como la participación electoral como sujeto pasivo, es decir, participando como parte de una lista electoral en unas elecciones, en este caso, municipales.

Cronológicamente esta investigación se enmarca entre 1987 y 2011. La fecha de 2011 se ha elegido porque corresponde a las últimas elecciones municipales que se han celebrado cuando se realiza la investigación empírica, en cuanto a la fecha de 1987, se ha elegido la correspondiente a las terceras elecciones municipales celebradas en España después de la transición a la democracia porque el sistema de partidos ya está plenamente implantado y estable en el ámbito local, nos situamos lo suficientemente lejos de la transición como para que los partidos de ámbito estatal ya estén implantados en todo el territorio, y para que la mayoría de pequeños partidos que surgen en la transición ya hayan desaparecido, se hayan integrado en otros partidos o estabilizado, del mismo modo, dejamos fuera de la investigación la convocatoria electoral de 1983 pues se produjo muy cercana en el tiempo (dos meses después) a la disolución de UCD^{xv}, que tuvo un impacto no menor en el sistema de partidos local español. La justificación metodológica para dejar fuera de esta investigación las convocatorias de 1979 y 1983 tiene que ver con los distintos tipos de partido que hemos distinguido en ella.

A la hora de presentar parte de los resultados de esta investigación hemos distinguido entre *partidos tradicionales*, *partidos de ámbito local*, y “*Otros*”.

Dentro de la denominación de *partidos tradicionales* se han incluido a los partidos mayoritarios de ámbito estatal: Partido Popular (PP), Partido Socialista Obrero Español (PSOE) e Izquierda Unida (IU).

Los partidos de ámbito local (PAL) son aquellas organizaciones políticas, independientemente de su forma jurídica (partidos políticos o agrupaciones de electores), que tienen su ámbito de actuación en un único municipio y no están integradas en la organización de ninguna estructura política superior a la del municipio en el que radican.

Dentro de la denominación de “*Otros*”, se han incluido a los partidos de ámbito estatal que no se han incluido en la denominación de *partidos tradicionales* (CDS^{xvi}, PADE^{xvii}, UPyD^{xviii}, etc.) y los partidos de ámbito no estatal, según la definición de Baras, Barberà, Barrio y Rodríguez^{xix}, (Partido Murcianista, PRM^{xx}, etc.).

Para obtener los datos sobre la participación femenina en las distintas listas electorales se han consultado las listas electorales oficiales publicadas en el Boletín Oficial de la Región de Murcia (BORM)^{xxi} entre 1987 y 2011, los datos sobre la participación femenina en las listas de los partidos tradicionales se han obtenido cruzando nuestros datos sobre los partidos de ámbito local con los publicados por Clavero Mira y García Escribano^{xxii} sobre número total de mujeres que se presentaron a las elecciones.

Los datos sobre las mujeres incluidas en los tres primeros puestos de las listas electorales se han obtenido a través de las listas oficiales publicadas en el BORM entre 1987 y 2011.

Los datos sobre la proporción de concejalas en los distintos ayuntamientos de la Región de Murcia, se han obtenido consultando la base de datos de resultados electorales del Ministerio del Interior, cotejándolos con el BORM^{xxiii} y con el Atlas Electoral de la Región de Murcia^{xxiv}.

Para la presentación de los resultados de esta investigación en el presente artículo, se ha optado por presentarlos en gráficos que muestran de forma visual la evolución temporal de los datos resultantes.

3 Resultados y discusión.

La participación femenina en las listas electorales de las distintas elecciones locales ha ido incrementándose paulatinamente entre 1987 y 2011, por distintas razones, principalmente, porque después de la dictadura franquista la mujer fue recuperando su posición en las esferas pública y privada, pero también como apuntan Frutos Balibrea y García Escribano^{xxv} por acciones puntuales tales como el *Decenio para la igualdad de la ONU*, la importante presencia de la mujer en gobiernos y parlamentos del Norte de Europa, la creación del Instituto de la Mujer en 1983, la presión de diferentes grupos de mujeres desde dentro y desde fuera de los partidos políticos o el establecimiento en el 31º Congreso del PSOE (1988) y en IU (1990) de cuotas que garantizan la presencia de la mujer en las listas electorales.

También ha habido elementos que han dificultado la participación política de las mujeres, como la presencia de lo que Judith Astelarra^{xxvi} denomina *lobby masculino*. Si en el resto de países de nuestro entorno sociopolítico, a la mujer se le ha asignado tradicionalmente el sitio de lo privado como su entorno natural frente al hombre que domina el espacio público, en España esta situación se refleja con más intensidad, pues la ideología imperante durante los cuarenta años de dictadura franquista hicieron hincapié en ese rol de la mujer en el espacio de lo privado, como guardiana de la moral, en unos momentos en los que en el resto de Europa la mujer ya estaba consiguiendo un importante papel en la esfera pública.

En este sentido, la mujer ha ido incorporándose poco a poco a la esfera pública y, como podemos ver en el Gráfico 1, en 1987 las mujeres representaban solo el 16,8% del total de miembros incluidos en las listas electorales, pero este número ha ido incrementándose hasta llegar al 45,43% en la convocatoria de 2011. Porcentaje ligeramente superior a lo que marca la Ley de Igualdad pero todavía inferior a la igualdad matemática.

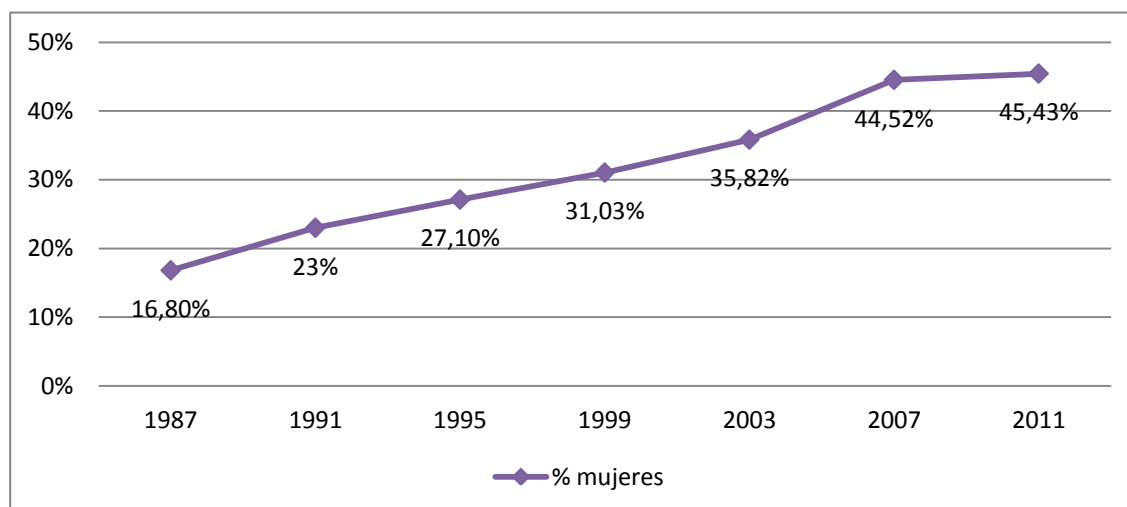


Gráfico 1. Mujeres en las listas electorales de todos los partidos. Elaboración propia.

Analizando el Gráfico 1, dos cosas llaman nuestra atención, por un lado, el fuerte incremento en el número de mujeres que formaron parte de una lista electoral en las elecciones municipales de 2007 con respecto a las elecciones de 2003, y por otro lado, el estancamiento en el crecimiento del porcentaje de mujeres en las listas electorales que suponen las elecciones de 2011. El gráfico nos muestra como el número de mujeres en las listas electorales en 2011 sólo aumenta en un 0.91%, mientras que en 2007 se incrementa en un 8.7% con respecto a las de 2003. En los procesos electorales anteriores, la presencia de las mujeres en las listas electorales se había incrementado en un 4% de media en todos los casos, excepto en los comicios de 1991, en los que se incrementaron en un 6.2% con respecto a las elecciones de 1987. Parece claro que el aumento de 2007 se debe a la aplicación de la Ley de Igualdad, aprobada solo unos meses antes de las elecciones, pero menos claro es el estancamiento de 2011, pudiendo obedecer a una reacción de los partidos a la imposición por ley de cuotas de género, como veremos más adelante.

Como podemos ver en el Gráfico 2, el porcentaje de mujeres que han obtenido el acta de concejal con respecto a los hombres que también han obtenido dicha condición después de unas elecciones municipales, ha evolucionado en este período en el mismo sentido en el que hemos visto que ha evolucionado el porcentaje de mujeres presentes en las distintas listas electorales.

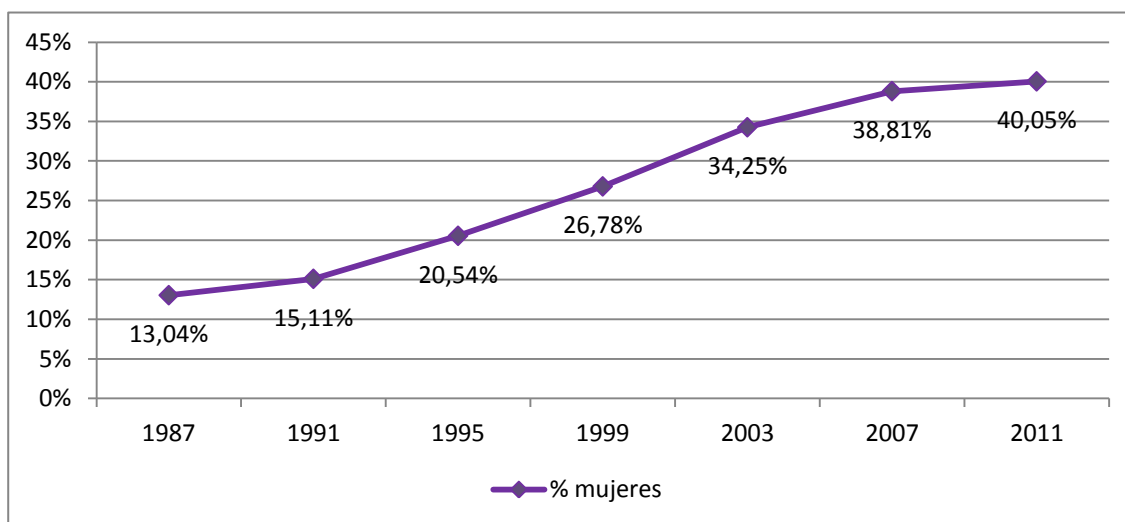


Gráfico 2. Mujeres que han obtenido un acta de concejal. Elaboración propia.

Atendiendo al Gráfico 2, en el año 1987 las mujeres solo suponían un 13.04% del total de concejales de la Región de Murcia, creciendo durante este periodo hasta alcanzar su máximo en la legislatura 2011-2015, aunque, como observamos en el Gráfico 3, el número de concejales en la Región de Murcia durante este periodo ha sido sensiblemente superior al número de concejalas.

A pesar de esta evolución positiva en el acceso de las mujeres a la condición de concejal de una corporación municipal, en el Gráfico 2, vemos como solo después de las elecciones municipales de 2011 la tasa de concejalas llegó al 40% (40.05%) límite mínimo obligatorio que marca la Ley de Igualdad desde 2007 para estar representado cualquiera de los dos sexos en unas listas electorales.

Entonces, sabemos que en las elecciones municipales de 2007, con la Ley de Igualdad ya en vigor, las mujeres que integraban las listas electorales tenían que superar el 40%, y de hecho llegaron al 44.52%, y también sabemos que en 2007, las mujeres concejalas en la Región de Murcia suponían un 38.81%, este desfase entre la representatividad de las mujeres en las listas electorales y su representatividad en las corporaciones municipales también se repite en las elecciones de 2011. El Gráfico 4 nos ayuda a confirmar que este no es un hecho aislado, ya que en él vemos como la tónica general entre 1987 y 2011 es que la repre-

sentatividad de las mujeres en las listas electorales no se traslade a las corporaciones municipales. Por lo tanto, las mujeres tienen, y han tenido en este periodo, menos poder real en los municipios que presencia en las listas electorales.

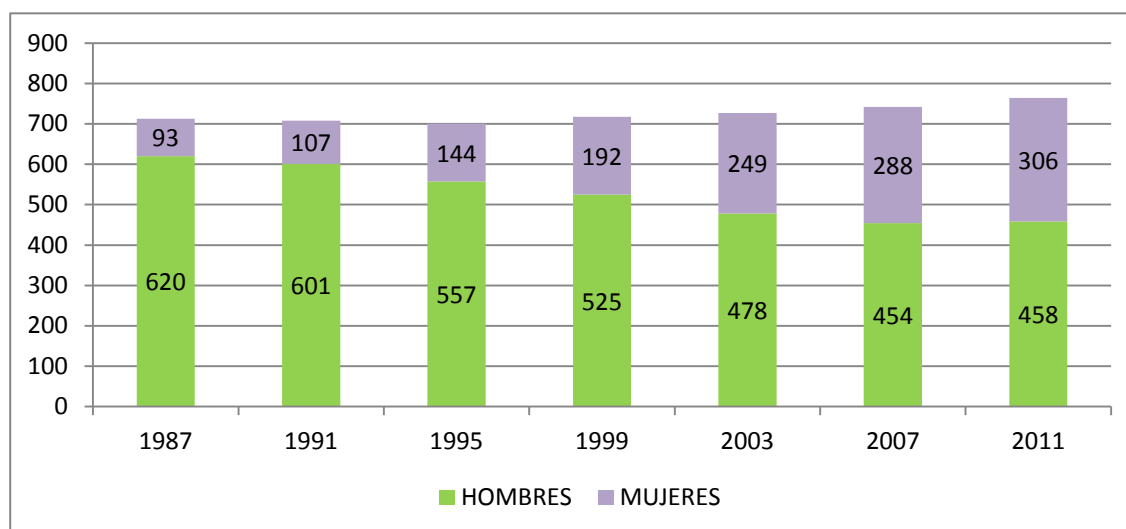


Gráfico 3. Comparativa entre hombres y mujeres concejales. Elaboración propia.

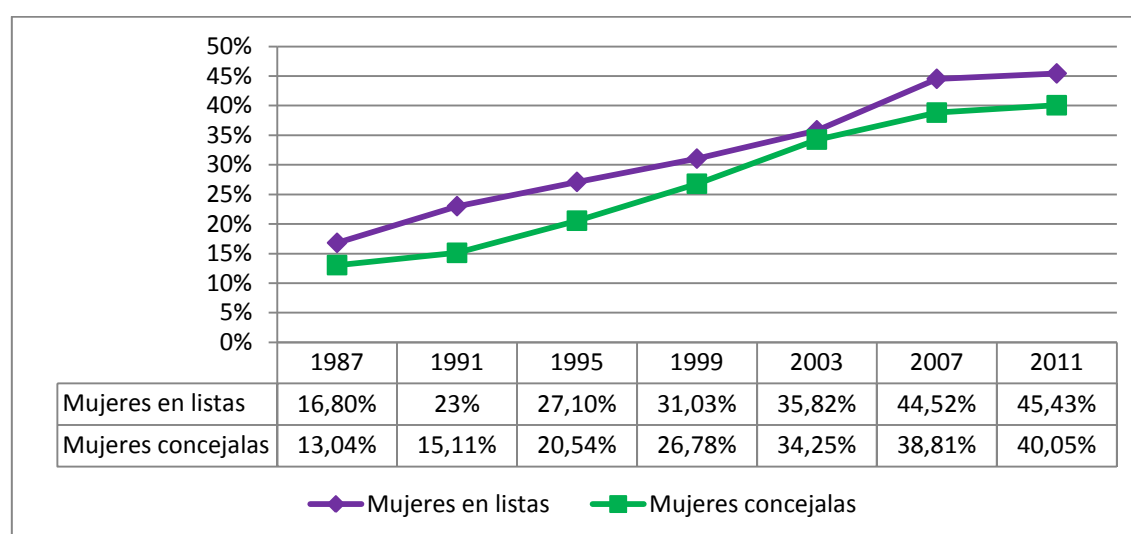


Gráfico 4. Comparativa entre mujeres en las listas electorales y mujeres concejales. Elaboración propia.

La respuesta a esta falta de correlación entre la presencia femenina en las listas electorales y su presencia, como concejales, en las corporaciones locales es que, como podemos ver en el Gráfico 5, la presencia femenina en los tres primeros puestos de las listas electorales es inferior a su presencia en las listas electorales y, como resultado, en las corporaciones locales.

Como refleja el Gráfico 5, el porcentaje de mujeres en los tres primeros puestos de las listas electorales en la Región de Murcia entre 1987 y 2011 ha sido un 10% menor, de media, que el porcentaje de presencia de las mujeres en las listas electorales.

En definitiva, podemos afirmar que la presencia real de las mujeres en las listas electorales no se traslada en la misma proporción a los plenos de las corporaciones locales porque las mujeres suelen estar alejadas de los tres primeros puestos de las listas electorales, sobre todo del primero, como podemos ver en la Tabla 1.

Tabla 1. Mujeres en los tres primeros puestos. Elaboración propia

	P1		P2		P3	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
1987	183	8	171	20	160	31
1991	167	16	158	35	153	30
1995	158	9	134	33	119	48
1999	158	15	136	37	111	62
2003	140	23	115	48	82	81
2007	140	32	115	57	76	96
2011	171	39	139	71	97	113

Si tomamos como válido el límite de 40% establecido en la Ley de Igualdad para marcar la *igualdad* entre ambos sexos, en el terreno de los tres primeros puestos, en la Región de Murcia, hemos estado, y estamos, lejos de la igualdad entre géneros. Más aún si tomamos como referencia para la igualdad el 50%. A pesar de estar lejos de lograr la igualdad de géneros en los tres primeros puestos de las listas electorales, debemos indicar que en este aspecto, la evolución también ha sido positiva, creciendo la presencia femenina desde el 10.30% en 1987 hasta el 35.39% en 2011.

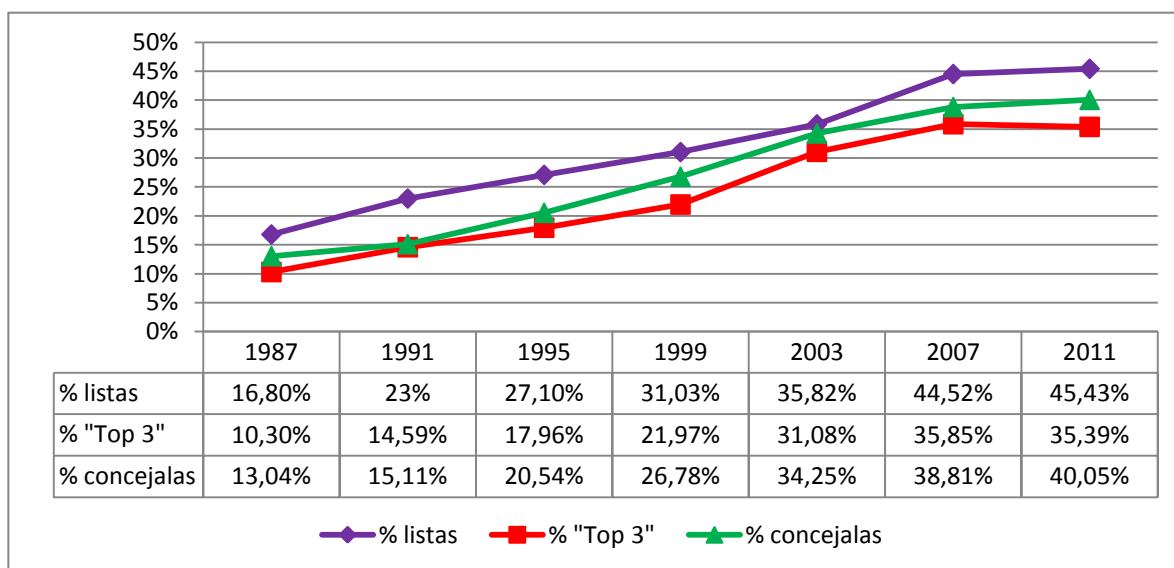


Gráfico 5. Mujeres en las listas electorales, en las corporaciones locales y en los tres primeros puestos de las listas electorales.

Si detenemos nuestra atención en el Gráfico 5, podemos ver como el porcentaje de mujeres que han integrado los tres primeros puestos de las listas electorales ha descendido, por única vez en el periodo estudiado, en la convocatoria electoral de 2011 con respecto a la convocatoria de 2007 (en un 0.24%), como vemos en el Gráfico 6, este hecho se debe a la fuerte bajada de la presencia femenina en los tres primeros puestos de las listas electorales de Izquierda Unida (IU) para las elecciones municipales de 2011, en relación con las de 2007, y a la bajada, en este caso más moderada, de la presencia femenina en las listas electorales de los distintos partidos de ámbito local.

En este caso vemos como se incrementa la presencia femenina en los tres primeros puestos de todos los partidos políticos, con la excepción ya indicada de IU y los partidos de ámbito local, en los que desciende esta presencia para las elecciones de 2011 en un 6.67% y 2.30%, respectivamente.

Cabe señalar también, la subida más atenuada en la presencia femenina en los tres primeros puestos de las listas electorales del Partido Popular (PP) también en las elecciones de 2011, subiendo sólo un 2.51%, crecimiento muy inferior al que experimenta en las demás convocatorias electorales del periodo estudiado.

El hecho de que solo el PSOE haya mantenido similar ritmo de crecimiento, en este aspecto, que en el resto de la serie, puede deberse a una reacción del resto de partidos a la imposición por ley de cuotas de género (Ley de Igualdad), ya que como señalan Frutos Balibrea y García Escribano^{xxvii}, el sistema de cuotas electorales sufre rechazo tanto por parte de hombres como de las mujeres que forman parte de las listas electorales, en el primer caso porque sienten que las mujeres les quitan el puesto en la lista electoral, y en el segundo caso, porque sienten que su posición en la lista electoral se la han ganado por sus propios méritos y no gracias a una ley que establece cuotas de género.

En este punto, cabría preguntarse, como hacen Tasa y Uribe^{xxviii} para el caso de las elecciones europeas, autonómicas y generales, si la Ley de Igualdad no actuará como techo para las mujeres a la hora de incrementar su participación en las instituciones políticas, por la intención de la mayoría de partidos políticos en ceñirse al 40% mínimo que marca la ley, pervirtiendo así el espíritu de la ley.

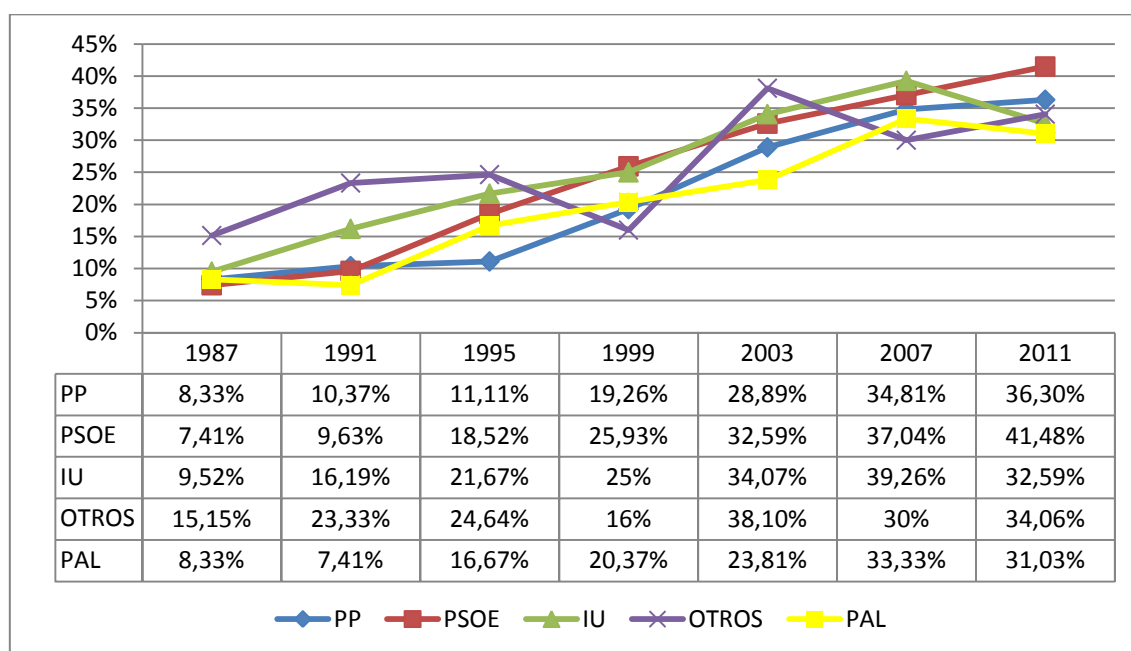


Gráfico 6. Mujeres en los tres primeros puestos de las listas electorales. Elaboración propia

El Gráfico 7 refleja la distribución de las concejales por partidos políticos, en él podemos ver como el PSOE es el partido en el que la presencia de concejales es mayor, en proporción con la presencia de hombres concejales, seguido del PP.

Izquierda Unida, por su parte, a pesar de ser, junto al PSOE, el partido que históricamente, según los datos aportados en el Gráfico 6, más presencia femenina ha tenido en los tres primeros puestos, es de los partidos que menos mujeres concejales tiene. Este hecho se explica por los bajos resultados electorales obtenidos por IU, que le permiten conseguir, habitualmente, no más de uno o dos concejales en cada municipio, que suelen ser hombres, pues como vemos en la Tabla 1, la tónica general de todos los partidos es situar a las mujeres, dentro de los tres primeros puestos, en el tercer puesto, siendo el primer y segundo puesto de las listas electorales, un terreno todavía fuertemente dominado por el hombre.

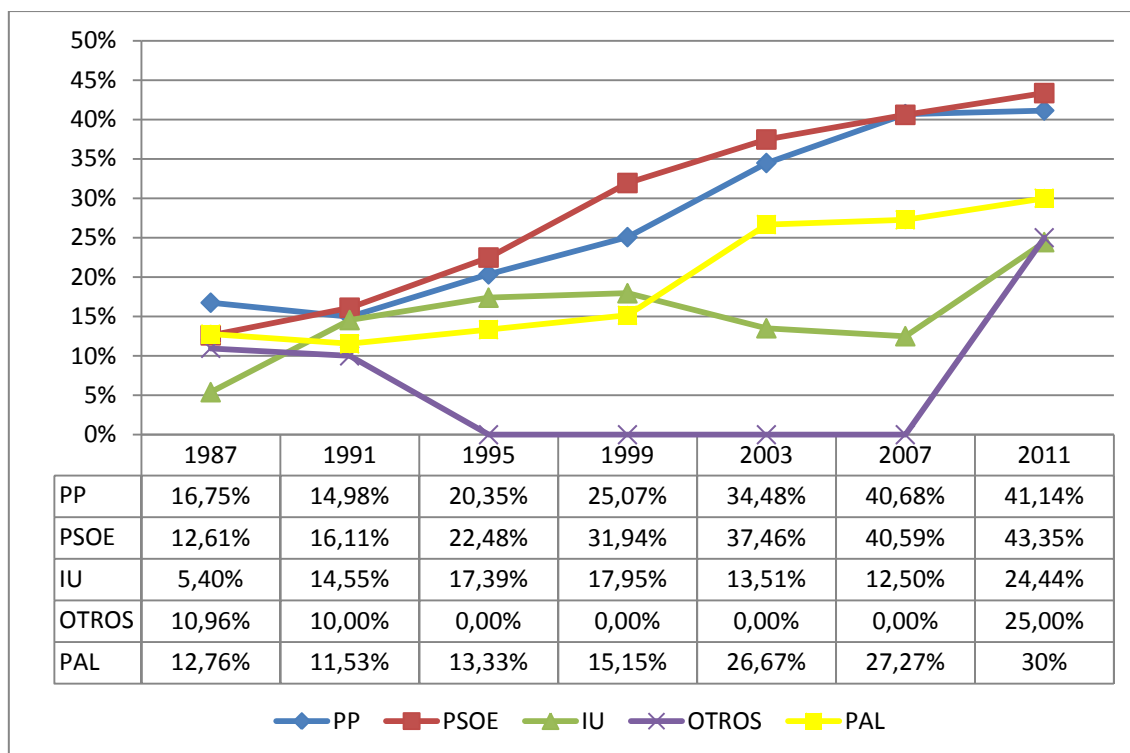


Gráfico 7. Presencia femenina en las corporaciones locales. Elaboración propia.

En este punto hay que hacer una distinción entre los partidos políticos mayoritarios, en términos electorales, y los partidos que consiguen resultados electorales más bajos. En el primer caso, al conseguir un número elevado de concejales es más fácil que obtengan su acta de concejal las mujeres que no están situadas en los puestos más altos de la lista. Este es el caso del PP en la Región de Murcia, donde consigue, sobre todo desde 1995, amplias y holgadas mayorías electorales en los distintos municipios, lo que le permite conseguir ser, junto al PSOE, el partido con más mujeres entre sus concejales, siendo históricamente (Gráfico 6) el tercer partido en cuanto a presencia femenina en los tres primeros puestos de sus listas electorales.

En el segundo caso, los partidos minoritarios, al seguir la misma tendencia que los mayoritarios, y no colocar a las mujeres en los puestos más altos de sus listas electorales, encuentran más dificultades para traducir la presencia femenina en sus listas electorales en presencia femenina en las corporaciones locales.

En definitiva, para una mujer en la Región de Murcia es más difícil conseguir un acta de concejal en un partido minoritario que en uno mayoritario, pues en el segundo caso, una mujer que vaya en el cuarto puesto de la lista electoral tiene su acta de concejal casi asegurada (sobre todo en el caso del PP), y en el primer caso, incluso la segunda de la lista tendría difícil su entrada en una corporación local. Se podría decir que esta premisa se cumple igual para los hombres, pero se agrava en el caso de las mujeres ya que los datos nos dicen (Gráfico 5 y Tabla 1) que los tres primeros puestos de las listas electorales suelen estar ocupados en su mayoría por hombres, sobre todo el segundo y primer puesto.

Por lo tanto, parece que el último *techo de cristal* que le queda a la mujer para conseguir la plena igualdad con respecto al hombre en lo que a participación y representación política se refiere es alcanzar los dos primeros puestos en las distintas listas electorales.

4 Conclusiones

Como conclusiones de esta investigación empírica podemos destacar que la participación femenina en la política municipal de la Región de Murcia, entendida como participación en las listas electorales y representación en las corporaciones locales se ha incrementado entre 1987 y 2011, pero sin llegar a la igualdad real y, sobre todo, sin llegar a la normalización que supondría que en una convocatoria electoral las mujeres en las listas electorales o en las corporaciones locales fueran más numerosas que los hombres.

Por otro lado, hemos visto como la presencia femenina en las listas electorales no se traslada, en la misma proporción, a las corporaciones locales, como hemos demostrado, esto se debe a que las mujeres han conseguido en este periodo cierta presencia en las distintas listas electorales pero lejos de los primeros puestos. Uno de los principales retos para las mujeres, los partidos políticos y la sociedad en general, en un futuro cercano, será conseguir la normalización de la llegada habitual de las mujeres a los primeros puestos de las listas electorales.

Los resultados de esta investigación también nos muestran como es más fácil para los partidos mayoritarios, en términos electorales, trasladar la presencia de mujeres en sus listas a las corporaciones municipales, ya que sus buenos resultados electorales propician que no solo consigan acta de concejal aquellos candidatos que están colocados en los primeros puestos de la lista. Para conseguir trasladar la presencia femenina de sus listas a las corporaciones locales, los partidos minoritarios deberían abrir a las mujeres el acceso al primer y segundo puesto de las listas electorales, ya que con el tercer puesto no es suficiente, en estos casos.

En cuanto al impacto de la Ley de Igualdad, a la luz de los datos arrojados por esta investigación, lo tenemos que juzgar como positivo, pero con matices. No se puede negar que el impacto ha sido positivo, pues la presencia femenina en las listas electorales de todos los partidos políticos ha superado el 40% desde su aplicación en 2007, hecho que antes no ocurría, pero, por otro lado, hemos visto como los partidos políticos de la Región de Murcia, excepto el PSOE, han reaccionado a la Ley de Igualdad bajando la presencia de mujeres en los tres primeros puestos o creciendo pero en menor proporción que en años anteriores, como es el caso del PP. Como consecuencia de este hecho, la presencia femenina en los tres primeros puestos sólo llega al 40% en el caso del PSOE en 2011, y la presencia femenina en las corporaciones locales solo llega al 40% en los casos del PP y del PSOE en 2007 y 2011.

Como principales vías de investigación de continuación de este estudio, podemos señalar la ampliación y corroboración de este estudio a todo el territorio nacional, así como su comparación con la presencia femenina en otros niveles de nuestro sistema político y otros países de nuestro entorno sociopolítico

5 Referencias.

- ¹ Ley 1/1997 para la Reforma Política y Real Decreto-Ley 20/1977 sobre normas electorales.
- ² Ley Orgánica 5/1985, de Régimen Electoral General.
- ³ Frutos Balibrea, L. y García Escribano J.J. (1999), "Mujeres, hombres y participación política. Buscando las diferencias", *Revista Española de Investigaciones Sociológicas (REIS)*, Nº. 86, pp. 307-329.
- ⁴ Ley Orgánica 3/2007, para la igualdad efectiva de mujeres y hombres.
- ⁵ Maravall, J.M. (1981), *La política de la Transición, 1975-1980*. Madrid. Taurus. Pp. 88-89.
- ⁶ Frutos Balibrea, L. y García Escribano, J.J. (1998), "La presencia de la mujer en la vida política de la Región de Murcia", en Frutos Balibrea, L. y Maurandi Guirado, R. (eds.), *Mujer e investigación. Encuentros de primavera del CEUMU*. Murcia. CEUMU, pp. 280.
- ⁷ Unión de Centro Democrático.
- ⁸ Centro Democrático y Social.
- ⁹ Partido Demócrata Español.
- ¹⁰ Unión Progreso y Democracia.
- ¹¹ Baras M., Barberà O., Barrio A. y Rodríguez J. (2010), *Partidos de ámbito no estatal y gobernabilidad multinivel: el caso de España (1977-2008)*. Working Paper Nº 291. ICPS.
- ¹² Partido Regionalista Murciano.
- ¹³ BORM de 12 de mayo de 1987, 30 de abril de 1991, 2 de mayo de 1995, 18 de mayo de 1999, 29 de abril de 2003, 1 de mayo de 2007 y 26 de abril de 2011.
- ¹⁴ Clavero Mira E. y García Escribano J.J. (2011), "Las elecciones municipales en la Región de Murcia", en García Escribano J.J. (ed.), *Elecciones en la Región de Murcia*. Murcia. Editum.
- ¹⁵ BORM de 20 de julio de 1987, 20 de julio de 1991, 21 de julio de 1995, 27 de julio de 1999, 3 de julio de 2007, 7 de julio de 2007 y 15, 25, 27 y 29 de julio de 2011.
- ¹⁶ García Escribano, J.J. (dir.), (2000), *Atlas electoral de la Región de Murcia*. Murcia. Editum.
- ¹⁷ Frutos Balibrea, L. y García Escribano, J.J. (1998), "La presencia de la mujer en la vida política de la Región de Murcia", en Frutos Balibrea, L. y Maurandi Guirado, R. (eds.), *Mujer e investigación. Encuentros de primavera del CEUMU*. Murcia. CEUMU, pp. 289-290.
- ¹⁸ Astelarra, J. (comp.) (1990), *Participación política de las mujeres*. Madrid. CIS, p.17.
- ¹⁹ Frutos Balibrea, L. y García Escribano, J.J. (1998), "La presencia de la mujer en la vida política de la Región de Murcia", en Frutos Balibrea, L. y Maurandi Guirado, R. (eds.), *Mujer e investigación. Encuentros de primavera del CEUMU*. Murcia. CEUMU, p. 291.
- ²⁰ Tasa V. y Uribe A. (2013), *Consecuencias de la Ley Orgánica 3/2007 de igualdad entre mujeres y hombres sobre la representación parlamentaria en España*. Ponencia presentada al XI Congreso de la Asociación Española de Ciencia Política. Sevilla.

CO-22 Web Attacks : Study and comparaisn

Karim AbouElmehdi, The Mohammadia Engineering School laboratory l'ASTIMI, karim.abouelmehdi1@gmail.com

Ahmed Bentajer, University Cadi Ayyad, High School of Technology Safi, Morocco, a.bentajer@gmail.com

Abstract

The evolution of attacks targetting web applications requires evaluators of web security systems to orderly organize the classification of web attacks in order to choose better the games of test. In this section whose objective is to classify web attacks based on the classification of OWASP (Open Web Application Security Project) that addresses the ten largest risks of web security.

This method of ranking will be able to give a more clear vision of the current web attacks and also an estimate of the probable future attacks. that's why we propose to use a method based on the classification tree (CTM.For classification tree method).

Finnaly, intervention tools CTE (the classification tree Editor)

To generate the attacks'classes is totally necessary.

Key words :

Web attacks - Web classes - Classification tree.

1 Introduction

Massive deployment tools security pose serious problems for evaluators of these tools, how to test effectively and be sure that these tools work correctly for all existing attacks.

In this context we propose an appropriate and representative classification based on the ten vulnerabilities security web application through the OWASP. The idea is to classify these attacks that exploit vulnerabilities by constructing classes of attacks in such a way the tests will take only element of each class features.

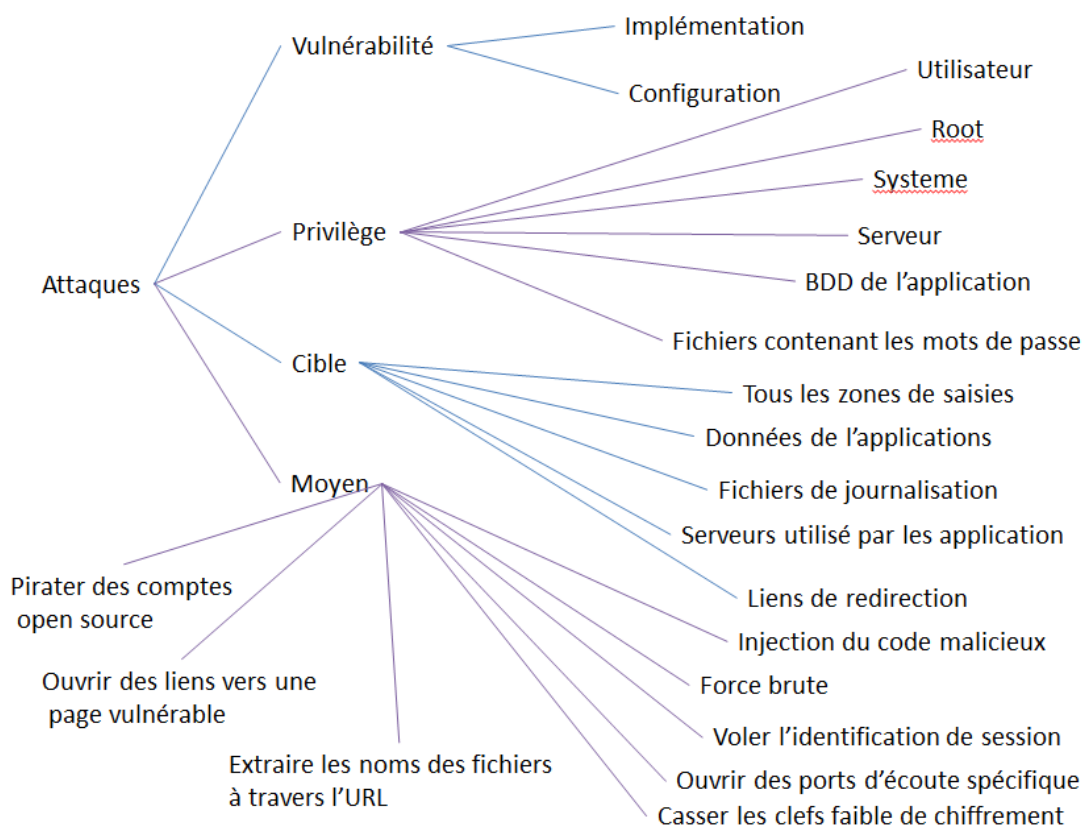
Several Studies have catalogued vulnerabilities in order to facilitate the analysis and the identification of common features of known vulnerability. by citing what (WASC) association deriving from, international experts of industrial and organization of world open source. it describes the threats safety on application web. Also OWASP volunteer association whose objectives security of web application. It publishes the topten security vulnerabilities in the most dangerous document « OWASP 10 ». this latest ranking that is done in 2010 is the main basis of our study that finalize a new ranking approach.

In this study we began with athrough analysis of the ten vulnerabilities of (OWASP) and after we tried to take the most useful attributes.

The second phase is to find common attributes of these attacks in order to reduce their numbers.

In the third stage we drew the final tree of classification CTM. To generate classes of attacks to choose cases tested by tool CTE.

2 Results



3 Conclusions and Future Work

It becomes increasingly necessary to assess with certainty the robustness of each web security system overlooked any types of attacks. this will help the administrator to distinguish whether the level of security of their system is satisfactory.

Later in this work. It is suitable to apply this approach to web attacks in order to categorize and have them in lists. And to use automatic selection of web attacks during the test phase.

4 References

- [1] Dominique Alessandri, "Attack-Class-Based Analysis of Intrusion Detection Systems", Ph.D. Thesis , Newcastle upon Tyne, UK: University of Newcastle upon Tyne, School of Computing Science, 2004.
- [2] Matt Bishop, "Vulnerabilities Analysis", Int. Symp. on Recent Advances in Intrusion Detection , 1999.
- [3] Classification Tree Editor "CTE", disponible à <<http://systematic-testing.com>>
- [4] Common Vulnerabilities an Exposures "CVE", disponible à <http://cve.mitre.org/>
- [5] M. Grochtmann, J. Wegener, K. Grimm, "Test case design using classification trees and the CTE", In: Proceedings of the 8th International Software Quality Week , pp. 1-11, 1995.
- [6] John D. Howard. "An Analysis of Security Incidents on The Internet", PhD thesis , Carnegie Mellon University, 1997.
- [7] K. Kendall, "A database of computer attacks for the evaluation of intrusion detection systems", Master's Thesis . Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, June 1999.

[8] K. S Killourhy; R. A. Maxion, and K. M. C. Tan, "A Defense-Centric Taxonomy Based on Attack" Manifestations, In International Conference on Dependable Systems & Networks , pp. 102-111,, Italy, 28 June - 01 July 2004.

[9] Sandeep Kumar, "Classification and Detection of Computer Intrusions", PhD thesis , Purdue, 1995.

[10] Richard Lippmann, Joshua W. Haines, David J. Fried, Jonathan Korba, and Kumar Das, "Analysis and Results of the 1999 DARPA Off-Line Intrusion Detection Evaluation", Third Intl. Workshop on Recent Advances in Intrusion Detection (RAID2000) , Toulouse, LNCS, vol. 1907, pp. 162-82.

CO-25 Impacto Económico de las Reformas en el Impuesto sobre la Renta

María Roldán Álvarez, Departamento de Economía Aplicada, Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales, Universidad de Granada, Doctorando, telf. 678719007, email: mariarol@ugr.es

Resumen

En materia fiscal, y más concretamente en los ingresos tributarios, es la recaudación procedente de la renta de las personas físicas la principal fuente de ingresos del Estado, de tal manera que es el IRPF el tributo que mayor número de contribuyentes ostenta, presentando así gran sensibilidad a los cambios normativos. Estas modificaciones o cambios en la legislación suelen llevarse a cabo con la intención de reflejar un impacto económico sobre la recaudación efectiva, ya sea en beneficio de la Administración o en detrimento de la misma, pero son muchas las ocasiones en las que se puede apreciar cómo el Ejecutivo no siempre obtiene el resultado deseado, incluso cómo la finalidad con la que se introducen algunas medidas se aleja por completo del objetivo que se pretendía cubrir.

Recopilar las modificaciones más relevantes en el Impuesto sobre la Renta y analizar la forma en que éstas influyen sobre la recaudación tributaria, el rendimiento neto, las bases o las cuotas, llevando a cabo un análisis económico del Derecho, permite mostrar si los cambios normativos que se han aplicado durante la historia del tributo han incidido de forma directa sobre la recaudación efectiva de este impuesto, al tiempo que admite observar el peso y la evolución de las principales magnitudes que componen el mismo a lo largo de los años.

Palabras clave

Política económica, modulación de los tributos, cambios normativos, recaudación efectiva, IRPF.

1 Introducción

Cada gobierno, a través de la articulación de su política fiscal, trata de incidir sobre la regulación impositiva con la finalidad de incrementar o disminuir la recaudación tributaria tratando de aplicar sus principios programáticos. En este sentido, y puesto que la estructura de cada impuesto se fija mediante leyes, es el Ejecutivo quien, mediante la modificación de las distintas normas tributarias, diseñando una determinada política económica o fiscal, busca la consecución de unos determinados efectos sobre los sujetos pasivos, sobre las bases, las cuotas y, en definitiva, sobre la recaudación.

Desde el inicio de la transición democrática en 1977, el sistema tributario español ha sido objeto de numerosos cambios, lo cual ha permitido, en muchas ocasiones, aumentar considerablemente la recaudación. Por tanto, el objetivo que inspira esta investigación, es la recopilación y análisis de los principales cambios normativos en el Impuesto sobre la Renta de las Personas Físicas (en adelante, IRPF), para el periodo 2007-2009, así como su comprobación cuantitativa llevando a cabo un análisis económico del Derecho¹, ya que éste es un instrumento interdisciplinario que ofrece dos grandes campos de estudio y facilita una mayor comprensión de ambos². Asimismo, se analiza el comportamiento de sus principales magnitudes,

¹ El análisis económico del Derecho es una corriente dentro de la teoría del Derecho que aplica métodos propios de la economía en el razonamiento jurídico. Incluye el uso de la metodología y los conceptos propios de la ciencia económica para predecir el efecto de las normas jurídicas, con el objeto de determinar qué leyes o disposiciones jurídicas son económicamente eficientes, y predecir qué medidas deberían ser promulgadas o adoptadas.

² COOTER, R. Y ULEN, T.: *Derecho y economía*, Edit. Fondo de Cultura Económica, 2ª edición en español, 2008, 16-18.

su peso respecto del resto de variables y, según el caso, su vinculación a la coyuntura económica del momento.

Tal y como afirman KAPLOW Y SHAVELL³, el análisis económico del Derecho trata de responder a dos preguntas básicas acerca de las normas jurídicas: ¿cuáles son los efectos de las normas legales sobre el comportamiento de los hechos relevantes? y, ¿son estos efectos de las normas legales socialmente deseables?. Al responder a estas preguntas, el enfoque empleado en el análisis económico del Derecho es el utilizado en el análisis económico general, es decir, el comportamiento de los individuos y las empresas, bajo el marco de la economía del bienestar. Sin embargo, y centrándonos en este concreto análisis, estas preguntas podrían modificarse por las siguientes: ¿consigue el legislador el efecto deseado cuando presupuesta una determinada norma o modificación legislativa?, ¿cuál ha sido el efecto para el contribuyente?. Siendo la respuesta a estas preguntas la finalidad que aborda este trabajo.

El análisis económico del Derecho dota y fundamenta a la estructura jurídica, de tal manera que la eficacia y la eficiencia sean las propias del marco que reviste la creación de las leyes. Además, y así lo pone de manifiesto GUTIÉRREZ⁴, es tan importante la garantía de la eficiencia en la Administración de Justicia vía ley, cómo que esta última busque, de forma explícita, que la sociedad se vea reflejada en las decisiones jurídicas en todos los escenarios posibles; perspectiva sobre la que urge un derecho más abierto de lo tradicional y que se pueda ubicar entre la sociedad y la empresa, tal y como lo estima la sociología jurídica. Todo ello podría ser aplicable, de la misma manera, al ámbito tributario.

La perspectiva economicista sobre el mundo del derecho no es algo nuevo⁵, de hecho, en los orígenes de la economía política, el análisis de las normas e instituciones que regulaban el funcionamiento de los mercados ocupaba un lugar fundamental en las preocupaciones de quienes se dedican a su estudio. De la misma manera, ALFARO⁶ defiende que el análisis económico del Derecho permite la crítica de los cambios legislativos y de las evoluciones doctrinales y jurisprudenciales en términos de su contribución al desarrollo económico o a poner palos en las ruedas del funcionamiento de la economía; al tiempo que pone de manifiesto que dicho estudio económico enriquece, notablemente, la argumentación del jurista en pro o en contra de una regla o de la interpretación de una regla y hace la discusión mucho más rigurosa.

La política fiscal, como una suma tanto de los ingresos como de los gastos públicos es, junto con la política monetaria, uno de los principales mecanismos de política económica de los que disponen las Administraciones Públicas para alcanzar los objetivos elegidos mediante la participación del sector público en las relaciones fiscales y económicas. Esta influencia sobre los ingresos procedentes de los diferentes tributos incidirá sobre la actuación que los agentes económicos presenten en el mercado.

En este sentido, el Ejecutivo plantea unos objetivos tanto de política económica como fiscal, buscando alcanzar unos determinados fines, que pueden tener unos efectos sobre la recaudación, la segmentación de contribuyentes posicionándolos en mejor tributación o incentivando/penalizando sectores de actividad económica o grupos de contribuyentes. Para conseguir estos efectos, se plantea la introducción de diversos cambios en la legislación. Es más, la ausencia de modificaciones, también puede tener efectos, como es la incidencia en la recaudación del tratamiento de la inflación. Al mismo tiempo que, en determinadas ocasiones, se produce una renuncia a ese fin recaudatorio o de financiación a favor de diversos ob-

³ KAPLOW, L. Y SHAVELL, S.: "Economic Analysis of Law", *Handbook of Public Economics*, Vol. 3, Elsevier, 2002, 1661-1784.

⁴ GUTIÉRREZ, J. A.: "Análisis económico del derecho y del derecho económico bajo revisión empresarial", *Opinión Jurídica: Publicación de la Facultad de Derecho de la Universidad de Medellín*, Vol. 11, 21/2012, 117-134.

⁵ CABRILLO, F. Y ALBERT, R.: "El análisis económico del derecho en la encrucijada", *Ekonomiaz: Revista vasca de economía*, 7/2011, 200-221 (Ejemplar dedicado a: La nueva economía institucional).

⁶ ALFARO, J.: "Los juristas -españoles- y el análisis económico del derecho", *Indret: Revista para el Análisis del Derecho*, 1/2007, 417-429.

jetivos extrafiscales, esto es, se utiliza el impuesto con una finalidad distinta de la puramente recaudatoria, pero con un propósito propio para la consecución de fines de política económica, cultural o social, entre otras.

De esta manera, y como señaló MARTÍN⁷, los objetivos de política fiscal tienen como meta la obtención de un determinado resultado sobre los ingresos, al que los recursos tributarios deben contribuir. De forma paralela, los objetivos de política económica utilizan también los tributos como herramienta para la obtención de objetivos no fiscales, en temas como el estímulo a la inversión privada y la distribución del ingreso. Por tanto, estos objetivos afectan, directamente, a la legislación tributaria, manifestándose a través de la creación o eliminación de tributos, deducciones y exenciones, la modificación de las tasas impositivas o el otorgamiento de regímenes tributarios especiales a ciertas actividades, regiones y/o contribuyentes. Por otro lado, GALI Y PEROTTI⁸, distinguieron entre aquellos cambios en política fiscal debidos a medidas discrecionales adoptadas por políticos, de aquellos otros en los que dichos cambios eran, únicamente, una respuesta de las variables fiscales ante las fluctuaciones del ciclo económico.

Por tanto, en lo relativo a las normas de liquidación e ingreso de los impuestos, es muy habitual que se generen modificaciones o cambios en la legislación, llevándose a cabo, en la mayoría de los casos, con la intención de reflejar un impacto económico sobre la recaudación efectiva, anticipando o retrasando la recaudación.

Así, la importancia del IRPF, en términos cuantitativos, en la estructura tributaria española, puede observarse en la Tabla 1, en la que se pone de manifiesto que es la recaudación procedente de la renta de las personas físicas la principal fuente de ingresos del Estado, de tal forma que en el año 2012 la recaudación del IRPF, previa a la cesión a las CCAA, representó el 43,26 % de los ingresos impositivos recaudados, es decir, 72.588 millones de euros sobre un total de 167.811 millones de euros⁹, una representación sobre el total de ingresos impositivos muy superior a la del resto de impuestos.

Tabla 1. Recaudación de ingresos impositivos en 2012

Tributos	Recaudación (millones de euros)	Representación respecto al total (%)
IRPF	72.588	43,26
IVA	48.293	28,78
IS	19.581	11,67
IIEE	18.528	11,03
Otros	8.821	5,26

Fuente: Elaboración propia. Datos obtenidos del Proyecto de Ley de Presupuestos Generales del Estado 2013, Ministerio de Hacienda y Administraciones Públicas. Gobierno de España.

Este elevado porcentaje que el IRPF representa sobre la recaudación tributaria, junto con que es el impuesto en el que se afectan un mayor número de contribuyentes, le convierte en un tributo con una gran sensibilidad a los cambios normativos. A esto se ha de añadir que, debido a los mecanismos formales de control, es un impuesto que presenta un escaso mar-

⁷ MARTÍN, F.: "La economía de los Ingresos Tributarios. Un manual de estimaciones tributarias", *CEPAL*, Serie Manuales, 62/2009, 16-17.

⁸ GALI, J. Y PEROTTI, R.: "Fiscal Policy and Monetary Integration in Europe", *NBER Working Paper*, 9773/2003, 9-12.

⁹ Datos obtenidos del Proyecto de Ley de Presupuestos Generales del Estado 2013. Ministerio de Hacienda y Administraciones Públicas. Gobierno de España.

gen de evasión, en especial si se tienen en cuenta los rendimientos del trabajo con las retenciones en la fuente.

Por tanto, a través de este trabajo, se pretende conocer los distintos cambios normativos que se han ido aplicando durante los años que conforman el periodo 2007-2009 y que han incidido de forma directa sobre el IRPF. Así, el análisis sobre la forma en que el legislador puede influir sobre los ingresos tributarios del Estado permite mostrar si las modificaciones que se han ido introduciendo en la legislación durante estos años han tenido el impacto previsto sobre la recaudación de este tributo. Ya RAYMOND ET AL.¹⁰, al analizar la evolución de la recaudación en el IRPF, determinaron la variación esperada en ésta tras modificaciones objetivas y externas al mismo, de tal manera que compararon los incrementos de recaudación motivados por la inflación con las disminuciones recaudatorias atribuibles a cambios en la normativa legal, indicando que uno de los objetivos de tales cambios debería ser compensar la progresividad derivada de la inflación. De otro lado, DÍAZ DE SARRALDE ET AL.¹¹, intentaron poner de manifiesto, al analizar reformas fiscales que implican cambios en la recaudación, las limitaciones de los índices de Kakwani¹² y de Reynolds-Smolensky¹³ para analizar los efectos sobre la progresividad y capacidad redistributiva de los impuestos, de forma que, al observar cómo las reformas fiscales suelen implicar modificaciones en la recaudación, propusieron diversas herramientas que permitieran analizar los efectos sobre redistribución y progresividad en reformas que conllevan variaciones en la recaudación.

Tabla 2. Cambios de legislación en el IRPF

Periodo aplicable	Legislación	Vigencia
1979-1998	Ley 44/1978 , de 8 de septiembre, del Impuesto sobre la Renta de las Personas Físicas	Desde el 1 de enero de 1979
1999-2002	Ley 40/1998 , de 9 de diciembre, del Impuesto sobre la Renta de las Personas Físicas y otras Normas Tributarias	Desde el 1 de enero de 1999
2003-2006	Ley 46/2002 , de 18 de diciembre, de reforma parcial del Impuesto sobre la Renta de las Personas Físicas y por la que se modifican las Leyes de los Impuestos sobre Sociedades y sobre la Renta de no Residentes	Desde el 1 de enero de 2003
2007-2009	Ley 35/2006 , de 28 de noviembre, del Impuesto sobre la Renta de las Personas Físicas y de modificación parcial de las leyes de los Impuestos sobre Sociedades, sobre la Renta de no Residentes y sobre el Patrimonio	Desde el 1 de enero de 2007 hasta la actualidad

Fuente: Elaboración propia. Datos obtenidos del Preámbulo de la Ley 35/2006, de 28 de noviembre, del Impuesto sobre la Renta de las Personas Físicas y de modificación parcial de las leyes de los Impuestos sobre Sociedades, sobre la Renta de no Residentes y sobre el Patrimonio.

¹⁰ RAYMOND, J. L., VALDÉS, T. Y ARGIMON, I.: "Evolución de la recaudación en el IRPF: determinación de las causas y estimación de efectos", *Investigaciones económicas*, Vol. 13, 1/1989, 15-43.

¹¹ DÍAZ DE SARRALDE, S., GARCIMARTÍN, C. Y RUÍZ-HUERTA, J.: "Progresividad y redistribución en reformas fiscales. Los efectos nivel y distancia: una aplicación al IRPF", *Revista de economía aplicada*, Vol. 19, 57/2011, 97-115.

¹² El índice de Kakwani ofrece información acerca de la progresividad del impuesto.

¹³ El índice de Reynolds-Smolensky proporciona una medida del efecto redistributivo de una determinada política fiscal.

Para comprobar si el resultado obtenido con la implantación de diversos cambios en la normativa del Impuesto ha sido el deseado o, por el contrario, el efecto no ha sido realmente el esperado, se llevará a cabo un análisis exhaustivo de las Memorias tanto de la Administración Tributaria como de la Agencia Tributaria para el periodo objeto de estudio, así como informes anuales de recaudación tributaria y aquellos sobre el análisis de datos estadísticos para los ejercicios analizados en materia de IRPF, junto a las diferentes leyes que se han ido introduciendo y que han tenido un impacto sobre dicho tributo, intentando plasmar la forma en que cada cambio distintivo en la legislación vigente, según el año de que se trate, ha afectado o no al número de contribuyentes y/o al importe recaudado y si el resultado finalmente obtenido ha sido el que realmente pretendía el Ejecutivo. Además, es preciso señalar que la información estadística utilizada corresponde únicamente al territorio de régimen fiscal común, excluyéndose por ello el País Vasco y Navarra.

Partiendo de la necesidad de llevar a cabo un análisis sobre series homogéneas, coincidentes con periodos en los que se produce un cambio en la legislación (véase Tabla 2), y con el fin de mostrar una imagen real de los resultados obtenidos, el periodo analizado es el comprendido por los años 2007 a 2009, último ejercicio del que se disponían datos en el momento de la realización de este trabajo.

De esta forma se observa cómo, para una correcta homogeneización de los datos, se analizan las modificaciones introducidas en los años 2007, 2008 y 2009, tras la implantación de la Ley 35/2006, de 28 de noviembre, del Impuesto sobre la Renta de las Personas Físicas y de modificación parcial de las leyes de los Impuestos sobre Sociedades, sobre la Renta de no Residentes y sobre el Patrimonio (en adelante, LIRPF), que tendría efectos a partir de 2007.

2 Análisis de las reformas introducidas en el IRPF

La LIRPF se promulgó con la finalidad, según el Legislador, de modernizar el sistema tributario español, intentando contribuir así a la mejora del modelo de crecimiento y de la competitividad, planteamiento que se adecuaba a la realidad social y económica de España en el momento, entrando en vigor para el ejercicio 2007 y siendo los objetivos básicos que se pretendían alcanzar los siguientes:

- Disminuir la carga tributaria soportada por las rentas del trabajo, con la finalidad de compensar los gastos generales en los que incurre el trabajador, así como discriminar de una forma positiva esta fuente de renta, puesto que es la que soporta gran parte del peso de este tributo.
- Recuperar el principio de equidad horizontal en las circunstancias personales y familiares, ya que el esquema existente de reducción de la base imponible, determinado por el beneficio para el contribuyente, era directamente proporcional a su nivel de renta, de tal manera que a mayor renta mayor era el beneficio al operar el mínimo personal y familiar al tipo marginal del momento. De ahí que la nueva LIRPF modificase el tratamiento fiscal de las circunstancias personales y familiares, mejorando así la equidad horizontal del mismo.
- Reducir el número de tramos de la tarifa y el tipo marginal máximo, de tal forma que éste se asemejase a la media del resto de países de la OCDE¹⁴, cuatro puntos por debajo.

¹⁴ El tipo marginal medio de los países de la OCDE era del 40,7 %, mientras que en España el máximo alcanzaba el 45 %, considerándose por tanto la necesidad de minorarlo al 43 % en el periodo impositivo 2008.

- Introducir neutralidad en la tributación del ahorro, con el objetivo de que todos los instrumentos de previsión social aplicasen el incentivo de la reducción en la base imponible, sin distinción entre ellos.
- Reconsiderar los incentivos fiscales que se destinasen a atender los problemas derivados del envejecimiento, en especial la situación de jubilación, abordando por primera vez el tratamiento fiscal de la dependencia, y persiguiendo así garantizar la suficiencia financiera para el conjunto de las administraciones públicas.

Además, en cuanto a la gestión del impuesto, es destacable la Orden EHA/3398/2006¹⁵ por la que se dictaron medidas para el impulso y homogeneización de determinados aspectos en relación a la presentación de declaraciones tributarias por vía telemática, de tal manera que para este primer ejercicio (2007) fueron 4.476.786 las declaraciones de IRPF presentadas a través de Internet, cifra en torno a un 20 % superior a las 3.775.468 declaraciones presentadas en 2006, aunque inferior a las 6.931.036 declaraciones presentadas vía telemática en el último año objeto de análisis (2009).

En el año 2008, desde el gobierno se seguía insistiendo en que la orientación de la política económica debía seguir y seguiría una línea encaminada a impulsar un modelo de crecimiento basado en contribuir al aumento de la productividad de la economía española y reforzar el gasto social en algunas de sus áreas. De esta manera, y con el fin de incidir sobre el número de declarantes, se siguieron introduciendo modificaciones normativas sobre este tributo (detalladas a lo largo del presente trabajo), teniendo su reflejo sobre la composición del mismo, esto es, sobre los rendimientos, reducciones, base imponible, minoraciones, base liquidable, tipo de gravamen, cuota íntegra, deducciones y, en definitiva, sobre el resultado de la declaración. Junto a esto, el año 2009, último ejercicio analizado en este trabajo, fue un año en que la economía española atravesaba una situación de recesión, inmersa en un contexto de crisis económica generalizada.

Así, y siguiendo la estructura del impuesto, las principales modificaciones normativas se detallan a continuación.

2.1 Modificaciones en el cálculo de la base imponible

a. Rendimientos del trabajo

Esta nueva legislación mejoró el tratamiento fiscal de los rendimientos del trabajo respecto de otras fuentes de renta, al elevar sustancialmente la reducción vigente en aquel momento por rendimientos del trabajo, especialmente para las rentas más bajas. De esta manera, la reducción aplicable con carácter general por rendimientos del trabajo se estableció para el ejercicio 2008 en 17.531.721 declaraciones (4 % más que en 2007), representando algo más del 90 % del total. Además, el rendimiento neto fue 50.913 millones de euros en su parte general, ascendiendo a los 52.154 millones de euros el importe atribuido al rendimiento de dicha reducción en su totalidad y no sólo en su parte general, la cual se incrementó un 5,5 % en relación a 2007.

Continuando en el tiempo, en el periodo impositivo 2009, la reducción general por rendimientos del trabajo se consignó en 17.455.581 declaraciones, también superior al 90 % del total, y con un importe de rendimiento neto de 50.910 millones de euros, cifra similar a la

¹⁵ Orden EHA/3398/2006, de 26 de octubre, por la que se dictan medidas para el impulso y homogeneización de determinados aspectos en relación a la presentación de declaraciones tributarias por vía telemática, se modifican determinadas normas de presentación de los modelos de declaración 182, 184, 188 y 296, y se modifica el modelo de declaración 187, «Declaración informativa de acciones y participaciones representativas del capital o del patrimonio de las instituciones de inversión colectiva y resumen anual de retenciones e ingresos a cuenta en relación con las rentas o ganancias patrimoniales obtenidas como consecuencia de las transmisiones o reembolsos de esas acciones y participaciones».

consignada en el ejercicio 2008. De forma global, esta deducción alcanzó los 52.181 millones de euros en 2009, cuantía similar a la del ejercicio anterior. Todo ello provocó una minoración de la carga tributaria soportada por estas rentas, mostrándose la evolución de dichos rendimientos en la Tabla 3. Además, se consideró que no constituiría renta en especie para el trabajador la contratación indirecta del servicio de guardería por parte del empleador y, sobre estos mismos rendimientos, la nueva Ley incorporó en el año 2007, pero con efecto en las declaraciones presentadas en 2008, como tales las prestaciones derivadas de los nuevos instrumentos de previsión social, es decir, planes de previsión social empresarial así como seguros de dependencia.

Tabla 3. Rendimientos del trabajo

Ejercicio	Número de liquidaciones*	Rendimiento neto (millones de euros)
2007	16.224.932	298.543,50
2008	16.859.055	325.176,00
2009	16.750.585	324.276,10

Fuente: Elaboración propia. Datos obtenidos de las Memorias de la Administración Tributaria de 2008, 2009 y 2010. * Número de liquidaciones con rendimiento neto mayor que 0.

La Tabla 3 permite observar cómo, del periodo analizado, en el ejercicio 2008 el número de declaraciones con rentas del trabajo se incrementó alrededor de un 4 % en relación al ejercicio anterior (2007), incluyéndose en las 16.859.055 declaraciones, 1.873.704 con retribuciones en especie y 1.585.413 con imputaciones de contribuciones a planes de pensiones, así como cantidades satisfechas por empresarios con la finalidad de hacer frente a compromisos por pensiones de sus trabajadores, cifras un 3,6 % y 7,5 %, respectivamente, superiores a las presentadas en 2007. De esta forma se observa cómo el importe de los rendimientos netos del trabajo, una vez aplicadas las reducciones establecidas en la ley, pasó del ejercicio 2007 a 2008 de 298.543,50 millones de euros a 325.176 millones de euros respectivamente, intensificándose así el fuerte protagonismo de las rentas del trabajo, que pasaron de representar el 75,3 % de la base imponible en 2007 a tener un peso relativo del 78,8 % en 2008.

De esta manera queda plasmado que el IRPF es un tributo en el que los rendimientos del trabajo fueron, durante los años analizados, el principal componente de la base imponible, de tal forma que en 2009 el peso relativo de las declaraciones con rendimientos del trabajo sobre el total de declaraciones presentadas fue del 86,7 %, levemente inferior a 2008 (87 %). Este descenso supuso la ruptura de la tendencia creciente de la importancia relativa que esta fuente de renta venía experimentando hasta el ejercicio 2007, año en que la reforma del impuesto produjo un descenso de los mismos.

Además, sobre estos rendimientos se produjo otra modificación a través de la Ley 2/2008, de 23 de diciembre, de Presupuestos Generales del Estado para el año 2009, la cual elevó para dicho año, en el impuesto sobre la renta, de 10.000 a 11.200 euros el límite excluyente de la obligación de declarar para los contribuyentes que percibieran determinados rendimientos íntegros del trabajo.

b. Rendimientos del capital inmobiliario

En cuanto a los rendimientos del capital inmobiliario, la LIRPF introdujo la posibilidad de aplicar la reducción del 50 % sobre los rendimientos netos del capital inmobiliario procedentes del arrendamiento de inmuebles destinados a viviendas, estableciéndose también una reducción del 100 % en los casos en que el arrendatario de la vivienda fuese un joven de entre 18 y 35 años que tuviese unos rendimientos netos del trabajo o de actividades económi-

cas, en el período impositivo, superiores al Indicador Público de Renta de Efectos Múltiples (IPREM)¹⁶. Los detalles sobre dichos rendimientos, para los años que conforman este estudio, se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4. Rendimientos del capital inmobiliario

Ejercicio	Número de liquidaciones	Rendimiento neto (millones de euros)
2007	1.451.932	7.981,70
2008	1.514.173	8.329,10
2009	1.544.765	7.984,90

Fuente: Elaboración propia. Datos obtenidos de las Memorias de la Administración Tributaria de 2008, 2009 y 2010.

Durante los años que preceden este análisis, el número de declaraciones con rendimientos del capital inmobiliario seguía una trayectoria ascendente pero, incidiendo en el período objeto de estudio (2007-2009), y a través de la Tabla 4, se observa cómo para el ejercicio 2007 el rendimiento neto, que podría esperarse menor tras las modificaciones introducidas a través de reducciones, finalmente aumentó tras la gran acogida de estas medidas, lo cual provocó el afloramiento de rentas por aplicación de estas reducciones. Esto supuso, de igual forma, un aumento de algo más del 4 % respecto al número de declaraciones con esta fuente de renta en el ejercicio 2006 (1.394.223 declaraciones). Además, en 2008, la cifra de declaraciones presentadas aumentó igualmente en torno al 4,3 %, incrementándose también el rendimiento neto por parte de la Administración en dicho año, al contrario de lo sucedido en el ejercicio 2009, donde las declaraciones presentadas siguieron aumentando, esta vez en algo más de 30.500 (2 % más respecto a 2008), pero el rendimiento se contrajo en torno al 4 %, disminución que se explica, esencialmente, por el menor número de arrendadores locales a causa de la adversa situación económica del momento, a lo que se le añade la disminución del precio medio de alquiler como consecuencia de la caída de la demanda.

De esta manera, y tal y como muestra la Tabla 4, si se posiciona el ejercicio 2008 como eje, en el ejercicio inmediatamente posterior (2009) este importe retrocedió a cifras de 2007, es decir, el rendimiento neto fue similar al obtenido en dicho año, estando ya introducida la reducción citada y a pesar de ser mayor el número de declarantes, ya que en 2007, e independientemente del aumento del rendimiento, el peso relativo de las declaraciones se mantuvo al mismo nivel de 2006. Así, el peso de estos rendimientos sobre la base imponible fue reducido para el conjunto de los años analizados, es decir, tanto en el ejercicio 2007, como en 2008 y 2009, los rendimientos del capital inmobiliario representaron un 2 % del importe total de la base imponible declarada por cada ejercicio.

c. Rendimientos de actividades económicas

En lo referente a los rendimientos de actividades económicas, la Ley 36/2006, de 29 de noviembre, de medidas para la prevención del fraude fiscal, implantó la sujeción a un porcentaje de retención del 1 % los rendimientos de actividades económicas que se determinasen por el método de estimación objetiva, hecho que no produjo ninguna alteración sobre el rendimiento neto. Además, desapareció la exigencia, para que la actividad de compraventa de inmuebles fuese económica, de contar con una mínima organización, lo cual incorporó un

¹⁶ Índice empleado en España como referencia para la concesión de ayudas, becas, subvenciones o el subsidio de desempleo, entre otros. Este índice nació en el año 2004 para sustituir al Salario Mínimo Interprofesional como referencia para las mencionadas ayudas.

Cifras IPREM mensual y anual (12 o 14 pagas) en <http://www.iprem.com.es/>.

mayor número de declarantes por este tipo de rendimientos, en detrimento de los de capital inmobiliario.

En el ejercicio 2008, las declaraciones presentadas con rentas de actividades económicas, desarrolladas por empresarios individuales o profesionales, fueron inferiores en un 1 % a las presentadas en 2007, al igual que la participación de estos rendimientos en la base imponible del periodo retrocedió en un 1,1 %, al pasar del 8 al 6,9 % de 2007 a 2008 respectivamente. Esto fue consecuencia del descenso en el número de empresarios individuales y profesionales con la crisis, la caída de las ventas y de la prestación de servicios, así como por la modificación introducida a través de la Disposición adicional única del Real Decreto 1975/2008, la cual elevó, con efectos exclusivos para los ejercicios 2008 y 2009, del 5 al 10 % el porcentaje de reducción sobre el rendimiento neto en concepto de provisiones deducibles y gastos de difícil justificación, aplicable por los contribuyentes titulares de actividades agrícolas, ganaderas y forestales que optasen por determinar su rendimiento a través del método de estimación directa simplificada. Algo parecido sucedió en 2009, ejercicio en el que las declaraciones en las que se consignaron rendimientos de actividades económicas, desarrolladas por empresarios individuales y profesionales, se contrajeron en casi un 3 %, también como consecuencia de la caída del número de empresarios y profesionales por la crisis económica.

Por otro lado, y a los efectos de determinar la exclusión del método de estimación objetiva por índices, signos o módulos, debía considerarse el nivel de ingresos y compras del círculo familiar del contribuyente.

d. Ganancias y pérdidas patrimoniales

Sobre las ganancias y pérdidas patrimoniales, la nueva LIRPF también introdujo modificaciones para el periodo analizado, al establecer un nuevo tratamiento de las transmisiones efectuadas desde el día 20 de enero de 2006, inclusive, de elementos patrimoniales no afectos a actividades económicas adquiridos con anterioridad a 31 de diciembre de 1994¹⁷, con respecto a la legislación anterior. Así, la caída de las transmisiones de determinados elementos patrimoniales como consecuencia de las mayores restricciones en la concesión de préstamos por parte de las entidades crediticias ante la incertidumbre en los mercados financieros, junto con la obtención de ganancias patrimoniales bastante menores en 2008 que en 2007, debido a las importantes pérdidas de valor registradas en los activos financieros y en los inmuebles, supuso un retroceso del 44,5 % del saldo de ganancias y pérdidas patrimoniales en el ejercicio 2008, en relación al importe declarado en 2007, retrocediendo como consecuencia de ello la participación de este componente en la base imponible de 2008 en algo más del 3,5 %, situándose en torno al 4 %. De la misma manera, esta participación del saldo de las ganancias y pérdidas patrimoniales sobre la base imponible del ejercicio 2009 se redujo hasta el 3,2 %, registrándose por tanto, durante los años analizados (2007-2009), fuertes retrocesos en este tipo de rentas como consecuencia de la paralización del mercado inmobiliario y el desfavorable comportamiento del mercado bursátil del momento.

e. Reducciones

Siguiendo la estructura formal del impuesto, y entrando en materia de reducciones, previo a la base imponible del tributo, en 2009, con la finalidad de favorecer la recuperación económica, y más concretamente incentivar la creación de empleo, se introdujo una reducción del 20 % del rendimiento neto de las actividades económicas por mantenimiento o creación de

¹⁷ La Ley 35/2006, de 28 de noviembre de 2006, del IRPF eliminó el régimen de coeficientes de abatimiento para las ganancias patrimoniales procedentes de elementos no afectos adquiridos antes del 31 de diciembre de 1994, regulando un nuevo régimen transitorio aplicable con carácter retroactivo a las ganancias obtenidas por transmisiones realizadas a partir del 20 de enero de 2006.

Para aplicar los coeficientes de abatimiento hay que distinguir entre la parte de la ganancia patrimonial generada con anterioridad al 20 de enero de 2006, que se reduce mediante la aplicación de los coeficientes de abatimiento (25 %, en el caso de acciones que cotizan, 11,11 % en el caso de inmuebles y 14,28 % en el resto de casos) por cada año redondeado por exceso que exceda de dos de antigüedad desde la adquisición hasta el 31 de diciembre de 1996, y la parte generada desde dicha fecha a la que no se aplican los coeficientes.

empleo, en los ejercicios 2009, 2010 y 2011. Esta reducción sobre el rendimiento neto positivo declarado sería de aplicación, con un límite máximo del 50 % de las retribuciones satisfechas por el conjunto de trabajadores en el ejercicio, siempre que la cifra de negocios fuese inferior a 5 millones de euros, la plantilla media fuese inferior a 25 empleados y se mantuviese o crease empleo respecto a la plantilla media de 2008, residiendo en este último requisito el espíritu para la aplicación de la mencionada reducción. De esta manera, el importe de las rentas de actividades económicas en el ejercicio 2009 fue de 24.936 millones de euros, cifra casi un 13 % inferior a la registrada en el periodo impositivo 2008, lo que produjo que la participación de estos rendimientos en la base imponible de 2009 retrocediera en algo menos de un 1 % al pasar de 2008 a 2009 del 6,9 al 6,1 % respectivamente.

f. Base imponible

Estos cambios en la normativa del IRPF, detallados para el conjunto del periodo analizado, así como su repercusión según qué concepto, han incidido en la base imponible (BI) del impuesto, ya que ésta es el equivalente a la cantidad neta de ingresos gravados de una persona sujeta a este impuesto. Así, la evolución de la base imponible total experimentó oscilaciones no muy significativas en lo que al número de liquidaciones presentadas respecta, pero sí en lo que al rendimiento neto se refiere, tal y como se plasma en los Gráficos 1 y 2. En este sentido, las variaciones que se observan entre los ejercicios 2008 y 2009, en lo que al número de liquidaciones se refiere, no presentan excesiva relevancia, al contrario de lo sucedido en 2007 respecto a los ejercicios posteriores, tal y como queda plasmado. De otro lado, y atendiendo al rendimiento neto, éste presenta mayores oscilaciones entre los años que conforman el periodo objeto de análisis.

Gráfico 1

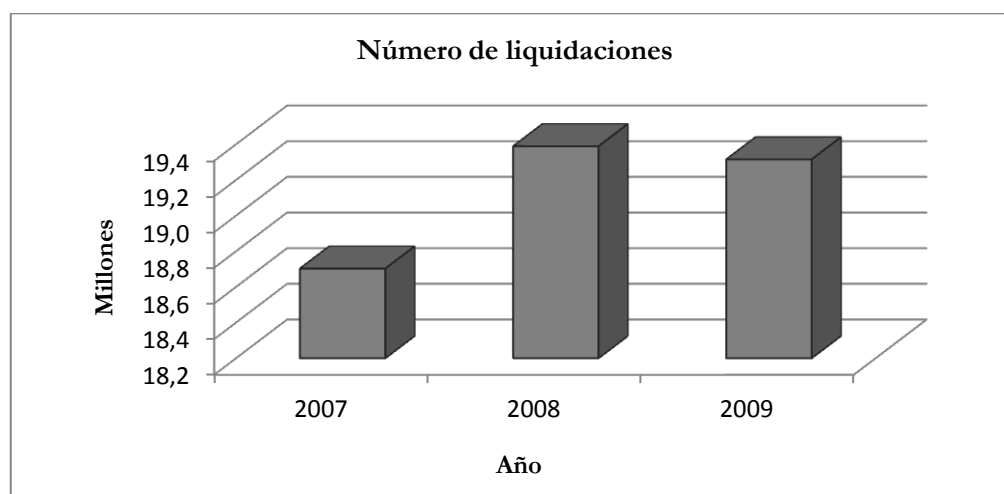
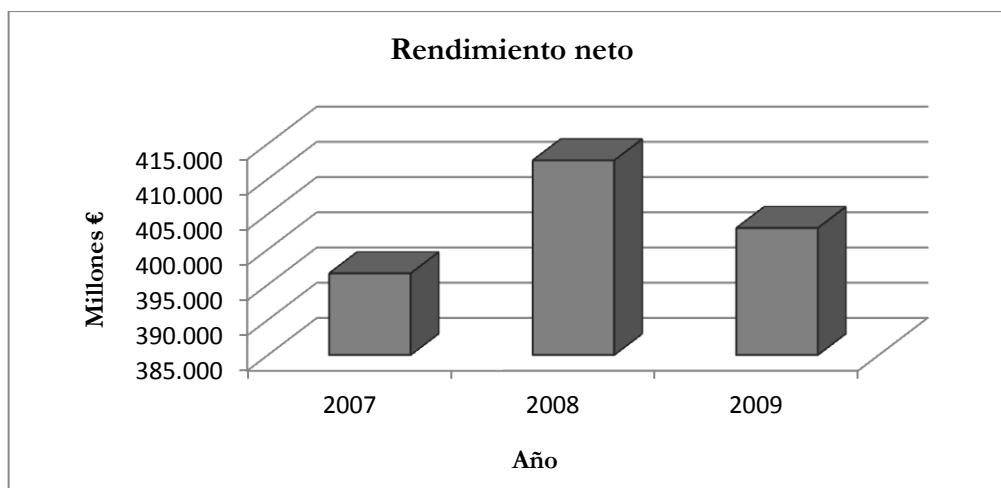


Gráfico 2



Gráficos 1 y 2. Base imponible total en el periodo 2007-2009

Fuente: Elaboración propia. Datos obtenidos de las Memorias de la Administración Tributaria de 2008-2010.

Como se ha ido detallando y se seguirá en lo sucesivo, los periodos impositivos analizados se vieron envueltos por un gran número de modificaciones legislativas, lo cual tuvo reflejo en la evolución de la base imponible de los mismos. De esta manera, y a través del Gráfico 1, se observa cómo el número de liquidaciones presentadas, que en 2007 fue 18.702.875, aumentó casi en 700.000 en 2008, disminuyendo en 2009 respecto a éste último año en torno a 74.000 declarantes. De la misma manera, el Gráfico 2 representa el importe correspondiente al rendimiento neto, mostrando cómo éste alcanzó los 396.579,80 millones de euros en 2007 (desde los 336.601,2 millones de euros de 2006), aumentando un 4 % en el ejercicio 2008 (alcanzando los 412.618,30 millones de euros), y rebajándose a los 403.015,80 millones de euros en 2009. Así, y para el conjunto de los años analizados, el aumento del rendimiento neto en 2009, respecto al primer año analizado (2007), no llegó al 2 % una vez introducidas las medidas ya citadas.

2.2 Liquidación del impuesto

a. Base imponible

Tras la evolución de la base imponible, y en lo que a la base liquidable (BL) se refiere, en el Título IV de la LIRPF, se estableció que las reducciones sobre la base imponible quedarían limitadas a aquellas vinculadas a situaciones de envejecimiento y dependencia, además de la tradicional por pensiones compensatorias. Por ello, y como resultado de minorar la base imponible en las reducciones estipuladas al efecto, se obtuvo en 2007 una base liquidable total por valor de 374.768,9 millones de euros, de los que 325.120,1 (casi un 87 %) correspondieron a la base liquidable general, mientras el resto, poco más del 13 % conformaron la base liquidable del ahorro. Respecto al ejercicio 2008, dicha base liquidable total ascendió a los 391.908 millones de euros, de los que 350.137 eran base liquidable general y 41.771 del ahorro, produciéndose un aumento del 4,6 % del total de la base liquidable respecto al ejercicio 2007. De la misma manera, pero en relación al último de los años que conforman el periodo analizado (2009), la base liquidable general se detrajo hasta los 345.477 millones de euros, al igual que la del ahorro que se posicionó en los 37.186 millones de euros, retrocediendo así la base liquidable total de dicho ejercicio a los 382.663 millones de euros, alrededor de un 2 % más de lo consignado el primero de los años (2007) y el mismo porcentaje pero de retroceso respecto a 2008. Además, cabe destacar que la base liquidable del ejercicio 2007 no puede compararse con la de ejercicios anteriores, ya que su contenido se modificó notablemente tras la reforma del impuesto.

b. Cuota íntegra

De una forma similar, la evolución de la **cuota íntegra total**, y más concretamente del importe de ésta durante los años analizados, queda plasmada en el Gráfico 3.

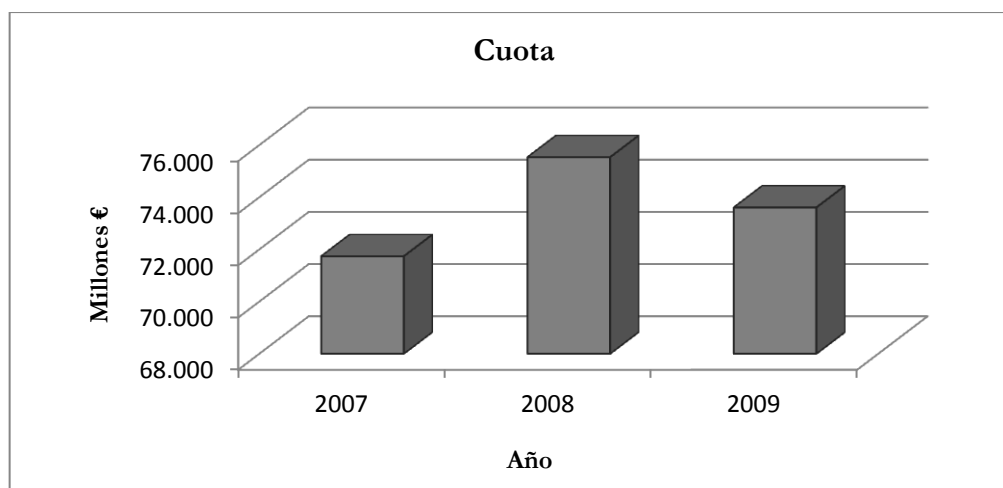


Gráfico 3. Cuota íntegra total en el periodo 2007-2009

Fuente: Elaboración propia. Datos obtenidos de las Memorias de la Administración Tributaria de 2008-2010.

Siguiendo la misma línea, y observando el Gráfico 3, fue el ejercicio 2008 el que mayor variación experimentó a raíz de las medidas introducidas, en relación tanto al ejercicio anterior como al posterior, de manera que la cuota en dicho ejercicio fue de 75.533,30 millones de euros, cifra superior en un 5 % a la obtenida en 2007, y algo más del 2 % superior al importe de 2009, año en el que se puede constatar una importante concentración de la cuota íntegra en las declaraciones que presentaron mayores niveles de base imponible. En este sentido, las medidas que entraron en vigor durante todo el periodo analizado, tuvieron su repercusión tanto en el número de declarantes como en el rendimiento neto y la cuota.

c. Deducciones

Tras la cuota íntegra, son las deducciones las que ocupan el siguiente lugar en la estructura del IRPF. En cuanto a éstas, también se vieron afectadas por diferentes modificaciones normativas, de tal manera que a través de la Ley 35/2007, de 15 de noviembre, se introdujo la deducción por nacimiento o adopción, aplicable sobre la cuota diferencial del IRPF, y la prestación económica de pago único de la Seguridad Social por nacimiento o adopción. Esta norma introdujo una prestación por nacimiento o adopción de hijo, por importe de 2.500 euros anuales por cada hijo nacido o adoptado, para lo cual los beneficiarios debían realizar una actividad por cuenta propia o ajena por la que estuvieran dados de alta en la Seguridad Social en el momento del nacimiento o la adopción, o hubieran percibido en el periodo impositivo anterior rendimientos o ganancias de patrimonio, sujetos a retención o ingresos a cuenta, o rendimientos de actividades económicas por los que se hubieran efectuado los correspondientes pagos fraccionados, que adquiere el carácter de deducción de la cuota diferencial del IRPF, pudiendo percibirse de forma anticipada. Todo ello resultó de aplicación respecto de los nacimientos que se hubieran producido a partir del 1 de julio de 2007, así como de las adopciones que se hubieran constituido a partir de dicha fecha, minorando la cuota diferencial para obtener el resultado de la declaración, y reflejándose la evolución de esta deducción en la Tabla 5.

Tabla 5. Deducción por nacimiento o adopción

Ejercicio	Número de liquidaciones	Deducción (millones de euros)
2007	115.777	294,3
2008	264.188	672,9
2009	259.798	665,3

Fuente: Elaboración propia. Datos obtenidos de las Memorias de la Administración Tributaria de 2008, 2009 y 2010.

Sobre esta deducción, y a través de la Tabla 5, se observa cómo, tras su entrada en vigor en julio de 2007, en dicho ejercicio la cifra de declaraciones, así como el importe deducido, es considerablemente inferior a la de los años posteriores, lo cual se debe a su introducción en mitad del periodo impositivo. Tras este ejercicio, en los sucesivos, su acogimiento fue elevado, de ahí los casi 673 millones de euros de deducción en 2008, primer ejercicio completo tras su implantación. Ahora bien, el análisis económico de la aplicación de esta deducción estaba cuantificado en 1.090 millones de euros para 2008, cantidad que supondría una merma en la recaudación de este impuesto. Pero, según los datos comprobados, alcanzó para dicho año la cifra de 672,9 millones de euros, un 38 % menos de lo esperado y muy por debajo, por tanto, de la cantidad presupuestada. Esto pone de manifiesto que hubo un error en la apreciación o impacto que la aplicación que esta deducción supondría sobre el IRPF de 2008. En el ejercicio 2009, tal deducción experimentó un ligero descenso, tanto en el número de liquidaciones presentadas como en la minoración que supusieron las mismas, de algo más del 1 % en ambos casos.

Siguiendo en el tiempo, el Real Decreto-ley 2/2008, de 21 de abril, de medidas de impulso a la actividad económica, introdujo en la LIRPF, e inicialmente para el ejercicio 2008, una deducción por obtención de rendimientos del trabajo o de actividades económicas, que se restaba de la parte estatal de la cuota líquida del impuesto, de tal manera que los perceptores de rendimientos del trabajo y de actividades económicas pudiesen minorar dicha cuota hasta en 400 euros anuales por contribuyente, siendo por tanto los beneficiarios todos los contribuyentes que obtuviesen rendimientos del trabajo o de actividades económicas en las condiciones previstas en la norma. Esta medida fue desarrollada mediante el Real Decreto 861/2008, de 23 de mayo, norma en la que se establecía el mecanismo para que los efectos económicos de la nueva deducción se anticipasen a este año sin tener que esperar a la presentación de la declaración del IRPF del ejercicio 2008, que se realizaría en el 2009. Además hemos de destacar que esta deducción de 400 euros se aplicaba por declaración y no por contribuyente, de tal manera que no era posible deducir 800 euros en los supuestos de declaraciones conjuntas. Sin considerar las deducciones por maternidad y por nacimiento o adopción, esta nueva deducción por obtención de rendimientos del trabajo o de actividades económicas supuso en 2008 algo más de 5.300 millones de euros, siendo así el principal motivo por el cual, en dicho año, aumentó en un 87,3 % el importe total de deducciones.

De esta manera, esta deducción, junto con la deducción por inversión en vivienda habitual, absorbieron en 2008 el 87,2 % del importe total consignado en concepto de deducciones, ya que en total 16,5 millones de contribuyentes se beneficiaron de esta medida, junto con 1,3 millones de asalariados y pensionistas que dejaron de estar obligados a presentar la declaración del IRPF, suponiendo dicha deducción un ahorro de 6.000 millones de euros para los contribuyentes del IRPF. Posteriormente, en el ejercicio 2009, fue aplicada por casi 13,5 millones de contribuyentes, por un importe total de 5.234 millones de euros (2,4 % menos en relación al ejercicio anterior), observándose también cómo la proporción de declarantes que aplicaban esta deducción se concentraba con mayor intensidad en las declaraciones con bases imponibles medias y bajas, puesto que se trataba de una deducción de cuantía fija que

beneficiaba principalmente a los contribuyentes de menores rentas. Sobre esto, BEATO¹⁸ al analizar las principales medidas adoptadas en el ámbito de la Política Tributaria durante el periodo impositivo 2008, destacó, en el IRPF, esta deducción de 400 euros para la mejora de la renta disponible de las familias así como el incentivo al consumo, resaltando que algunas de las medidas adoptadas, como ésta, tuvieron como efecto una reducción de los impuestos, mientras otras aumentaron la liquidez en el corto plazo.

Además, el establecimiento de esta deducción por obtención de rendimientos del trabajo o de actividades económicas hizo que disminuyese el protagonismo de los incentivos por inversión en la vivienda habitual, hecho que supuso que su peso relativo pasara de 2007 a 2008 del 79 % al casi 44 % respectivamente, reduciéndose así, entre otras, tanto el número de liquidaciones como la minoración procedente de la deducción por inversión en vivienda habitual, tal y como se recoge en la Tabla 6. Aun así, la LIRPF mantuvo el apoyo fiscal a la adquisición de vivienda habitual, respetando el límite de la base de deducción que existía en el momento y el porcentaje de deducción del 15 %.

Tabla 6. Deducción por inversión en vivienda habitual

Ejercicio	Número de liquidaciones	Deducción (millones de euros)
2007	6.634.947	5.217,60
2008	6.637.283	5.418,10
2009	6.285.795	5.040,40

Fuente: Elaboración propia. Datos obtenidos de las Memorias de la Administración Tributaria de 2008, 2009 y 2010.

Observando la Tabla 6, se aprecia cómo, tras la implantación de la nueva deducción por obtención de rendimientos del trabajo o de actividades económicas que tuvo su efecto sobre la deducción por inversión en vivienda habitual, concretamente al provocar una menor aplicación de los incentivos para la adquisición de una vivienda, el importe minorado en concepto de esta última cayó en un 7 % en 2009 en relación al ejercicio anterior. Además, de las distintas modalidades de inversión en la vivienda habitual¹⁹ en 2009 destacó la adquisición, con 4.700 millones de euros y casi 6 millones de declaraciones presentadas. En cuanto a la deducción por alquiler de la vivienda habitual, su análisis económico estaba cuantificado por importe de 350 millones de euros para el ejercicio 2009, siendo el resultado finalmente obtenido de 241,8 millones de euros, un 31 % inferior a lo previsto. Sobre esto, FUENMAYOR y GRANELL²⁰ ya analizaron la deducción por inversión en vivienda habitual como uno de los instrumentos de política económica más importantes derivados del IRPF, realizando una revisión normativa de la legislación fiscal relacionada con dicha vivienda. Todo ello es destacable puesto que, comúnmente, España se había venido caracterizando por la preferencia de las familias hacia una vivienda en propiedad frente a una vivienda en alquiler, lo cual venía motivado, en parte, por la coyuntura económica que venía facilitando la posibilidad de acceder a una vivienda en propiedad, de tal manera que la principal deducción prevista en la normativa reguladora del IRPF era sin duda la relativa a la inversión en vivienda habitual²¹, lo cual se ha ido modificando conforme ha cambiado la situación económica.

¹⁸ BEATO, M.D.: "Las medidas de Política Tributaria del Estado frente a la crisis económica", *Presupuesto y gasto público*, 4/2009, 95-113.

¹⁹ Adquisición; construcción, rehabilitación o ampliación; obras e instalaciones de adecuación por razones de discapacidad y cantidades depositadas en cuentas vivienda.

²⁰ FUENMAYOR, A. Y GRANELL, R.: "Evaluación de la desgravación fiscal a la adquisición de vivienda", *Presupuesto y gasto público*, 59/2010, 157-175.

²¹ ADAME, F., CASTILLO, J. L. Y LÓPEZ, L.: "El sector público y la inversión en vivienda: la deducción por inversión en vivienda habitual en España", *Documentos - Instituto de Estudios Fiscales*, 17/2004, 3-35.

Además, y siguiendo en materia de deducciones, en el periodo impositivo 2008 entró en vigor la deducción por alquiler de la vivienda habitual, la cual supuso una minoración adicional sobre la cuota íntegra estatal del 10 % de las cantidades satisfechas en el ejercicio en concepto de alquiler de la vivienda habitual. Esta deducción podían aplicarla los contribuyentes cuya base imponible fuese inferior a 24.020 euros, siendo la base máxima de la deducción 9.015 euros anuales para los contribuyentes con bases imponibles inferiores a 12.000 euros anuales. Además, quedó establecida en 502.440 declaraciones y supuso una minoración total de 184 millones de euros sobre la cantidad a ingresar.

También es destacable la desaparición de la deducción por doble imposición de dividendos, consecuencia del nuevo tratamiento que éstos tuvieron en el nuevo impuesto, desplomándose así la deducción, tal y como lo recoge la Tabla 7.

Tabla 7. Deducción por doble imposición de dividendos

Ejercicio	Número de liquidaciones	Deducción (millones de euros)
2006	2.351.362	2.331,20
2007	76.114	43
2008	22.277	11,4
2009	11.412	6,1

Fuente: Elaboración propia. Datos obtenidos de las Memorias de la Administración Tributaria de 2007, 2008, 2009 y 2010.

Como se observa en la Tabla 7, mientras en el año previo al periodo objeto de estudio (2006) el importe finalmente deducido por doble imposición de dividendos superaba los 2.300 millones de euros, al desaparecer la norma de integración de dividendos que anteriormente se contenía en la ley y optar por un sistema clásico de relación entre el impuesto societario y el de la renta de las personas físicas, se produce la desaparición de la deducción por doble imposición de dividendos, siendo el remanente de ésta, procedente de los ejercicios 2003 a 2006 de 43 millones de euros, correspondientes a 76.114 declaraciones. De la misma manera, en 2008 la cantidad aplicada correspondió a la deducción pendiente de los ejercicios 2004 a 2006, presentando una minoración de 11,4 millones de euros, consignados a 22.277 declaraciones, disminuyendo ambas cifras a lo largo de 2009, tal y como se aprecia. Este cambio fiscal, junto con el efecto que sobre los beneficios tuvo la crisis, supuso una merma en el rendimiento neto por capital mobiliario en el ejercicio 2008, disminuyendo el número de declaraciones presentadas por tal concepto en torno a un 12 %.

d. Tarifa

En lo que a la tarifa respecta, y dado que el tipo marginal máximo anterior del 45 % superaba en algo más de un 4 % la media de los países de la OCDE (40,7 %), se consideró la necesidad de minorarlo hasta el 43 % en el ejercicio 2008, constituyendo así un incentivo adicional al trabajo personal, además de favorecer a aquellos con rentas más bajas, quienes debían ver simplificada su tributación. La incidencia que esta deflactación de un 2 % en la tarifa tendría sobre los ingresos de 2008, junto con la actualización de los mínimos, se estimó en 1.030 millones de euros. De otro lado, se redujo a cuatro el número de tramos, desapareciendo el tramo que tributaba al 15 %.

Una modificación más vino de la mano del Real Decreto 1975/2008, de 28 de noviembre, sobre medidas urgentes a adoptar en materia económica, fiscal, de empleo y de acceso a la vivienda, el cual introdujo para el periodo impositivo 2009 una disminución del porcentaje de **retención** en 2 puntos, dirigida a los contribuyentes perceptores de rendimientos del trabajo

o actividades económicas que no superasen los 33.007,2 euros anuales y tuviesen derecho a la deducción por inversión en vivienda habitual con financiación ajena, aunque esto no produjese alteración alguna sobre la base imponible o rendimiento neto del tributo. La finalidad de esto no era otra que aumentar la renta disponible de las familias con menores ingresos y con efectos a partir de 1 de enero de 2009, pero realmente ello supuso una inyección de dinero en las rentas de las familias para potenciar el consumo, sin embargo, esto tendría su impacto en la declaración del impuesto, ya que reduciría la cantidad a devolver o aumentaría la cantidad a ingresar, según el caso.

Así, y tal y como se ha ido desarrollando a lo largo de este trabajo, se han producido cambios normativos con un impacto superior al esperado, junto con otros cuya repercusión no ha alcanzado el objetivo fijado. Algunas de las modificaciones legislativas de mayor calado sobre el IRPF, como la deducción por nacimiento o adopción, entre otras, permiten observar cómo la estimación por la que inicialmente se cuantifican dichas medidas para llevar a cabo su implantación, queda lejos del impacto real una vez introducidas y presentadas todas las declaraciones. Además, la difícil estimación económica de muchos de estos cambios hace que haya medidas de las que no sea posible conocer su estimación e impacto posterior.

De la misma manera, es posible contrastar el presupuesto para cada uno de los años analizados, en concepto de IRPF, con la recaudación tributaria líquida del mismo, tal y como se recoge en la Tabla 8, obteniendo así la diferencia entre lo previsto o esperado y el resultado real.

Tabla 8. Presupuesto y recaudación por IRPF en el periodo 2007-2009

Ejercicio	Presupuesto (millones de euros)	Recaudación (millones de euros)	Diferencia (millones de euros)
2007	73.448	84.311	10.863
2008	70.579	71.341	762
2009	77.444	63.857	-13.587

Fuente: Elaboración propia. Datos obtenidos de las Memorias de la Agencia Tributaria de 2007, 2008 y 2009.

Mediante la Tabla 8 se puede apreciar cómo lo presupuestado no siempre se ajusta a lo recaudado, sino que en la mayoría de las ocasiones ambos importes difieren, ya sea en beneficio de la Administración como en detrimento de la misma. Al igual que se comentaba con la interpretación de algunos de los cambios normativos implantados a lo largo del periodo analizado, en la diferencia entre presupuesto y recaudación también tiene su reflejo la crisis, observando cómo en 2008, aunque la recaudación supera lo presupuestado, lo hace en un importe más de 10.000 millones de euros inferior a lo consignado en 2007, seguido del ejercicio 2009 en el que la recaudación no consiguió alcanzar lo presupuestado.

3 Conclusiones

El Legislador posee la facultad de influir sobre los ingresos tributarios del Estado, incidiendo, a través de la introducción de diversas modificaciones normativas en el Impuesto sobre la Renta de las Personas Físicas, sobre el número de contribuyentes o el importe finalmente recaudado. Estos cambios se producen a propuesta del Ejecutivo, en función de sus objetivos económicos, favoreciendo o no a un determinado segmento de contribuyentes, o a un determinado mercado o sector de actividad.

Recopilar las modificaciones más relevantes y analizar la forma en que éstas influyen sobre la recaudación tributaria, el rendimiento neto, las bases o las cuotas, permite mostrar si los distintos cambios normativos que se han aplicado durante el periodo 2007-2009 han tenido un reflejo o un impacto directo sobre la recaudación efectiva de este tributo, al mismo tiempo que admite observar el peso y la evolución de las principales magnitudes que componen el mismo a lo largo de estos años.

Este estudio de los diversos y principales cambios en la legislación asociados a la recaudación tributaria se facilita llevando a cabo un análisis económico del Derecho, puesto que lo que caracteriza este tipo de investigación es la aplicación de la teoría económica a los asuntos jurídicos prácticos, de tal manera que cualquier cuestión jurídica pueda ser analizada a través de este método. La importancia de dicho análisis se fija en que, buscando únicamente objetivos de equidad o de una más igualitaria distribución de la renta, se aprueban normas que finalmente quedan tachadas como ineficientes. Todo ello es importante puesto que, las razones que fundamentan la estructura jurídica van a dar lugar a consecuencias de eficacia y de eficiencia dentro del marco en el cual estas normas fueron creadas o modificadas, de tal manera que existe la posibilidad de cuestionar la oportunidad, así como la idoneidad, de todas estas reformas.

Ahora bien, el Ejecutivo plantea unos objetivos tanto de política económica como fiscal, buscando alcanzar unos fines que puedan tener unos efectos sobre los ingresos tributarios y, por ende, sobre la recaudación. No obstante, hay que tener en cuenta que, al margen de los recursos que proporcionan los tributos a los poderes públicos, éstos pueden desempeñar una política de gasto encaminada a la redistribución de la renta y a la consecución de valores y principios constitucionales, hecho que se aleja de la finalidad de los tributos, basada en la captación de recursos para las arcas públicas. De esta manera, surge lo que se conoce como la extrafiscalidad de los tributos, es decir, utilizar un impuesto con un objetivo distinto al puramente recaudatorio, pero con una finalidad propia para la consecución de fines tanto de política económica, como cultural o social.

En este sentido, y tal y como lo defiende CASAS²², la finalidad del beneficio tributario se integra por un tratamiento preferencial, o por un incentivo, encaminado a estimular la realización de determinados valores constitucionales protegidos, de tal forma que, éstos últimos, caracterizados por su naturaleza extrafiscal, constituyan la razón de ser de la creación de beneficios fiscales, habilitando así esa desviación excepcional respecto a los fines característicos y propios del tributo.

Así, y realizado este estudio, es posible apreciar cómo el Ejecutivo no siempre obtiene el resultado deseado, incluso se observa cómo la finalidad con la que se introducen algunas medidas se aleja por completo del objetivo que se pretendía cubrir. Este es el caso, entre otros, de la deducción por nacimiento o adopción, introducida a través de la Ley 35/2007²³ y aplicable sobre la cuota diferencial del IRPF. El análisis económico de la aplicación de esta deducción se cuantificó en 1.090 millones de euros para el ejercicio 2008, importe que supondría una merma en la recaudación de este tributo, pero, en función de los datos, éste importe alcanzó para dicho año 672,9 millones de euros, cifra un 38 % inferior a lo previsto y muy por debajo de la cantidad presupuestada, poniéndose así de manifiesto el error que hubo en la apreciación del impacto que la aplicación de esta deducción supondría sobre el IRPF. De igual forma, aunque en menor medida, se produjo un desajuste sobre la deducción por alquiler de la vivienda habitual, cuya cuantificación inicial se estimó en 350 millones de euros para el ejercicio 2009, mientras que el resultado finalmente obtenido fue un 31 % inferior a lo previsto, es decir, 241,8 millones de euros.

²² CASAS, D.: "Aproximación a la Categoría Jurídico-Económica del Beneficio Tributario". En la obra *Estudios sobre los beneficios en el sistema tributario español*, Edit. Marcial Pons, 2008, 36-39.

²³ Ley 35/2007, de 15 de noviembre, por la que se establece la deducción por nacimiento o adopción en el Impuesto sobre la Renta de las Personas Físicas y la prestación económica de pago único de la Seguridad Social por nacimiento o adopción.

De esta manera es posible mostrar cómo las modificaciones normativas en su conjunto, así como el impacto que algunas de estas medidas tienen sobre otros componentes del impuesto, han influido sobre los ingresos tributarios procedentes del IRPF. Ello conlleva una repercusión sobre los rendimientos y minoraciones y éstos sobre las bases que, consecuentemente, afectan a la cuota y, por tanto, y al incidir de la misma manera sobre las deducciones, tiene su repercusión sobre el resultado final de la declaración. Un claro ejemplo de ello es el caso de la deducción por obtención de rendimientos del trabajo o de actividades económicas y su efecto sobre la deducción por inversión en vivienda habitual, unido al contexto de crisis económica en que se encontraba el país durante el periodo analizado.

En definitiva, muchos de los cambios que se producen en la legislación vigente, al menos en lo referente a la nueva LIRPF²⁴, introducida en 2006 y vigente desde 1 de enero de 2007, no consiguen aquello para lo que se implantaron, de la misma manera que se produce un desequilibrio entre lo presupuestado y lo que finalmente se recauda. No obstante, esto no sólo ocurre en el caso de la normativa vigente y para los años 2007, 2008 y 2009, sino que en la legislación anterior²⁵ ya se iniciaba este camino marcado por el desajuste.

Además, con carácter general nos encontramos ante desviaciones presupuestarias en los ingresos tributarios, más concretamente en los ingresos procedentes del Impuesto sobre la Renta, observando que, en la mayoría de las ocasiones, lo presupuestado difiere de lo recaudado, ya sea en beneficio de la Administración o en detrimento de la misma.

Así, y a través de este trabajo, es posible apreciar de una forma más ordenada y clara las principales novedades y modificaciones introducidas en la legislación correspondiente al Impuesto sobre la Renta, así como los cambios normativos de mayor trascendencia que se han ido introduciendo durante estos años sobre este tributo. Todo ello ha permitido reflejar cómo el legislador no siempre acierta con la introducción o modificación de determinadas normas, sino que son muchas las ocasiones en las que se produce un error en la estimación o cuantificación del resultado o impacto que provocarán las mismas.

4 Referencias

1. ADAME, F.; CASTILLO, J.I.; LÓPEZ, L.: "El sector público y la inversión en vivienda: la deducción por inversión en vivienda habitual en España". *Documentos - Instituto de Estudios Fiscales*, 17/2004, 3-35.
2. ALFARO, J.: "Los juristas -españoles- y el análisis económico del derecho", *Indret: Revista para el Análisis del Derecho*, 1/2007, 417-429.
3. BEATO, M.D.: "Las medidas de Política Tributaria del Estado frente a la crisis económica". *Presupuesto y gasto público*, 54/2009, 95-113.
4. CABRILLO, F. Y ALBERT, R.: "El análisis económico del derecho en la encrucijada", *Ekonomiaz: Revista vasca de economía*, 77/2011, 200-221 (Ejemplar dedicado a: La nueva economía institucional).
5. CASAS, D.: "Aproximación a la Categoría Jurídico-Económica del Beneficio Tributario". En la obra *Estudios sobre los beneficios en el sistema tributario español*, Edit.

²⁴ Ley 35/2006, de 28 de noviembre, del Impuesto sobre la Renta de las Personas Físicas y de modificación parcial de las leyes de los Impuestos sobre Sociedades, sobre la Renta de no Residentes y sobre el Patrimonio.

²⁵ Ley 40/1998, de 9 de diciembre, del Impuesto sobre la Renta de las Personas Físicas y otras Normas Tributarias y Ley 46/2002, de 18 de diciembre, de reforma parcial del Impuesto sobre la Renta de las Personas Físicas y por la que se modifican las Leyes de los Impuestos sobre Sociedades y sobre la Renta de no Residentes.

Marcial Pons 2008, 36-39.

6. COOTER, R. Y ULEN, T.: *Derecho y economía*, Edit. Fondo de Cultura Económica, 2ª edición en español, 2008.
7. DÍAZ DE SERRALDE, S.; GARCIMARTÍN, C.; RUÍZ-HUERTA, J. (2011): "Progresividad y redistribución en reformas fiscales. Los efectos nivel y distancia: una aplicación al IRPF". *Revista de economía aplicada*, Vol. 19, 57, 97-115.
8. FUENMAYOR, A.; GRANELL, R.: "Evaluación de la desgravación fiscal a la adquisición de vivienda". *Presupuesto y gasto público*, 59/2010, 157-175.
9. GALI, J.; PEROTTI, R.: "Fiscal Policy and Monetary Integration in Europe". *NBER*, 9773/2003, 9-12.
10. GUTIÉRREZ, J. A.: "Análisis económico del derecho y del derecho económico bajo revisión empresarial", *Opinión Jurídica: Publicación de la Facultad de Derecho de la Universidad de Medellín*, Vol. 11, 21/2012, 117-134.
11. KAPLOW, L. Y SHAVELL, S.: "Economic Analysis of Law", *Handbook of Public Economics*, Vol. 3, Elsevier, 1661-1784.
12. MARTÍN, F.: "La economía de los Ingresos Tributarios. Un manual de estimaciones tributarias". *CEPAL*, Serie Manuales, 62/2009, 16-17.
13. RAYMOND, J.L.; VALDÉS, T.; ARGIMON, I.: "Evolución de la recaudación en el IRPF: determinación de las causas y estimación de efectos". *Investigaciones económicas*, Vol. 13, 1/1989, 15-43.

CO-31 Spin-off

Mulayali Salima
Rue Hassan II Tétuan
Universidad Abdelmalek Essaadi
00212663306477
salima.mulayali@gmail.com
MARRUECOS

Resumen

En un entorno de bajo crecimiento y el porcentaje de desempleo económico muy elevado, el gobierno marroquí está severamente recordado por las urnas a un requisito de desempeño en su política de empleo.

El desarrollo es cada vez más rápido; la realidad económica y social empuja a las empresas y las corporaciones para buscar herramientas de gestión sin cesar a ser más eficiente.

Estas mutaciones conducen a nuevas formas de creaciones de empresas y las relaciones entre empleadores y empleados, en particular, el empleo contractual, el autoempleo, las microempresas y el spin-off. El impulso empresarial a continuación, es un medio para impulsar el mercado y por lo tanto las empresas. La dinámica del concepto de spin-off es consistente con la tendencia actual, que implica una mayor fragmentación de la organización del trabajo.

Además, muchos de los empleados de las empresas quieren iniciar una actividad empresarial cumple con uno de sus "pasiones". Ellos trabajaron en una empresa durante varios años, se han adquirido experiencia y conocimientos que les permitan entender cómo manejar un proyecto, el desarrollo de un producto. También pueden haber desarrollado un interés en un tema relacionado que les motiva. Ellos siguen haciendo su trabajo, pero el corazón no está más allí.

El spin off, en realidad es una gestión de reflexionar y promover la iniciativa empresarial, permite a las empresas adaptarse a bajo costo y constantes cambios en el medio ambiente.

Es una forma de mantener y cultivar el espíritu empresarial. Además, podemos entender que estas nuevas empresas creadas por el uso de los recursos y el conocimiento de la empresa, tendrán una mejor oportunidad de éxito y la supervivencia a lo largo plazo.

Sin embargo, es un fenómeno que no ha sido ampliamente estudiado es el de los costos sociales relacionados con la creación de nuevas empresas.

El spin off no garantiza el éxito absoluto de cada proyecto es probablemente una de las mejores maneras de mejorar las posibilidades de éxito y reducir los costos sociales relacionados con la creación empresarial.

El spin off no puede resolver todos los problemas relacionados con la creación empresarial, pero puede mejorar las condiciones y los resultados para el beneficio de todos.

Este es sin duda uno de los medios más eficaces y menos costoso para dar para construir una sociedad empresarial.

Palabras Clave

Spin-off; Empresa; iniciativa empresarial; transferencia de tecnología; cultivar el espíritu empresarial; spin-off tecnológico.

1 Introducción.

En el contexto económico y social actual marcado por la érosion de las normas de seguridad en el empleo, la proliferación de la reestructuración y la búsqueda de la flexibilidad, que se asocian con un aumento de los descansos y turnos, voluntarios o forzosos, en trayectorias profesionales.

Las empresas de hoy están llamadas a cambiar sus normas y prestar especial atención a los jóvenes si desean retener a los empleados comprometidos (Marbot, 2007). La flexibilidad se ha convertido en un gran desafío para la competitividad de las empresas, los recursos humanos son afectados directamente por la necesidad de flexibilidad (Everaere, 2012).

En un entorno de bajo crecimiento del desempleo económico, el gobierno marroquí está muy seriamente recordado por las urnas a un requisito de rendimiento en su política de empleo.

Entre los medios de acción considerado; la creación empresarial es una prioridad en especial para las pequeñas y muy pequeñas empresas; también están creando más puestos de trabajo si la importancia económica y social de estas pequeñas estructuras están bien establecidos, es imprescindible para entender mejor estas entidades y actuar a favor de su génesis, su desarrollo y la renovación.

El desarrollo es cada vez más rápido; la realidad económica y social empuja a las empresas y corporaciones para buscar herramientas de gestión sin parar para ser más eficiente. De este modo, tratan d'adaptarse a las nuevas condiciones impuestas por el medio-ambiente.

Deseosos de promover un mayor nivel de iniciativa, una flexibilidad más amplia, mientras que el mantenimiento de un alto grado de convergencia, algunas empresas optan por la reestructuración en unidades más pequeñas.

Nos estamos moviendo hacia conceptos de las redes corporativas, donde cada parte de una asamblea compuesta por empresas de diversos tamaños, pero en evolución alrededor de ejes integradores.

Estas mutaciones conducen a nuevas formas de asociaciones y las relaciones entre empleadores y empleados, en particular, el empleo contractual, el autoempleo, las microempresas y las spin-off. El impulso empresarial a continuación, es un medio para impulsar el mercado y por lo tanto las empresas. La dinámica del concepto de spin-off es consistente con la tendencia actual, que implica una mayor fragmentación de la organización del trabajo.

Además, muchos de los empleados de las empresas quieren iniciar una actividad empresarial cumple con uno de sus "pasiones". Ellos trabajaron en una empresa durante varios años, se han adquirido experiencia y conocimientos que les permitan entender cómo manejar un proyecto, el desarrollo de un producto. También pueden haber desarrollado un interés en un tema relacionado que les motiva. Ellos siguen haciendo su trabajo, pero el corazón no está más allí. Ellos quieren organizar su vida laboral en torno a algo que les gusta. No es de extrañar que más del 95 % de las spin- off registrados en Francia, en las grandes empresas, se dio cuenta de las actividades no relacionadas con las de un spin-off.

La creciente complejidad de las organizaciones y su entorno, por un lado, la necesidad de la formación permanente y las necesidades de autorrealización que requiere la detección de la actividad profesional por el propio pueblo, por el otro lado, abre la puerta a métodos de gestión, como spin-off . Este enfoque proporciona una flexibilidad y una mayor coherencia en la relación entre las empresas, los trabajadores y otros actores sociales.

El spin-off , que es en realidad una gestión reflexionar y promover la iniciativa empresarial, permite a las empresas adaptarse a bajo costo rápidos y constantes cambios en el medio-ambiente.

Es una forma de mantener y cultivar el espíritu empresarial. Además, podemos entender que estas nuevas empresas creadas mediante el uso de los recursos y el conocimiento de la salida en spin-off de la empresa, tienen una mejor oportunidad de éxito y la supervivencia a largo plazo.

Una sociedad empresarial se expresa en las actitudes y el comportamiento empresarial.

Esta expresión empresarial se mide esencialmente por la conquista de nuevos mercados, la innovación en las formas, la creación de nuevos productos y nuevos negocios. Sin embargo, un fenómeno que no ha sido ampliamente estudiado es el de los costos sociales relacionados con la creación de nuevas empresas: las organizaciones de apoyo, sino también los costos de las fallas y medios éxitos de estas empresas de nueva creación.

El spin-off sin garantizar el éxito absoluto de cada proyecto es probablemente una de las mejores maneras de mejorar las posibilidades de éxito y reducir los costos sociales relacionados con el espíritu empresarial. Por otra parte, la economía del conocimiento favorece de manera especial, los centros urbanos con centros de investigación y universidades, abandonando así las zonas remotas cuyas economías dependen más de los recursos naturales.

El spin-off no puede resolver todos los problemas relacionados con el espíritu empresarial, pero puede mejorar las condiciones y los resultados para el beneficio de todos. Este es sin duda uno de los medios más eficaces y menos costosas para dar para construir una sociedad empresarial.

2 Definiciones y enfoque metodológico del spin-off :

El sentido del spin-off cubre un amplio espectro de prácticas empresariales y las diferentes definiciones se citan.

Las prácticas varían de giro y puede tomar diferentes formas, dependiendo de las motivaciones estratégicas del spin-off entidad, las actividades relacionadas con la operación de spin-off, la implicación y participación en el riesgo con el giro entidad.

Para delimitar el alcance de este estudio, que se basó en las dos definiciones siguientes:

Definición 1: El spin-off como un conjunto de comportamientos y medidas condicionales de una organización, llamado spin-off trae un contratista, ya sea por parte del personal durante la creación del proyecto o reanudación de la actividad económica. Estas medidas pueden adoptar diversas formas, tales como el patrocinio, apoyo financiero, asistencia técnica, transferencia de tecnología y actividades.

Esta primera definición centraliza el proceso de vuelta en las motivaciones y la estrategia de la salida en spin-off entidad, que buscan a través de spin-off de reforzar su competitividad y / o afirmar su responsabilidad social. En ambos casos, el spin-off entidad es el vector de la dinámica empresarial. Lo cual, como veremos más adelante, se aplica también a muchos casos de espín convencional.

También puede confiar en una definición complementaria, en el que el promotor es el principal iniciador e incluso empresarial vector dinámico. Se trata básicamente de los emprendedores que tienen una gran experiencia en su campo y poseen el capital de conocimientos que les permita desarrollar con entidades económicas existentes.

Definición 2: pulular también se puede definir como un acto de creación de una nueva entidad económica de una entidad existente, en contraposición a la creación.

La creación o el desarrollo de una nueva actividad económica y es parte de una capitalización o la recuperación de los conocimientos existentes, estén o no protegidos por derechos de propiedad intelectual, y están sujetas a una transacción entre entidad y el giro entidad spin-off, con el propósito de obtener una ventaja comercial.

Comúnmente distingue tres formas de giro empresarial:

- El spin-off frío. Emanan principalmente por iniciativa de empleados de mama empresas que persiguen una política de premiar la movilidad al aire libre. Este suele ser el caso de algunos grandes grupos.
- El spin-off caliente o social. En este caso, el spin-off empresa implementa un esquema altamente incentivo para la resolución de un despido o reestructuración de plomo con el ejemplo. Esta es la forma más común del spin-off.
- Spin-off Estratégico. Se basa en la voluntad de triunfar y una verdadera cohesión de las partes. Su ejecución se lleva a cabo como parte de una política para optimizar una cartera de patentes, realizar una transferencia de tecnología o de conocimientos técnicos, por ejemplo.

Se puede decir fácilmente que varios diseños spin-off conviven y se relacionan con el entorno económico, así como las regulaciones que afectan significativamente a las estrategias que pululan.

Esto explica la diversidad de las situaciones observadas.

En el sentido más amplio , pululando las siguientes observaciones :

- Spin-off puede ser el resultado de un spin-off entidad agente interno o externo ;
- No hay negocio necesariamente local o de proximidad geográfica entre el spin-off y propagación;
- Por contra , hay siempre un contrato formal entre la entidad y la propagación spin-off , en parte, contra un soporte o una contribución de el spin-off entidad durante la fase de arranque , que puede adoptar distintas formas (financiación, acuerdos comerciales ,etc ...) ..

Ejemplos del mundo muestran que la práctica de la rotación se ha vuelto más profesional, y se extendió con diferentes nombres en las economías avanzadas, ofreciendo en muchas formas de estrategias de desarrollo empresarial, tanto en el organismo fuente (empresa, institución, organización) y los empresarios.

El spin-off y contribuye a la diversificación económica, la transferencia de conocimientos, la conversión del empleo y el desarrollo social.

Para evaluar el estado del arte de la vuelta, nos centramos en el análisis sistémico que considera el giro como un proceso que implica una serie de actividades y actores interdependientes que trabajan para el mismo propósito, la creación una nueva entidad económica en un entorno determinado. Este enfoque se basa en el modelado del proceso de escisión, a partir del marco normativo, a continuación, su puesta en perspectiva con respecto a las prácticas observadas en el campo, con una evaluación de desempeño y la identificación de las limitaciones impuestas por el medio ambiente

2.1 tipos del spin-off:

El spin-off es en última instancia un proceso particular de creación de empresas. Y al igual que cualquier proceso de creación de empresas , se implementa una combinación de los siguientes temas:

- 1) El acceso a los conocimientos
- 2) Acceso al mercado
- 3) Acceso a la financiación

A través del análisis de las cuestiones a lo largo de la cadena de valor , y teniendo en cuenta el acceso a la financiación garantizada una vez que las dos primeras dimensiones de acceso

al conocimiento y de mercado de garantías , en nuestra investigación que simulen diferentes opciones para ser una transacción tácito o implícito entre una entidad y un spin-off de centrífugo entidad.

Así el spin-off es una práctica proactiva para una empresa para ayudar o alentar a los empleados a crear sus propias empresas a través de todas las formas de apoyo y asistencia. Por lo tanto, tiene una doble lógica de la estrategia de desarrollo de la flexibilidad de la organización y la estimulación

Del espíritu empresarial latente.

Las consecuencias de esta práctica son la creación de estructuras pequeñas y muy pequeñas, sobre una organización de tamaño significativo , y bien establecidos en el panorama económico local , que de este modo beneficiarse de las muchas ventajas asociadas a las pequeñas empresas. El resultado de esta operación, la revitalización del entorno local y un gran aumento de la competitividad debido a la sinergia que se establece entre las diferentes entidades que constituyen el " spin-off».

Esta investigación propone que se familiaricen con este concepto innovador, haciendo hincapié en el importante papel que puede jugar la vuelta en la gestión política y la creación de empleo que será implementado para tratar de hacer frente a los retos y problemas de desarrollo socio -económico.

Vamos a proponer un análisis esencialmente comparativo de las formas existentes de organización, buscamos entender el interés de las grandes empresas y las PME a " mantenerse unidos " y desarrollar sus activos de forma conjunta.

Luego tratamos de diseñar el giro como una práctica estratégica de transición, que establece un vínculo entre las grandes empresas pierden terreno, las estructuras pequeñas y con frecuencia frágiles en la fase inicial. Una mejor comprensión del proceso emprendedor nos ayudará a demostrar que el espín es una oportunidad real y efectiva de los actores involucrados. Finalmente, el último paso es analizar las relaciones que se establecen después de que el proceso de creación, se abre bastante común en el desarrollo de las relaciones de asociación pronunciada, y la creación de un punto de la red prolífico a partir de malla económico local particularmente eficiente.

2.2 El proceso de creación de spin-off :

El concepto del spin-off:

Muchos medios se utilizan para estimular el espíritu empresarial en las grandes organizaciones. El spin-off es, pues, parte de las técnicas contemporáneas de gestión empresarial que permiten a los grandes grupos para adaptarse con mayor eficacia a las crecientes exigencias del entorno socio- económico.

Establecer el concepto del spin-off:

Spin-off práctica desarrollada en Francia en la década de 1980, acercándose más o menos eficaz concepto de spin- off anglosajón. Estas nuevas empresas de tamaño humano que desafían el dominio de entidades grandes y van en contra de todas las teorías de organización y gestión propuestos anteriormente (Roberts y Malone; 1996).

Se dice en general que una empresa genera spin-off cuando una nueva empresa (independiente y más pequeña), que tiene como objetivo desarrollar una idea, una actividad cuya novedad sería difícil de usar en el hogar madre, o ir en contra de la estrategia (Sire, 1988).

Pocos investigadores han tratado de definir el giro (Merlant 1984 ; Bruyat , 1987 Sire , 1988), pero , en cualquier caso, no se realizó un debate colectivo . Además, en la actualidad, el término de spin-off todavía tiene algo de ambigüedad.

De hecho, el apoyo a la creación (o recuperación) de los empleados se manifiesta en primer lugar en el difícil contexto de la reestructuración, antes de ser asociado a la gestión estratégica y la gestión de recursos humanos.

Un modelo de proceso específico de la iniciativa empresarial:

Empresas y todos los actores involucrados en un proceso de escisión deben conocer los términos y las implicaciones.

El proceso es relativamente complejo, ya que no se limite a la simple creación de una entidad por uno de los empleados de la empresa, sino que también incorpora diversas etapas de la acción de la Propia creación.

Por lo tanto, el proceso de creación se divide en cuatro fases distintas, que son todos los factores clave en la ejecución y la eficiencia del proceso global:

En primer lugar ;en el proceso, dos fases ocurren simultáneamente dentro de la empresa:

- El período de incubación permite que la idea "nazca", gracias a la reflexión conjunta de los actores involucrados. Mientras que la empresa se esforzará para facilitar el acceso por parte del contratista de los recursos que necesita, adquirirá las destrezas y habilidades que no puede controlar, a través de un proceso aprendizaje informal en términos generales;

- La fase de oportunidades de exploración debería ayudar a potenciales empresarios a pensar en las oportunidades disponibles para ellos en el mercado, y que son parte de la continuidad de su negocio actual.

En el centro del proceso, la fase de reflexión y maduración del proyecto debería dar lugar a la creación real (legal) de la nueva entidad.

Se permite la propagación de la presentación de un proyecto viable, que ha sido el análisis, la crítica y cualquier cambio de un Comité de giro interno.

La empresa debe continuar su participación acompañando y apoyando y ofrecer la oportunidad de girar a la empresa a crecer en condiciones óptimas, dentro de una sociedad bien entendido por ambos actores.

3 Resultados.

<i>Spin-off</i>	<i>Spin-in</i>
<p>Un investigador de la organización spin-off creando una empresa de tecnología desarrollado dentro de la organización spin-off.</p> <p>Esta es la forma más común.</p>	<p>Una empresa creada por un investigador externo a la organización spin-off utilizando una tecnología desarrollada por ce- lle-ci.</p> <p>Ambas situaciones pueden ilustrar:</p>

	El uso de un tecnología transferido por la organización spin-off.	El uso de una tecnología mixta, es decir desarrollado al exterior sino también la combinación de una tecnología de la organización spin-off.
--	---	--

4 Finalidad de la aplicación de este enfoque requiere algunas instrucciones básicas:

- El spin-off puede ser el resultado de un solo empleado o grupo d'empleados;
- la proximidad geográfica no es necesaria;
- es necesariamente una ayuda de la enjambrazón empresa,
- La ayuda se puede tomar muchas formas diferentes;
- fundamentos jurídicos y institucionales destacan la necesidad de que la reincorporación del empleado-creador en el fracaso de su negocio.

5 Conclusión:

El spin-off es un mecanismo entre otros. Debemos estar seguros de que otras personas no han caminando antes de embarcarse en la creación de una empresa. Las instituciones deben hacer preguntas: ¿qué El spin-off es la mejor solución? y según qué criterios? que otras soluciones hay?

Conceptualización que propusimos permite arrojar nueva luz sobre el spin-off. Además del hecho de que este es un dispositivo empresarial (en el sentido de que promueve la creación o adquisición de empresas) , pululando por nosotros en el corazón de los problemas actuales empresa , porque refleja , así como otros dispositivos , las prioridades de los grupos principales. Todas las empresas no tienen las mismas expectativas vis -à-vis el giro y nos identifica dos tres políticas : una política del desarrollo sostenible y la responsabilidad social, la política y la política de innovación salarial.

Esta visión del spin-off es nuestro punto de partida para el análisis de los dispositivos fomentar el espíritu empresarial en las grandes empresas desde un ángulo diferente al que resultado (empresa creada captura oportunidad, proceso impulsado). Adoptar el punto de vista la empresa nos ha permitido considerar esta práctica de manera más amplia, en busca de territorio; Empleado de la empresa; innovación; administración; recursos humano; responsabilidad social.

6 Referencias:

- État de l'art de l'essaimage en Tunisie & son impact sur la dynamique de création d'entreprises réalisée par : WIKI START UP.
- Belley, A. ; L. Dussault et J. Lorrain (1995), « L'essaimage : une stratégie délibérée de développement économique », Colloque de la Fondation de l'entrepreneurship, Proceedings, Québec, 5 p.
- Bertherat, J. (1989), L'essaimage : levier de la création d'entreprise, La Documentation Française, Paris.
- Daval Hervé, Le processus entrepreneurial d'essaimage, Thèse pour le Doctorat en Sciences de Gestion, Grenoble

- Laviolette Eric Michael, "L'essaimage en PME : proposition d'un cadre d'analyse", Revue de l'Entrepreneuriat, 4(1), 2005
- Bruyat, C. (1987), « Maîtriser l'essaimage peut être une condition importante de l'efficacité future de l'entreprise. Pour cela, il faut concilier les logiques de l'essaimeur et celles de l'essaimé », VIII journées nationales des IAE, Poitiers, 18-20 novembre, 233-243.
- Congrès International Francophone sur la PME 22, 23 et 24 octobre 1998 Metz et Nancy.
- Mezhoudi L. (2001), "L'essaimage d'entreprises et l'appropriation de la technologie" thèse de doctorat sous la direction de Zghal R., ISG de Tunis.
- http://www.editions_eyrolles.com/Livre/9782708123915/l'essaimage-strategique
- <http://www.entrepreneuraquitaine.fr/print/592>
- <http://www.entrepreneuraquitaine.fr/fiches/essaimage-definition>
- <http://www.steg.com.tn/fr/essaimage/developpement.html>
- http://www.steg.com.tn/fr/essaimage/Rapport_d_activite_2012.pdf.

CO-37 Study of Transport and Injection of Charge in Organic Devices

Pilar López Varo, Departamento de Electrónica y Tecnología de Computadores, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Spain, email: pilarlopez@ugr.es

Juan Antonio Jiménez Tejada, Departamento de Electrónica y Tecnología de Computadores, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Spain, email: tejada@ugr.es

Abstract

Organic materials are easy to manufacture under ambient and non-toxic conditions. Organic devices can be printed and placed over any surface due to their flexibility. These advantages create new market opportunities. These devices also show disadvantages that degrade their performance and must be solved in order to make them competitive: low charge-carrier mobility, contact effects and instabilities caused by trapping and de-trapping of charge in the organic devices.

Theoretical studies are still necessary to interpret the electrical current in a device with these problems. In this regard, we have studied the charge transport in organic materials and the injection of charge in metal-organic contacts. In the past, these mechanisms have been treated and modeled separately. In this work, we propose a unified model that links both mechanisms. In addition, we propose a characterization technique to determine the distribution of physical variables along the organic material, such as the accurate distribution of free charges and traps.

We solve the transport equations in a metal-organic-metal structure, including a proper boundary condition for the free charge density at the metal-organic interface. We have checked the model in experimental situations where the current in the device is dominated by injection, transport or a combination of both. We have determined a correlation between the free charge density at the interface with the current density, the organic material, the energy barrier and temperature. The model can be used in circuit simulation. Its advantages are the low time consumption and small number of parameters.

Keywords

Organic diodes, Charge transport, Device modeling

1 Introduction

During the last decades there has been an enormous interest in the development of electronic devices based on polymers and organic films (Kim et al., 2011). The main advantages of the organic materials, that make them a highly promising technology, are the flexibility, easy processing, low fabrication cost, large area and low weight. Although significant progress has been made there are some problems to be solve, such as the degradation of organic devices under ambient conditions, the low value of the charge-carrier mobility (Laubender et al., 2000) or the theoretical description of the injection and transport of charge.

The injection of charge depends on different factors such as the height of the injection barrier, the applied electric field, the temperature or chemical reactions leading to interface dipoles. Depending on the energy barrier height, the current through the device can be controlled by the injection or the transport mechanisms. Devices operating under such limitations are said to work in the injection-limited current (ILC) regime (Agrawal et al., 2008) or the space-charge-limited current (SCLC) regime, respectively. There are simple specific models for each mechanism and complex models that include both (Arkhipov et al., 2003).

Despite these efforts, transitions in current density-voltage (j - V) curves from SCLC to ILC are not well explained. Even the transition from the ohmic regimes, observed at low voltages, towards SCLC and towards ILC are not understood completely. Transitions from ILC to SCLC are sometimes interpreted by a variation of the charge density at the metal-organic interface from a finite value in ILC to an infinite value in SCLC (Arkhipov et al., 2003). However, a high value for the charge density is not in agreement with the ohmic behavior seen at low voltages in both ILC and SCLC regimes (López Varo et al., 2012), where a low value for the free

charge density is expected. In this regard, we propose to use a realistic finite value for the charge density at the interface in order to characterize these transitions.

2 Materials: Organic Semiconductors.

Solid-state physics can be divided according to three different classes of molecules, conductors, insulators and semiconductors. Insulators have a large band gap that prevents electrons from the occupied valence band transferring to the outer conduction band, which is unoccupied.

The semiconductors refer to the II-VI, III-V and IV-groups in the periodic system. These materials process a smaller energy gap, making them more conductive. Carbon (C) belongs to the group IV class of semiconductor materials; however it has traditionally behaved as an insulator.

In spite of this natural behavior of carbon, conduction was discovered in carbon materials in 1977 (Chiang et al., 1977). In addition to this discovery, the luminescence was observed in organic materials in 1987 (Tang et al., 1987). These dates can be considered as the dawn of a new era in the semiconductor technology, the era of the organic devices.

In organic molecules, the electrons are distributed in orbitals around the core of the carbon atoms according to their electron probability functions. The outermost electron orbitals of different atoms interact and link these atoms, forming molecules that strive for the lowest energy as possible. An organic semiconductor molecule contains a backbone of carbon atoms, and a certain number of functional groups that are attached to it.

The transport through organic materials is limited by the transfer of charges between the molecules. An energy barrier is present between molecules and the closer the molecules better the conduction. Charge transport occurs via hopping: thermally-assisted tunneling process between two molecular localized sites (Lara Bullejos et al., 2008).

The picture given above for the conduction in organic semiconductors is a first-order approximation. Contact effects, charge build up, non-repeatability of the parameters and non-stationary, are second-order effects to take into account when modeling the conduction of organic semiconductors. The hopping transport briefly mentioned above, can be combined with other approaches to explain experimental data, as it is done in this work.

3 Procedures

In a previous work (López Varo et al., 2012) (Jiménez Tejada et al., 2013), we proposed a method to extract the charge density at the metal-organic interface from j - V curves measured in organic diodes with low energy barriers. The transition from ohmic to SCLC was explained by a realistic finite charge density at the interface $p_f(0)$. In this work, we present an explanation of the transition from SCLC to ILC also by using a finite value of $p_f(0)$. In that sense, the value of the charge density at the interface can be interpreted as the result of different physical mechanisms that occur during the injection. This model is based on the solution of the transport equations (1)-(3) considering the correlated Gaussian disordered mobility model (Agrawal et al., 2008) and the use of a proper boundary value for the charge density at the interface $p_f(0)$, including the ratio of free to total charge density, θ , that can account for deep trapping effects in the organic semiconductor.

3.1 Model

We consider the transport of free charge from the interface into the bulk of the organic material. This free charge density is termed $p_f(x)$ (holes in a hole-only device) and its value at the interface is $p_f(0)$. These free charges are transported through the organic material mainly by the action of an electric field $F(x)$. The drift current density is given by:

$$j = q\mu[T, F(x)]p_f(x)F(x). \quad (1)$$

where q is the absolute value of the electron charge, x is the distance from the injecting electrode and $\mu[T, F(x)]$ is a mobility model with a dependence on the temperature and electric field, in this case, the correlated gaussian disordered model (CGDM). The Poisson equation relates the charge-carrier density with the electric field:

$$\frac{dF}{dx} = \frac{q}{\epsilon_0\epsilon_r} p(x) \quad (2)$$

where ϵ_r and ϵ_0 are the relative permittivity and the permittivity of the free space, respectively. The free charge density is a fraction of the total charge density: $p_f = \theta p(x)$. The set of transport equations is completed with the integral of the electric field to find the voltage along the device:

$$V = \int_0^L F(x)dx \quad (3)$$

The analysis of experimental data with our model provides a relation of the charge density at the interface with the current density. This relation provides details about the presence of impurities, if the low current regime is analyzed, or about the injection barriers, if the high current regime is studied.

4 Results and Discussion

We apply this idea to experimental j - V curves (symbols) in Fig. 1 (a) (Stevenson et al., 2010) of dendrimer based diodes with different contacts: ITO, Pt and Au. All the diodes have the same length, $L=100$ nm and was measured at 300 K. The studied dendrimer has cores of fac-tris(2-phenylpyridine) iridium, $[(Irppy)_3]$, with phenylene dendrons covalently bonded to it (Stevenson et al., 2010). We extract the free charge density at the interface $p_f(0)$ as a function of the current density [Fig. 1 (b)].

The free charge density increases when the injected current increases, except in the case of platinum contact and at low voltages, where the charge at the contact is constant. This means that the amount of injected carriers is low, compared to the existing thermally generated carriers. This constant region is related to a linear or ohmic trend on the j - V curves. At higher current densities, the amount of injected charges surpass this threshold, making a transition from ohmic to ILC. As expected, the amount of free charges at the interface is higher for the lowest value of the energy barrier Δ . At high current densities, the $p_f(0)$ - j relations are linear and parallel in a logarithm scale. We propose to model this relation as:

$$p_f(0) = K_1 j^m + K_2 \quad (4)$$

where the parameter K_1 depends on the barrier height, K_2 controls the flat zone at low currents and m is related to the slope of the curves at high currents. Combining this model (4), with (1)-(3) the solid lines in (a) are obtained. This excellent agreement with the experimental data is controlled with the parameter m , which is dependent only on the organic semiconductor, not on the electrode, with the parameter K_1 , clearly dependent on the electrode and which reflects the fact that the lower the height of the energy barrier is, the greater the value of $p_f(0)$ is obtained and with the parameter K_2 dependent on the thermal carriers detected at low voltages.

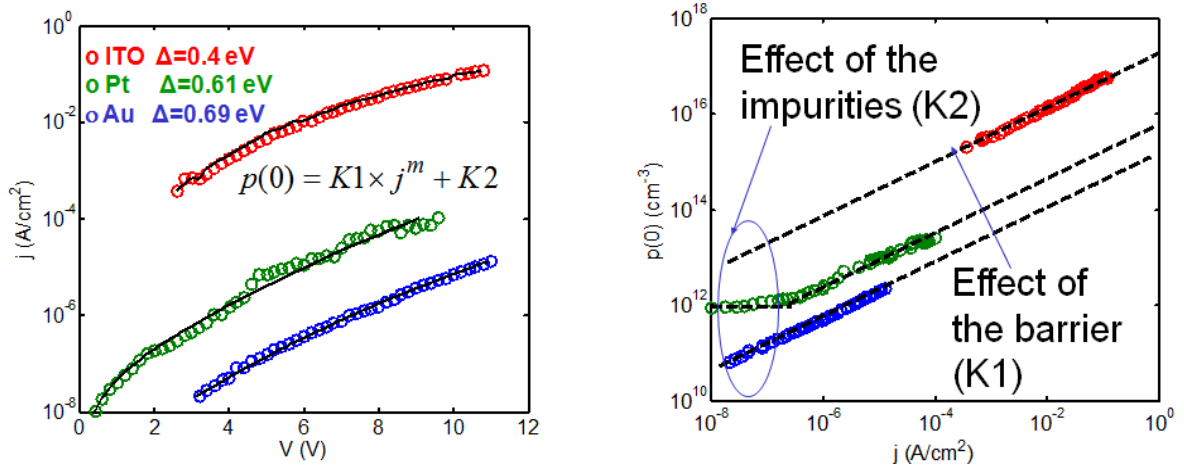


Fig. 1. (a) Comparison between experimental j - V curves in dendrimer based diodes with different barriers (Stevenson et al., 2010) (symbols) and our calculation (solid lines). (b). Free charge density at the interface as a function of the current density employed in the fitting of (a).

5 Conclusion

In this work, we studied and model electrical mechanisms that are common in different organic devices, such as charge transport in the organic material and the injection of charge from the metal-organic interface. The study has been done in organic diodes. We present a way to interpret and model current-voltage curves of organic diodes with different barrier heights and we have applied our model to different experimental data. The solution of the transport equations with a proper boundary value for the charge density at the metal organic interface preserves the information of both ILC and SCLC regimes. Realistic transitions of this variable among Ohmic, ILC and SCLC regimes are obtained.

6 References

1. Kim, J. J.; Han, M. K.; and Noh, Y. Y., Flexible OLEDs and organic electronics. *Semiconductor Science Technology*. 2011; 26: 030301.
2. Laubender, J.; Chkoda, L.; Sokolowski, M. and Umbach, E., The influence of oxygen and air on the characteristic of organic light-emitting devices studied by in vacuo measurements. *Synthetic Metals*. 2000; 111-112: 373-376.
3. Arkhipov, V. I.; von Seggern, H. and Emelianova, E. V., Charge injection versus space-charge-limited current in organic light-emitting diodes. *Applied of Physics Letter*. 2003; 83: 5074-5076.
4. Agrawal, R.; Kumar, P.; Ghosh, S. and Mahapatro, A. K., Thickness dependence of space charge limited current and injection limited current in organic molecular semiconductors. *Applied of Physics Letter*. 2008; 93(7):073311.
5. Chiang, C. K.; Fincher Jr., C. R.; Park, Y. W.; Heeger, A. J. and Shirakawa, H.; Louis, E. J.; Gau, S. C. and MacDiarmid A. G., Electrical conductivity in doped polyacetylene. *Physical Review Letter*. 1977; 39: 1098.
6. Tang, C. W.; and Van Slyke, S. A.; Organic Electroluminescent Diodes. *Applied Physics*

Letter. 1987; 51: 913.

7. Lara Bullejos, P.; Jiménez Tejada, J. A.; Deen, M. J.; Marinov, O. and Datars, W. R., Unified model for the injection and transport of charge in organic diodes. *Journal of Applied Physics*. 2008; 103: 064504.
8. López Varo, P.; Jiménez Tejada, J. A.; López Villanueva, J. A.; Carceller, J. E. and Deen, M. J., Modeling the transition from ohmic to space charge limited current in organic semiconductors. *Organic Electronic*. 2012; 13: 1700-1709.
9. Jiménez Tejada, J. A.; López Varo, P.; Awawdeh, K. M. and Deen, M. J. Modeling of charge injection in organic/polymeric diodes. 2013; 223rd Electrochemical Society Meeting.
10. Stevenson, S. G.; Samuel, I. D. W.; Staton, S. V.; Knights, K. A.; Burn, P. L.; Williams, J. H. T; and Walker, A. B. Current-voltage characteristics of dendrimer light-emitting diodes. *Journal Physics D: Applied Physics*. 2010; 43: 385106.

CO-41 La pronunciación del árabe como lengua extranjera (ELAE): El caso de la EOI de Granada

Mohamad Worjin

Granada, c/ Matilde de la Torre, 26, 2º- G, Universidad de Granada mwarjen@yahoo.com

Resumen

Este artículo se centra en el problema de la pronunciación del árabe como lengua extranjera intentando presentar una serie de recursos didácticos útiles para ayudar a los alumnos a mejorar y adquirir la pronunciación correcta. Nuestra propuesta se aplica a un grupo de alumnos españoles de distintas edades matriculados en el nivel inicial de la escuela oficial de idiomas de Granada, donde se ofrecen los medios posibles para mejorar la pronunciación de estos alumnos.

Después de reconocer los fonemas, destaca el evidente problema de no distinguir entre los fonemas tanto a la hora de escuchar como a la hora de hablar. Se utilizan principalmente pares mínimos para mostrar las diferencias semánticas entre los fonemas que son cercanos por el punto de articulación, y por lo tanto, problemáticos para la pronunciación; los fonemas se presentan en palabras acordes con el nivel del alumno y que le son útiles para comunicarse y estimular de este modo su interés por aprender.

En este estudio se ofrecen recursos didácticos, tales como grabaciones de audición, videos e internet y otros recursos como profesores, lectores y alumnos que tienen una buena pronunciación para que sirvan de ejemplo y puedan ser imitados por sus compañeros. En todo este proceso se utilizan estrategias como la repetición no monótona y la corrección.

El objetivo de este estudio es llenar el vacío que resulta por aprender una lengua fuera de su ámbito, llamar la atención a la importancia de la pronunciación y sus errores y de echo mejorar la pronunciación de los alumnos desde un punto de vista comunicativa.

Palabras clave:

Enseñanza de la pronunciación, Recursos didácticos, el árabe como lengua extranjera

1 Introducción

La Escuela Oficial de Idiomas de Granada es uno de los centros públicos dependiente de la Consejería de Educación de la Junta de Andalucía. Debido al carácter oficial de estos centros, los bajos precios públicos que se abonan, la amplia franja de edad a la que se abren y la diversidad de horarios, hacen que numerosos alumnos se matriculan en ellos para completar su formación lingüística. En la EOI de Granada se ofertan las siguientes lenguas: inglés, alemán, francés, árabe y español para extranjeros, y cuyas enseñanzas se han adaptado al Marco Común Europeo de Referencia (MCER), lo que supone que el Nivel Básico se ha anclado en un A2, el Intermedio en un B1 y el Avanzado en un B2. Dado que este estudio que hoy presento trata el tema de la pronunciación del árabe como lengua extranjera (ALE), he creído interesante llevar a cabo un estudio de caso con los alumnos de árabe de la EOI de Granada, a fin de observar el proceso de enseñanza/aprendizaje de esa destreza, poner en valor sus aciertos, detectar posibles errores y ofrecer posibles soluciones metodológicas.

2 Los objetivos

Nuestro objetivo principal es recoger, describir, clasificar y analizar los datos obtenidos a través de nuestro contacto directo con los alumnos en el aula y a través de encuestas y entrevistas realizadas tanto al profesor como a los alumnos, además

de consultar la opinión de los alumnos sobre sus errores, y cómo desean corregirlos.

- Conocer los motivos y los factores que pueden influir en el proceso del aprendizaje del ALE.
- Identificar las dificultades de la pronunciación en árabe e intentar responder a preguntas relacionados con este asunto.
- Responder a preguntas relacionadas con el profesorado, los recursos y el nivel de árabe que se enseña en estos centros.
- Vivir una experiencia vinculada a mi especialidad (EALE).

- Acercar más al ámbito del ALE, su enseñanza en España y, en particular, en Andalucía.

3 La muestra

Es digno de resaltar que en una ciudad como Granada, donde la caligrafía árabe decora las paredes de la Alhambra y el legado histórico árabe se respira en buena parte de la ciudad, se sigue protegiendo y cuidando, en gran medida, este importante patrimonio. En este clima no es de extrañar que la motivación de aprender árabe entre la población sea muy alta. En el curso 2012-2013 se matricularon en la EOI de Granada para estudiar esta lengua, alrededor de 120 alumnos, en sus distintos niveles.

Es muy importante señalar que la enseñanza de LE en este centro se basa en el enfoque comunicativo, lo que supone según los profesores de este centro, guiados por un objetivo pedagógico, que los errores de pronunciación no se corrigen de inmediato, sino de forma implícita y solo cuando el proceso de la comunicación se interrumpe.

Con el objetivo de contextualizar el proceso de enseñanza/aprendizaje de la pronunciación y acercarme más a este, mi trabajo se ha llevado a cabo a lo largo de 15 semanas, a razón de cuatro horas semanales, lo que ha supuesto un contacto directo con el alumnado de 60 horas. Dado que mi interés se ha centrado exclusivamente en el proceso de adquisición de la pronunciación, seleccioné para el trabajo a los alumnos de un nivel avanzado, concretamente el nivel avanzado I, teniendo en cuenta que son alumnos de cuarto año que ya han adquirido un nivel B1, es decir, poseen un dominio aceptable de lengua árabe, pues ya han superado 3 cursos y dos niveles, y solo les resta un año más para alcanzar el nivel B2. Por otro lado, quiero señalar que el registro de lengua árabe que se enseña en este nivel es el denominado el árabe moderno estándar (AME). A pesar de que los alumnos matriculados en el nivel avanzado I son 21, el número de los que han asistido a clase ha oscilado entre 7 y 14, de ambos sexos, y con distinta formación académica. Si bien es cierto que la ciudad de Granada reúne un considerable número de población árabe que podría facilitar al aprendiente, en cierta medida, la tan deseada inmersión lingüística en esta lengua, sin embargo, esta opción es rápidamente desechada desde el momento en que (AME), enseñado en la EOI, no es un registro hablado como lengua materna, por lo que no es fácil encontrar interlocutores fuera del aula para practicarlo.

4 Recursos y actividades

Tanto el profesor como el lector (auxiliar lingüístico) pueden funcionar como un recurso principal, y a pesar de que este año, por la crisis y los recortes, no han mandado ningún lector para ninguna de las lenguas que se imparten en la EOI, los alumnos de nivel avanzado I han contado conmigo como auxiliar lingüístico. Entre

los recursos utilizados para favorecer la producción y la comprensión oral de los alumnos, dos destrezas muy importantes para comunicarse, el profesor de la EOI ha utilizado los videos y DVDs que acompañan al manual utilizado, Al-Kitaab Fii - Ta'allum Al-Arabiyya, 2 de K.Brustad, M. al-Batal y A. al-Tonsi, los materiales audiovisuales de Shukri B. Abed (2007). (Focus on Contemporary Arabic) EE. UU. Yale University Press, así como páginas web diseñadas para la enseñanza de ALE, como el sitio conocido como (أصوات عربية)²⁶, web dirigida por la universidad de Texas en la que se ofrecen vídeos para cada nivel de ALE. Estos materiales ayudan a los profesores de esta lengua a mejorar la comprensión oral de sus alumnos, centrándose en apoyar el prelistening, listening y postlistening. Otros materiales como las canciones, son utilizadas por el profesor como estrategia para escuchar y escribir o escuchar e identificar.

He echado en falta en la EOI de Granada un laboratorio de idiomas, recurso éste necesario y específico para el proceso de enseñanza/aprendizaje de la pronunciación, por cuanto permite un seguimiento individualizado. La poesía por la riqueza de técnicas orales que tiene, como la melodía, el ritmo y la rima, puede jugar un papel muy importante en la enseñanza de la pronunciación. En este sentido, hemos recurrido a la obra de Mahmud Sobh, *El diván de la poesía árabe oriental y andalusí* (Sobh, 2012), para llevar a cabo la práctica de recitar poesía árabe. Todas las actividades que se realizan en el aula pretenden favorecer la destreza de la comprensión oral de los alumnos, por lo que la conversación se convierte en la actividad principal en nuestro caso. En ella el alumno tiene que entender tanto el tema como las opiniones de los compañeros participantes. La mayoría de los temas están estrechamente relacionados con el mundo árabe, el momento actual que vive y otros aspectos particulares de este, como la mujer, las costumbres y la cultura.

Con todos estos recursos, hemos realizado, con ayuda del profesor, algunas actividades en el aula a fin de examinar asuntos como la enseñanza implícita y explícita de la pronunciación, sin, por otro lado, haber conseguido resultados concluyentes.

5 Descripción y análisis de errores

Desde un punto de vista descriptivo este trabajo se ha realizado a través de la supervisión de los errores de pronunciación de los alumnos, dividiéndolos en los dos bloques antes mencionados, elementos segmentales y elementos suprasegmentales. Además y para enriquecer estas observaciones y tener más respuestas acerca del problema, hemos utilizado otros recursos para la obtención de datos, un tipo sencillo de encuestas y entrevistas realizadas tanto a los alumnos como al profesor.

Cabe señalar que todos los alumnos de árabe de este curso son españoles, una ocasión que nos permite interpretar los errores dependiendo de la interferencia entre el árabe y el español como dos lenguas distintas, por lo que hemos recurrido al resultado del estudio comparativo de Aguilar (2010: 120) entre el sistema consonántico del árabe y el del español.

En primer lugar y respecto a la comunicación, los errores de pronunciación que se cometen en clase se dividen, dependiendo del grado de dificultad que presentan, en dos tipos principales: los que impiden la comunicación y los que no la impiden, aunque pueden dificultarla en distintos grados. La mayoría de los errores

²⁶ Cf. Aswaat Arabiyya: <http://www.laits.utexas.edu/aswaat/about0.php>. fecha de consulta: [22 de mayo de 2013].

de pronunciación en este caso hacen referencia, como hemos dicho anteriormente, al fenómeno llamado interferencia lingüística, provocado por la interlengua del alumno, que se puede interpretar aquí por la pronunciación incorrecta de elementos inexistentes en la lengua meta y materna LM del alumno (español), la generalización de algunos fenómenos fónicos y, en general, el miedo a cometer errores.

Los errores segmentales se presentan, sobre todo, en la pronunciación de las consonantes guturales y enfáticas, así como en la cantidad vocálica, si bien detectamos otros errores causados por el propio sistema consonántico del alumno, pues los sonidos inexistentes en la lengua española se asimilan a categorías similares.

Los errores de sonidos guturales o faringolaringales son los más frecuente, y tienen el carácter de ser errores fonéticos, es decir, alterar el significado y en consecuencia el proceso de comunicación. Así por ejemplo, es frecuente escuchar a los alumnos pronunciar la palabra *qul* (dí), como *kul* (come), ya que el alumno no tiene este sonido en su inventario consonántico, por lo que asimila éste a la categoría del sonido español más próximo, en este caso /q/. Otro ejemplo claro se observa en la palabra *bi-su' ūba* (apenas) cuando los alumnos la realizan como *bi-ṣūba*, omitiendo la realización del /'/. De igual manera, los dos sonidos /' / y /ḥ / en palabras como *'amal* (trabajo), *ḥay* (barrio), se pronuncian como /a/ y /j/ respectivamente, cambiando la primera a *amal* (esperanza) y proporcionando dificultad en entender la segunda.

Los errores de los sonidos enfáticos ocurren del mismo modo, es decir, el alumno recurre a la asimilación, sin embargo en este caso la asimilación se hace no a sonidos de su entorno consonántico sino a alófonos de los mismos. Un ejemplo evidente de esto se produce al pronunciar la palabra *nazzāra* (gafas) que se realiza como *naḏāra*. Igualmente, hemos detectado errores producidos por hipercorrección, el miedo a cometer errores de pronunciación con sonidos enfáticos provoca el que palabras que no los llevan se realicen como si los llevaran, como en la palabra *intāsaba* (estar asociado a) realizada como *intaṣaba* (se plantó). Los alumnos conscientes del carácter enfático o velar puro de ciertos sonidos de la lengua árabe, velarizan o enfatizan nombres extranjeros, siempre que estos nombres comporten una consonante susceptible de ser velarizada, como por ejemplo los nombres propios Tony o Antonio, cuya realización arabizada sería Ṭony y Anṭonio respectivamente.

Otro error de pronunciación, detectado con bastante frecuencia en el alumnado español, es el que se produce en la pronunciación del sonido /z/, realizado como /s/. Esto se debe a que en español la /s/ tiene un alófono sonoro parecido al sonido /z/ mientras que en árabe existen dos fonemas diferentes, (Llisterri, 2003: 99); y así escuchamos *al- ziyāda* (el aumento) que se realiza como *al-siyāda* (soberanía). A pesar de esto, el mismo comportamiento en otro ejemplo no se considera un error grave, como en la palabra *al-usbū'* (la semana), pues la realización sonora /z/ de la /s/ sorda, influida por la /b/ sonora, ni cambia el significado ni dificulta oírse. Por esta misma razón una palabra como *yaḡyib* (debe) puede realizarse en clase *yayib*, exactamente como se dice en el dialecto del Golfo, ya que la /y/ es una variante de la /y/ en español, como representa la pronunciación de pronombre de la primera persona singular (yo).

En el caso de la pronunciación de ALE observamos también cierta tendencia de los alumnos a la generalización de algún rasgo concreto de la pronunciación de un sonido. Esto ocurre, por ejemplo, con /l/ enfática, cuya pronunciación como tal es generalizada en la preposición *'alā*, por aprendientes españoles, resultando un acento molesto para el nativo árabe. Este error no se clasifica entre los que impiden

la comunicación, pero sí puede obstaculizarla por el grado de dificultad que imprime en el oído nativo.

La cantidad vocálica en árabe es un rasgo fundamental, al contrario del español, donde la cantidad vocálica no se considera un rasgo pertinente, por eso los alumnos no captan la diferencia entre *naqaša* (esculpir) y *nāqaša* (discutir). Así mismo hemos detectado que los alumnos no perciben, por ejemplo, que *āl bayt* (la familia de) no es lo mismo que *al-bayt* (la casa), falta esta que muchas veces ha tenido relación con otro rasgo suprasegmental que es el lugar donde recae el acento. Es curioso, que al hablar en árabe e intentar realizar la cantidad vocálica, la producción oral de algunos alumnos provoca un acento extranjero que se representa en un alargamiento exagerado de dicha vocal, una observación que destaca la necesidad de escuchar como una destreza fundamental en el aprendizaje de la pronunciación.

En casos de juntura todos los alumnos con los que he trabajado coinciden en el mismo error, no pronuncian nunca la *tā' marbūṭa* /ʔ/, un comportamiento razonable en la mayoría de las posiciones finales donde se encuentra este elemento, pero no en el caso de *iḏāfa* (anexión), donde la relación entre las palabras es muy fuerte, pues la anexión en árabe se considera una sola palabra. Por esta razón, los alumnos realizan el compuesto de *ḡannat al-atfāl* (el jardín de los infantes) como *ḡanna al-atfāl*.

Los elementos suprasegmentales presentan menos interés por cuanto no impiden la comunicación, como el caso del acento. Como es bien sabido, el acento de una palabra que tiene dos vocales largas recae sobre la segunda vocal larga, como por ejemplo: *kānūn al-awwal* (diciembre) donde el acento recae sobre la segunda vocal larga (*ū*) del sustantivo, sin embargo, esta palabra se realiza como *kānūn* con el acento sobre la /ā/, lo que refleja la generalización de las reglas de acentuación que expresan que el acento árabe recae sobre la sílaba con vocal larga, siempre que la hubiere. En ciertos casos este error conlleva cierto grado de dificultad en la comunicación como podemos ver en el siguiente ejemplo: la pronunciación del sustantivo singular *musāfirun* (viajero) y la del plural *musāfirūn* (viajeros), será idéntica, dado que los alumnos acentuarán en el sustantivo plural la primera sílaba con vocal larga.

La entonación se produce a lo largo de las conversaciones. En general, no hemos detectado que los alumnos encuentren grandes dificultades al hablar y marcar las diferentes entonaciones. No obstante, al estar relacionada la entonación con otras competencias, tanto léxicas como estructurales, dicho elemento se ve afectado, sobre todo, por la fluidez y el estado de ánimo de los aprendientes. La pausa es otro elemento de la pronunciación que está estrechamente relacionada con la dimensión semántica del mensaje, por lo que es muy importante hacerla cuando convenga. Mientras que los alumnos españoles resuelven sin problemas la pausa durante una conversación, no ocurre lo mismo cuando de un texto escrito se trata, especialmente cuando éste carece de signos de puntuación. Un ejemplo de lo dicho podemos verlo representado en las siguientes dos frases: *تفرغ ي, تفرغ للدعوة إلى أن مات* و *للدعوة إلى المساواة* pues la pausa aquí presenta un cambio semántico según se haga tras el infinitivo *al-da'wa* (la llamada) o tras la preposición *ilā*.

6 Resultados

Según Iruela (2007) a pesar de la importancia que tiene la pronunciación y las destrezas orales en la comunicación, la enseñanza de éstas en los enfoques comu-

nicativos ha sido relegada constantemente a un segundo plano, sobre todo, por la falta de coherencia entre las actividades diseñadas para este objetivo y las actividades centradas en el significado a fin de desarrollar la competencia comunicativa: lo importante es el qué y no tanto el cómo.

Hay que tener en cuenta que la conversación como una estrategia oral ocupa un lugar destacado en la evolución de la pronunciación de los alumnos, a la vez que favorece de forma continua el proceso de comunicación. Esta estrategia realizada en clase y basada en temas coincidentes con el nivel de los alumnos necesita ir acompañada de corrección fonética, es decir, abordando los errores de los alumnos.

En este centro, como opina uno de los alumnos, no se ha hecho hincapié en la pronunciación de forma directa, sino que el interés recae sobre la expresión oral, pues el profesor prefiere trabajar la pronunciación desde un punto de vista comunicativo, ya que en la EOI de Granada la enseñanza se centra en la comunicación. El mensaje no debe ser interrumpido, lo que hace que no se preste excesiva atención a la pronunciación de los alumnos. Sin embargo, esto no significa que la enseñanza de la pronunciación no puede vincularse a la situación comunicativa, sino que las actividades en este caso no se dirigen a aprender la pronunciación, y los alumnos siguen siendo inconscientes de sus errores. Respecto a esto, los alumnos, según la encuesta del anexo I, prefieren ser consciente de sus errores como un paso hacia la autoevaluación y la corrección de los mismos. Sería útil tomar notas de la actuación oral de los alumnos y una vez que termina la conversación, exponer los errores e intentar llegar a las formas correctas.

Según los datos obtenidos, los alumnos se motivan cada vez que pronuncian bien, es decir, que la enseñanza de la pronunciación tiene un motivo comunicativo, y para ello es necesario que los alumnos sepan de sus errores y aprendan a corregirlos con el fin de evitarlos en el futuro.

Por último, es importante señalar que el oído perceptor del profesor como instructor de una lengua extranjera no debe adaptarse ni acomodarse a la pronunciación de sus alumnos, sino conseguir que la producción de éstos se adapte a la norma de pronunciación correcta de la lengua.

7 Conclusiones

En primer lugar, y a modo de conclusión general, teniendo en cuenta los límites de este estudio y a la espera de realizar un muestreo más amplio de aprendientes y enseñantes de ALE, podemos decir que la enseñanza de la pronunciación de la lengua árabe sigue siendo la gran asignatura pendiente del complejo proceso que comporta la EALE. Este hecho deriva, en gran medida, de la falta de integración de las nuevas teorías desarrolladas en el ámbito de la pronunciación en la lingüística aplicada a la enseñanza de la lengua árabe.

No hay convergencia entre lo investigado y expuesto teóricamente en este terreno y lo que observamos en la enseñanza aplicada en los programas de EALE. Sin embargo, y a pesar de no recibir la importancia que se merece en los métodos comunicativos, he podido observar a través de mi trabajo de campo, como la pronunciación y la expresión oral, en general, van poco a poco consiguiendo pequeños logros en el aula, traducidos en niveles de eficiencia cada vez más aceptables. Por lo que respecta a la lengua árabe y a los alumnos con los que he trabajado, hay que señalar que los factores dificultadores en el caso del aprendizaje de la pronunciación son más numerosos que los facilitadores. Por ello, se hace necesario llevar a

cabo un estudio contrastivo, lengua árabe-lengua española, que analice exhaustivamente las posibles interferencias lingüísticas de la lengua materna y ayude a predecir y subsanar los errores frecuentes producidos como consecuencia de estas interferencias, en todos los niveles de lengua árabe. Asimismo, quiero manifestar que la literatura árabe y su integración en los programas de ALE es un recurso didáctico llamado a ocupar un papel relevante en el proceso de enseñanza/aprendizaje de la pronunciación en ALE. Utilizar la poesía árabe como estrategia para insistir en la adquisición de la pronunciación de la lengua árabe, ha gozado de gran aceptación y ha suscitado un gran interés entre los alumnos de la EOI de Granada. Este género literario tan importante para los árabes, conocido por sus técnicas orales como el ritmo, la melodía y la rima, reúne además otras componentes como la dimensión cultural e histórica, lo que ha sido valorado altamente por los alumnos y nos hace pensar que en un futuro no muy lejano sea un recurso recurrente en la adquisición y aprendizaje de ALE.

En el nivel avanzado I de árabe en la EOI de Granada, leer en voz alta y conversar son las dos estrategias principales para alcanzar el fin, la comunicación dirigida. En este sentido, los errores de pronunciación se toleran y sólo se corrigen cuando son responsables de interrumpir dicho fin. Por otro lado, es obligado señalar que la enseñanza de las variedades dialectales, parte tan necesaria para cumplir los requisitos de la competencia pragmática, además de otros fenómenos relacionados con la pronunciación alofónica del AME, continúa sin ser integrada en los programas de EALE. No obstante, en algunas EOI de Andalucía se están dando los primeros pasos para enseñar el árabe dialectal marroquí (*dāriya*), pero siempre como otra lengua extranjera y no como una realidad sociolingüística del ALE.

8 Fuentes bibliográficas

AGUILAR, Victoria (2010). «Enseñanza de la pronunciación en árabe: una propuesta», en AGUILAR, V. et al. *Arabele* 2009, enseñanza y aprendizaje de la lengua árabe. Murcia: UM, 115-129.

Aswaat Arabiyya: <http://www.laits.utexas.edu/aswaat/about0.php>.

IRUELA, Agustín (2007). «Principios didácticos para enseñanza de la pronunciación en lenguas extranjeras», en *Marco ELE*. Revista de didáctica, 1-16. <http://marcoele.com/principios-didacticos-para-la-ensenanza-de-la-pronunciacion-en-lenguas-extranjeras/>. Fecha de consulta: [20 de mayo de 2013]

LLISTERRI, Joaquín (2003). «La enseñanza de la pronunciación», en *Revista del Instituto Cervantes* en Italia 4, 91-114.

SOBH, Mahmud (2012). *El diván de la poesía árabe oriental y andalusí*. Madrid: Visor Libros.

CO-50 Nanotechnology approach for protein delivery

Juan Diego Unciti-Broceta,^{1,2} Victoria Cano-Cortés,^{1,2} Juan José Díaz-Mochón,^{1,2} Rosario M. Sánchez-Martín^{1,2}

¹ Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO), P. T. Ciencias de la Salud, ² Dep. Medicinal and Organic Chemistry, School of Pharmacy, University of Granada; juandiego.unciti@genyo.es

Abstract

The development of an efficient carrier system for delivery of functional proteins into cells, although a challenging area of research, is a key technology for the progress of research in the biological sciences and medicine. Recent examples include conjugation of proteins to cell penetrating peptides (CPP) such as those derived from HIV-1 TAT, "protection" by cationic lipids and the use of several "nanodevices" such as nanotubes or silica nanoparticles. Previously we have reported that amino-functionalized, cross-linked polystyrene nanoparticles of highly defined sizes (200 nm-2 µm) are efficient cellular delivery devices that can enter a broad range of cell types including adherent, suspension and primary cells. These nanoparticles are inherently attractive as a carrier/delivery system due to their lack of toxicity and highly controllable cellular loading.

Herein an efficient strategy for the conjugation of streptavidin to nanoparticles and the evaluation using fluorescent-based techniques is reported.

Keywords

Polystyrene nanoparticles, streptavidin, bioconjugation.

1 Introduction.

The delivery of proteins to cells is of great importance to biomedicine. Due to the vast spectrum of proteins available, there is an enormous range of effects that can be induced on a cell to study its nature or affect its metabolism for beneficial purposes. Traditionally, the introduction of bioactive proteins into cells has been accomplished by transfecting transcriptionally active DNA into living cells where the gene is expressed and the protein is made by cellular machinery. Delivery of proteins using carrier systems can offer many advantages compared to the traditional approach consisting in the endogenous expression of the desired protein from a plasmid, approach that presents complications connected with plasmid delivery (particularly *in vivo*) and possible varied protein expression in different cell lines. Methods to deliver protein directly to the cells have been developed. Those methods include electroporation, microinjection, cell penetrating peptides and cationic lipids, and they may be useful in a variety of fields, including cell cycle regulation, control of apoptosis, oncogenesis and transcription regulation, etc.¹⁻⁸

Previously, we have reported the application of polymeric nanoparticles as a cellular delivery and tracking device capable of introducing a range of biological and chemical modalities into cells. Our research team have developed the synthesis and application of multifunctionalised, cross-linked, polystyrene nanoparticles, which as mentioned previously, are taken up by the great majority of cell types studied so far⁹⁻¹⁵. Importantly, the nature of these synthetic beads allows multistep solid-phase chemistry and the possibility to bind any molecule/sensor/nucleic acid to them. Populations of cells containing beads can be readily sorted from other cells for subsequent analysis with very high, but controllable, uptake rates that can be modulated through changing the bead size and incubation time⁹. To be able to follow the movement of nanoparticles inside cells and to study their cellular uptake, nanoparticles have been covalently labelled with several dyes. The fact that the nanoparticles could be labelled with different fluorescent molecules was very important because it meant that standard organic and solid-phase protocols to nanoparticles coupling could be successfully applied. This

opens a great number of possibilities for the application of these nanoparticles because it means that many different molecules could be bound to them.

Cargoes delivered to-date include proteins (such as Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) and β -Galactosidase), oligonucleotides (siRNA), and sensors for measuring intracellular pH and calcium ions, all of which have been demonstrated to be fully functional once internalized⁹⁻¹².

By using amino functionalised polystyrene nanoparticles changes in the concentration of intracellular Ca^{2+} ions in single living cells in real time could be measured. The fact that nanoparticles are firmly retained for several days also allows changes in the concentration of intracellular Ca^{2+} ions to be followed in a single cell for much longer periods of time than when using established sensors. These results open the door to a range of possible applications, such as nanoparticles acting as carriers of sensors for enzymatic activity assays¹⁰. Remarkably, sensor immobilization on to nanoparticles avoids the dilution and cellular degradation observed with other conventional sensors.

Additionally these nanoparticles have been used as intracellular pH sensors in living cells and successfully proven by using a number of different techniques such as spectrofluorometry, fluorescence microscopy and flow cytometry¹¹. Covalent binding of fluorescein to nanoparticles significantly improves the stability of the indicator over time and eliminates escape. At the same time it retains the properties of fluorescein for pH sensing. These fluorescein-loaded nanoparticles provide a reliable way to complete long-term cell monitoring studies.

These nanoparticles have been used for the delivery of small sequences of RNA. In particular, Green fluorescent Protein (GFP) expressed in human ovarian cancer (HeLa) cells has been successfully silenced using amino functionalised siRNA linked to 500 and 200 nm nanoparticles via cleavable and non-cleavable linkers.¹²

The application of these nanoparticles for tracking and molecular delivery in embryonic stem cells has been reported¹³. Amino functionalised polystyrene nanoparticles were employed for the coupling and efficient delivery of a variety of cargoes into both undifferentiated and differentiated embryo derived stem cells. Cargoes included proteins, siRNAs and fluorescent dyes. Thus, nanoparticles represent an effective means to introduce biological cargoes into real time differentiating ES cell cultures, opening a new area of research in the transfection of Stem Cells.

Recently we have developed a method for the activation of molecules by carrying on palladium-catalyzed chemical reactions inside living cells using a metal as toxic as palladium without inducing cellular death. This was possible by immobilizing palladium nanoparticles on nanoparticles which allowed the catalytic activity of palladium while avoiding palladium cellular toxicity¹⁴⁻¹⁵.

The fact that these nanoparticles are easy to functionalise with high controllability over cargo loading and they are taken up by cells with any undesired cytotoxic effects observed, make them enormously attractive as carrier/delivery systems in molecular biology. The opportunity to sort cells individually based on the number of beads per cell, allowing defined cellular doses, is very important for the application of nanoparticles in the field of molecular biology. Therefore, streptavidin-coated nanoparticles are shown as an efficient carrier system of biotinylated cargoes. Herein an efficient strategy for the conjugation of streptavidin to nanoparticles and the evaluation using fluorescent-based techniques is reported.

2 Materials and Methods.

2.1. Preparation of streptavidin functionalised nanoparticles.

2.1.1. Preparation of PEGylated nanoparticles (3).

Amino functionalized nanoparticles **1** (1 mL; 1eq) were washed in DMF (3 x 1 mL) and suspended in DMF (1 mL). Separately, Fmoc-PEG-OH (5eq) was dissolved in DMF (1 mL), then Oxyma and DIC (5 eq) was added and the solution mixture mixed for 8-10 minutes at room temperature (rt). The solution mixture was then added to amino nanoparticles. The suspension was mixed on the Thermomixer at 1400 rpm for 2 hours at 60° C. *Fmoc deprotection* was achieved by treating nanoparticles with 20% piperidine/DMF (1 mL; 3 x 20 minutes). PEGylated nanoparticles **3** were obtained by centrifugation and subsequently washed with DMF (3 x 1 mL), MeOH (3 x 1 mL), deionised water (3 x 1 mL) and finally DMF (3 x 1 ml). Next, ninhydrin test was performed to check the presence of primary amine.

2.1.2. Preparation of aldehyde functionalised nanoparticles (4).

PEGylated functionalized nanoparticles **3** were washed with PBS buffer (pH 7.4), NaOH (500 mM) and finally PBS (pH 7.4). After washing and centrifugation, nanoparticles were re-suspended in a 25 % (w/v) glutaraldehyde solution in PBS buffer and the mixture was shaken for 15 h at room temperature to obtain nanoparticles **4**.

2.1.3. Conjugation of streptavidin to nanoparticles (6).

Streptavidin (5 µg/mL in PBS, pH 7.4) was added to aldehyde functionalised nanoparticles **4** and the mixture was shaken for 15 h. Nanoparticles **5** were then washed with PBS (pH 7.4) and treated with a sodium cyanoborohydride solution (5 mM) in PBS/EtOH (3:1) for 2 h. Finally the streptavidin-loaded nanoparticles were washed with PBS and treated with a quenching solution (40 mM ethanolamine with 1% (w/v) BSA in PBS). The streptavidin-loaded nanoparticles **6** were washed and stored in PBS (pH 7.4) at 4° C.

2.2. Efficiency of streptavidin coupling to nanoparticles

2.2.1. Incorporation of biotin-fluorescein to streptavidin-loaded nanoparticles.

Streptavidin-loaded nanoparticles were centrifuged and re-suspended in a solution of biotin-4-fluorescein in biotin-streptavidin binding buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 M NaCl) and the mixture was shaken for 1 h, after which time the nanoparticles were washed with the same buffer and resuspended in PBS (pH 7.4).

2.2.2. Evaluation of efficiency of streptavidin coupling.

A series of biotin-4-fluorescein (Sigma Aldrich, MW: 644.7) dilution solutions in PBS buffer were prepared and the absorbance was measured at 494 nm to build a calibration curve. After coupling of biotin-4-fluorescein to nanoparticles the supernatants (biotin released) were combined and the absorbance at 494 nm (A₄₉₄) was recorded.

3 Results.

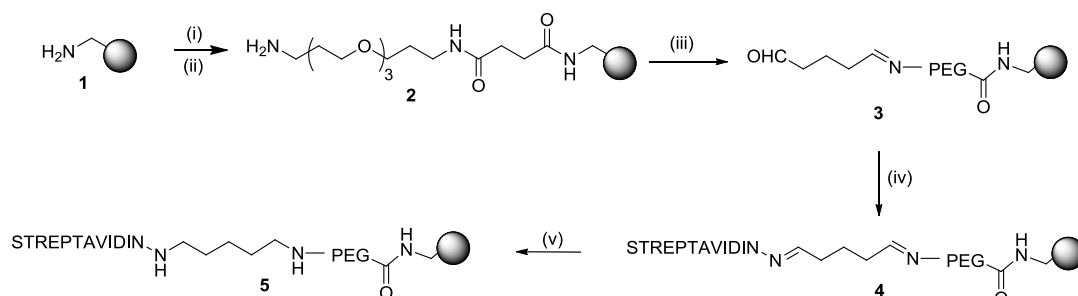
3.1. Conjugation of streptavidin to nanoparticles.

Conjugation of large biomolecules, such as proteins, is always complex due to compatibility issues with standard organic solvents and also to difficult purification processes that are required. Solid-phase chemistry protocols using these nanoparticles, being developed by our research group, address these two problems: chemical reactions can be done in both organic and water based solvents and purification steps are easy to be done as this is achieve

by doing series of simple centrifugation cycles to remove excess of reagents and sideproducts from biomolecule-nanoparticle conjugates. Conjugation of streptavidin to nanoparticles was carried out following a previously described solid phase protocol for bioconjugation using glutaraldehyde as cross-linker. This homo-bifunctional reagents, specifically reacting with primary amine groups (i.e., ϵ -amino groups of lysine residues) has been used extensively as it is soluble in aqueous solvents and can form stable inter- and intra-subunit covalent bonds. Glutaraldehyde, a popular reagent, has been used in a variety of applications where maintenance of structural rigidity of protein is important. It is important to keep in mind that treatment with this crosslinkers should be conducted in buffers free from amines (Tris-HCl should be avoided). Phosphate buffer saline (PBS) at pH 7.4 was used.

A monodispersed population of 200 nm aminofunctionalized cross-linked polystyrene nanoparticles (**1**) was obtained by dispersion polymerization as previously described^{15,19}. Firstly PEGylation of amino functionalized polystyrene nanoparticles (**1**) was performed. This PEGylation increases the biocompatibility of these nanoparticles and consequently their transport across cell membrane will be facilitated. Additionally, unfavorable interactions between nanoparticles and protein will be reduced, increasing the efficiency of the conjugation of the proteic cargo to the nanoparticle.

Secondly, a conjugation strategy was carried out to bind the amino group of the PEGylated nanoparticle (**3**) to the amino group of streptavidin by using glutaraldehyde as coupling reagent. Subsequently, a solution of streptavidin in PBS buffer (pH 7.4) was added and allowed to react overnight. Finally, the reversible Schiff base was reduced with sodium cyanoborohydride to give the covalently loaded streptavidin-nanoparticles (**Scheme 1**).

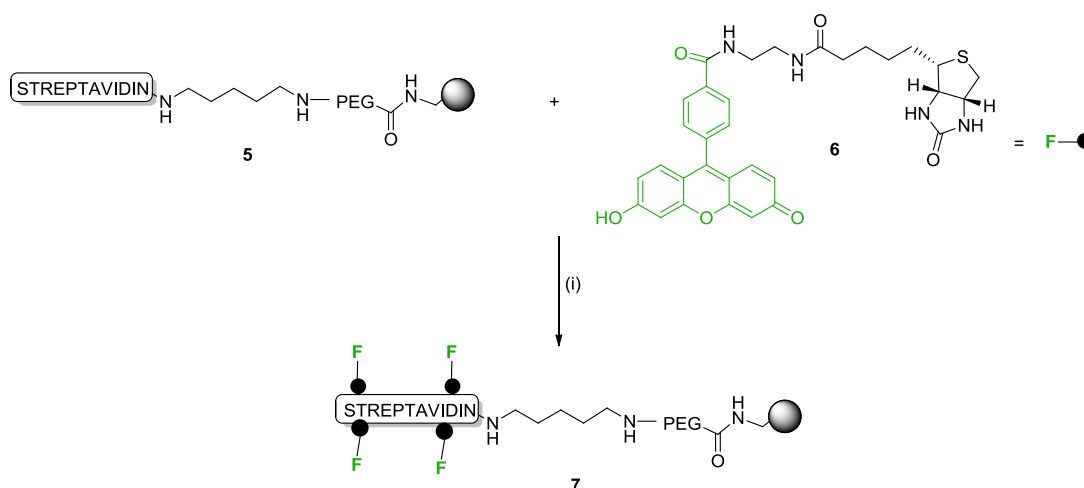


Reagents and Conditions: (i) Fmoc-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine succinamic acid (PEG), Oxyma, DIC, DMF, 60 °C, 1400rpm, 2h, 100%; (ii) 20% piperidine in DMF; (iii) glutaraldehyde, PBS, 15h.(iv) streptavidin, PBS, 15 h, (v) NaCNBH₃, PBS:ethanol, 2h.

Scheme 1. Functionalization of nanoparticles

3.2. Evaluation of efficiency of streptavidin coupling to nanoparticles.

In order to be able to evaluate efficiency of streptavidin conjugation and to calculate the amount of streptavidin per nanoparticle, nanoparticles (**5**) were labelled with biotin-4-fluorescein **6**, which has been reported to be a superior fluorescent biotin derivative for accurate measurement of streptavidin in crude biofluids. The fact that we were able to label the nanoparticles with this biotinylated compound demonstrated the integrity of the streptavidin when bound to the nanoparticles. It also allowed determination of the loading of streptavidin on the nanoparticles and as a consequence the coupling efficiency. The efficiency of streptavidin coupling to nanoparticles was approximately 40%. This value was calculated by measuring absorbance of remaining biotin-fluorescein in solution in comparison to starting solution (amount of streptavidin coupled to nanoparticles is co-related to amount of unconjugated biotin-fluorescein).



Reagents and Conditions: (i) 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, 1h.

Scheme 2. Conjugation of biotinylated-fluorescein to streptavidin-coated nanoparticles.

Fluorescence-based analysis of the biotin-4-fluoresceinstreptavidin- loaded nanoparticles was carried out to evaluate how immobilization of the streptavidin onto the polymer particles affected its binding properties. Flow cytometry results show that the fluorescent intensity signal increased dramatically after treatment of the streptavidin-loaded nanoparticles with the fluorescently labelled biotin (Figure 2) suggesting that attachment had not altered its binding properties. Microscopy-based analysis showed identical behaviour (see Figure 3).

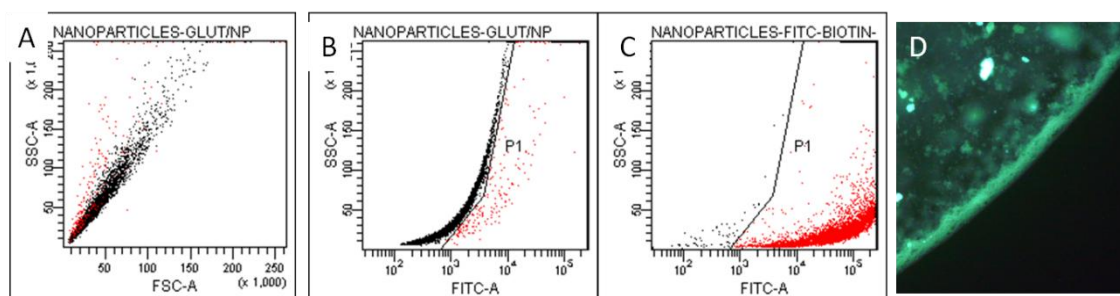


Figure 2. Evaluation of efficiency of streptavidin coupling to nanoparticles. Flow cytometry analysis of streptavidin-loaded nanoparticles labelled with biotin -4-fluorescein (A-C): A) SSC/FSC dot plot of nanoparticles (5), B) SSC/FITC dot plot of streptavidin-nanoparticles (5), C) MFI SSC/FITC dot plot of biotin-4-fluorescein-streptavidin-loaded nanoparticles (7). D). Fluorescence microscopy image of biotin-4-fluorescein-streptavidin-loaded nanoparticles (7).

4 Discussion.

The use of proteins in therapeutic applications is limited by the poor permeability and the selectivity of the cell membrane. Traditionally, the introduction of bioactive proteins into cells has been accomplished by transfecting transcriptionally active DNA into living cells

where the gene is expressed and the protein is made by cellular machinery. Nowadays, a wide variety of methods have been proposed to delivery full-length proteins into cells, including microinjection, scrape loading, electroporation, liposomes and bacterial toxins. Most of these methods are either inefficient, of time consuming, cause appreciable cell death or result in uptake into intracellular vesicles without efficient cytoplasmic delivery. The design of non-invasive, nontoxic, and efficient protein delivery method is of maximum relevance.

The aim of this research work was to develop an efficient method to conjugate protein of interest to nanoparticle. Streptavidin has been used as model. PEGylation and preparation of the glutaraldehyde functionalised nanoparticles has been carried out efficiently. In another hand, the protein has been successfully conjugated to the nanoparticle. The fact that we were able to label the nanoparticles with this biotinylated compound demonstrated the integrity of the streptavidin when bound to the nanoparticles. Further studies should be carried out to evaluate the efficient conjugation of therapeutic proteins. Additionally the cellular uptake efficiency of these conjugates by difficult to transfect cells will be evaluated.

5 Conclusions.

In conclusion, an efficient approach for conjugation of streptavidin to polystyrene nanoparticles has been successfully developed. This approach is based on solid phase protocols previously developed in our research team. Future work will be focussed in the *in vitro* evaluation of these streptavidin-nanoparticle conjugates to delivery biotinylated cargoes into cells.

Acknowledgements. This research was partially supported by a Marie Curie Career Integration Grants within the 7th European Community Framework Programme (FP7-PEOPLE-2011-CIG-Project Number 294142).

6 References

1. D. Ye, D. Xu, A. U. Singer, R. L. Juliano, Evaluation of Strategies for the Intracellular Delivery of Proteins, *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1302-1309.
2. N. J. Caron, Y. Torrente, G. Camirand, M. Bujold, P. Chapdelaine, K. Leriche, N. Bresolin, J. P. Tremblay, Intracellular Delivery of a Tat-eGFP Fusion Protein into Muscle Cells, *Mol. Ther.* **2001**, *3*, 310-318.
3. Catherine de Coupade, Antonio Fittipaldi, Vanessa Chagnas, Matthieu Michel, Sophie Carlier, Ennio Tasciotti, Audrey Darmon, Denis Ravel, Jonathan Kearsey,*Mauro Giacca, Françoise Cailler; Novel human-derived cell-penetrating peptides for specific subcellular delivery of therapeutic biomolecules, *Biochem J.* **2005** September 1; 390(Pt 2): 407–418.
4. O. Zelphati, Y. Wang, S. Kitada, J. C. Reed, P. L. Felgner, J. Corbeil, Intracellular Delivery of Proteins with a New Lipid-mediated Delivery System, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 35103–35110.
5. X. Zheng, M. Lundberg, A. Karlsson, M. Johansson, Lipid-mediated protein delivery of suicide nucleoside kinases, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 6909-6913.
6. B. T. F. van der Gun, A. Monami, S. Laarmann, T. Rasko, K. Slaska-Kiss, E. Weinhold, R. Wasserkort, L. F. M. H. de Leij, M. H. J. Ruiters, A. Kiss, P. M. J. McLaughlin, Serum insensitive, intranuclear protein delivery by the multipurpose cationic lipid SAINT-2. *J. Controlled Release* **2007**, *123*, 228–238.
7. (a) N. W. S. Kam, Z. Liu, H. Dai, Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 577- 581. (b) N. W. S. Kam, H. Dai, Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6021-6026.

8. (a) I. I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S.Y. Lin, Mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of membrane-impermeable proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 8845-8849.
(b) D. Ye, D. Xu, A. U. Singer, R. L. Juliano, Evaluation of strategies for the intracellular delivery of proteins. *Pharm. Res.* **2002**, 19, 1302–1309.
9. Sanchez-Martin, R. M.; Muzerelle, M.; Chitkul, N.; How, S. E.; Mittoo, S.; Bradley, M., Bead-based cellular analysis, sorting and multiplexing. *ChemBiochem* **2005**, 6, (8), 1341-1345.
10. Sanchez-Martin, R. M.; Cuttle, M.; Mittoo, S.; Bradley, M., Nanoparticle based real-time calcium sensing. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, (33), 5472-5474.
11. Bradley, M.; Alexander, L.; Duncan, K.; Chennaoui, M.; Jones, A. C.; Sanchez-Martin, R. M., pH sensing in living cells using fluorescent nanoparticles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, 18, (1), 313-317.
12. Alexander, L. M.; Sanchez-Martin, R. M.; Bradley, M., Knocking (Anti)- Sense into Cells: The Nanoparticle Approach to Gene Silencing. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, 20, (3), 422-426.
13. Tsakiridis, A.; Alexander, L. M.; Gennet, N.; Sanchez-Martin, R. M.; Livigni, A.; Li, M.; Bradley, M.; Brickman, J. M., Nanoparticle-based tracing and molecular delivery in embryonic stem cells. *Biomaterials* **2009**, 30, (29), 5853-5861.
14. Broceta, A.; Johansson, E. M.V.; Yusop, M.; Sánchez-Martín, R. M.; Bradley, M.; Synthesis of Polystyrene Nanoparticles and Functionalization with Pd0 Nanoparticles to perform Bioorthogonal Organometallic Chemistry in Living Cells. *Nature Protocols* **2012**, (7), 1207-1218
15. Yusop, M.; Unciti-Broceta, A.; Johansson, E. M.V.; Sánchez-Martín, R. M.; Bradley, M. Palladium-Mediated Intracellular Chemistry, *Nature Chem* **2011**, 239-243.

CO-52 “Chem-NAT: a unique chemical approach for nucleic acid testing”

M.A. Luque-González^{1,2}; M. Tabraue-Chávez³; R.M. Sánchez-Martín^{1,2}; S. Pernagallo³; J.J. Díaz-Mochón^{1,2}

¹ PTS Granada GENYO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University of Granada / Andalusian Regional Government; ² Dep. Medicinal and Organic Chemistry, School of Pharmacy, University of Granada; ³ DestiNA Genomica SL

Abstract

The chemical-based approach for nucleic acid “reading” presented in this project is able to identify nucleic acid sequences with very high specificity. Watson-Crick base pairing is harnessed to template a dynamic chemistry reaction on molecular probes based on “abasic” peptide nucleic acid (“DGL probes” by DestiNA Ltd.). These probes can be made complementary to any target nucleic acid forming a heteroduplex that will harbor a so called “chemical pocket”. A dynamic reaction between a set of aldehyde-modified nucleobases (“SMART Nucleobases” by DestiNA Ltd.) and the “abasic site” on the DGL probe will take place and it will lead to a final product which will be analyzed by MALDI-TOF MS.^{27.28.29.30}

Keywords

Peptide Nucleic Acid (PNA), DGL probes, SMART Nucleobases, Chemical pocket, MALDI-TOF, miRNA.

1 General Information and Introduction

1.1 Nucleic Acids

The nucleic acids DNA (deoxyribonucleic acid) and RNA (ribonucleic acid) are linear heteropolymers of four different monomers, called nucleotides. Nucleotides are composed of a sugar (β -D-deoxyribose in DNA and β -D-ribose in RNA), one or more phosphate groups and a heterocyclic base. There are 5 commonly occurring bases in nature, two of which are derivatives of purine, namely Adenine (A) and Guanine (G), and three pyrimidine, namely Cytosine (C), Thymine (T, present in DNA only) and Uracil (U, present in RNA only).

The nucleotide monomers are linked by 3'-5' phosphodiester bonds to form the polymer. The famous double-helical structure of DNA, inferred by Watson and Crick in 1953 arises from specific hydrogen bonding interactions between the base-pairs: G forms three hydrogen-bonds to C, and A forms two hydrogen-bonds to T (in DNA) or U (in RNA). In the DNA double helix, two antiparallel polynucleotide chains are coiled around a common axis, with the sugar phosphate backbone on the outside and the bases on the inside.

The sequence of bases in DNA or RNA strand uniquely characterizes the nucleic acid and represents a form of linear information. This heritable genetic information is stored as DNA in the nuclei of living cells and serves as a “recipe” for protein production (a three base sequence or “codon” codes for one amino acid in a protein). Expression of proteins by a cell involves transcription of the relevant sections of DNA into a class of RNA molecules called messenger RNA (mRNA), which then leave the nucleus and travel to the cytoplasm where

²⁷ Bowler, F, M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 1809-1812

²⁸ Bowler, F, *Analytical Methods*, **2011**, 3, 1656-1663

²⁹ Bowler, F, *Analytical Methods*, **2011**, 3, 1656-1663

³⁰ UK patent entitled “Nucleobase Characterisation” GB 0718255.3 filed on September 19, 2007 by Juan J. Diaz-Mochon and Mark Bradley (University of Edinburgh) and published on March 26, 2008 (WO/2009/037473).

they are translated into proteins. This translation process involves further RNA molecules called transfer RNA (tRNA) and ribosomal RNA (rRNA)³¹.

1.2 microRNAs (miRNAs)³²

miRNAs are a class of small (18–24 nt) non-coding regulatory RNAs that are involved in regulating gene expression at the post-transcriptional level. Primary miRNA (pri-miRNA) is cleaved by endonuclease RNase III Drosha in the nucleus, releasing the stem-loop pre-miRNA. Then the pre-miRNA is exported into the cytoplasm and cleaved by endonuclease Dicer before becoming mature miRNA, which is integrated into the RNA-induced silencing complex (RISC) to regulate target gene expression. Perfectly or imperfectly base pairing the 3' UTR of the target mRNA with the 5' end of miRNA causes genomic instability and transcriptional degradation, as well as translational repression. However, it is also reported that miRNA can induce target gene overexpression. The miRNA genome is often located at fragile genomic sites which are closely related to cancer. Their expression is deregulated due to genomic instabilities. The role of miRNAs in cancer was first suspected when it was observed in *C. elegans* and *Drosophila* that miRNAs controlled aspects of cell proliferation and apoptosis. Expression of various miRNAs has been reported to be differentially altered across a variety of tumor types, suggesting their direct involvement in oncogenesis. miRNAs are associated with embryogenesis and stem cell maintenance in mammals, hematopoietic stem cell differentiation, and cancers.

Many studies show that miRNA expression appears to be deregulated in cancer. MicroRNAs have recently been studied as biomarkers in peripheral circulation for cancer detection. However, the origin and value of these miRNAs have yet to be elucidated. It is widely believed that the circulating miRNAs might not only come from circulating tumor cells, but also be released into the blood stream directly via blood cells or other tissue cells affected by disease.

Cancer biomarkers are used for early detection, prognosis and therapeutic guidance. An ideal biomarker should be highly specific and sensitive with a high predictive value, which can be detected in a rapid and simple, yet accurate and inexpensive fashion. Here we present a novel method for detecting miRNAs. According to each target miRNA biological role, which will act as biomarker, a miRNA profiling could represent an interesting tool for an accurate diagnosis, prognosis and, even, personalized treatment for a wide range of disease, including different types of cancer.

1.3 Peptide Nucleic Acid

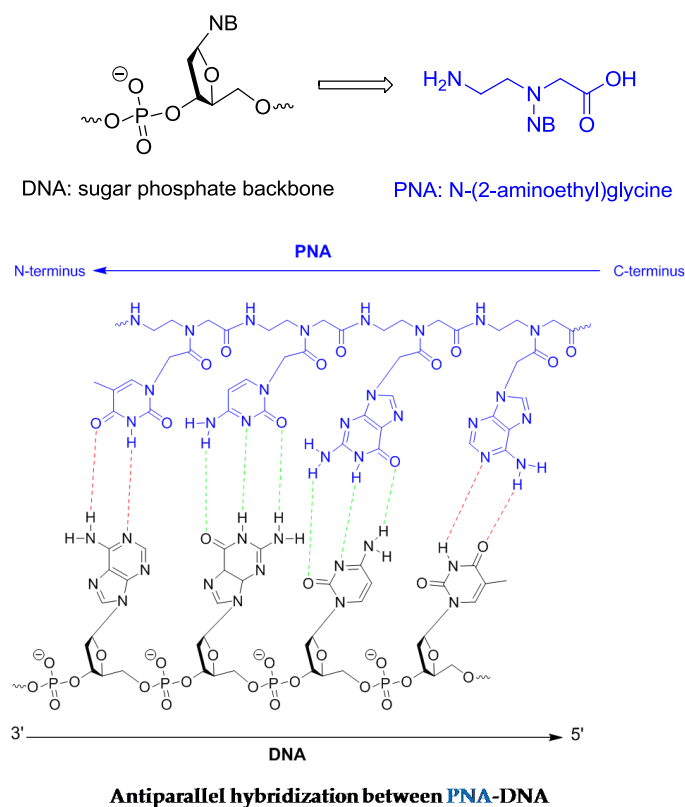
Peptide Nucleic Acid (PNA) is a structural mimic of DNA possessing an acyclic, achiral and uncharged pseudopeptidic backbone in which the sugar-phosphate groups of DNA have been replaced with repeating N-(2-aminoethyl)glycine units^{33,34}. Purine and pyrimidine bases are attached to this backbone through methylene carbon linkages. PNA can hybridize in an anti-parallel fashion (the 3'-end of DNA aligned with the N-terminus of PNA) complementary PNA, DNA and RNA to form very stable duplexes according to Watson-Crick base pairing rules.

³¹ J.M.Berg, J.L.Tymoczko and L.Stryer, in *Biochemistry*, 5th edn., W.H. Freeman and Company, New York, 2002, ch. 5, pp.117-142

³² Meng-Hsuan Mo, Liang Chen, Yebo Fu, Wendy Wang and Sidney W. Fu: Cell-free Circulating miRNA Biomarkers in Cancer. *Journal of Cancer* 2012; 3: 432-448

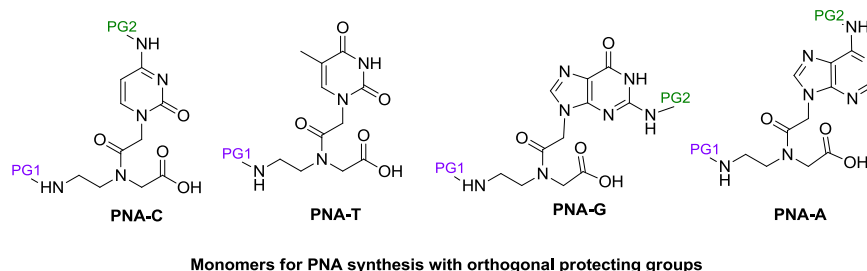
³³ M. Egholm, T. Bentin and P. E. Nielsen, in *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*, ed. P. E. Nielsen, Horizon Bioscience, Wymondham, Norfolk, 2nd edn., 2004, ch. 1, pp. 1-36.

³⁴ P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg and O. Buchardt, *Science*, 1991, **254**, 1497-1500.



Under physiological conditions, the binding affinity and selectivity of PNA towards DNA, RNA and PNA is higher than for the analogous DNA duplexes. This has been attributed to the neutral character of PNA and the resulting lack of electrostatic repulsion with a negatively charged sugar-phosphate backbone. Furthermore, PNA has a better discriminating power than DNA in that a base mismatch in a PNA/DNA duplex is more destabilizing than a mismatch in a DNA/DNA duplex. PNA oligomers are also resistant to enzymatic degradation by proteases and nucleases, which extends their lifetime *in vitro* and *in vivo*.

The pseudopeptidic nature of PNA means that straightforward solid-phase peptide synthesis (SPPS) techniques can be applied to their preparation³⁵. The monomeric building blocks for PNA (analogous to the nucleotide monomers of DNA) must employ orthogonal protecting groups for the backbone and the exocyclic amines of the nucleobases (A, G and C).



The unique chemical, physical and biological properties of PNA have stimulated attention at the interface of chemistry and biology, and a number of diagnostic and pharmaceutical applications have been sought such as gene therapy and mRNA profiling^{33,36}.

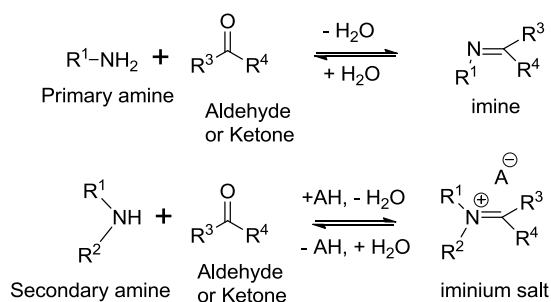
³⁵ L. Bialy, J. J. Diaz-Mochon, E. Specker, L. Keinicke and M. Bradley, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 8295-8305.

³⁶ A. Ray and B. Norden, *FASEB J.*, 2000, **14**, 1041-1060.

1.4 Dynamic Combinatorial Chemistry

Dynamic Combinatorial Chemistry (DCC) refers to the study of libraries (“dynamic combinatorial libraries”, DCLs) of compounds in which all the constituent species are in thermodynamic equilibrium. Library members are interconvertible through the formation of reversible covalent or noncovalent interactions, such that the library composition is determined by the thermodynamic stability of each of the library members. Those structures possessing the most favourable *inter* or *intramolecular* interactions will be more stable and will dominate over other library members.

Numerous types of reversible reaction have been used to mediate the interconversion of DCL members. These reversible reactions may involve noncovalent (e.g. hydrogen bonds), coordinative or covalent bonds. An example involving covalent bond formation is the reversible formation of imines (or “Schiff bases”) and iminium salts through the reaction of aldehydes or ketones with amines³⁷.



Reversible formation of imines from primary amines, and iminium salts from secondary amines, by reaction with aldehydes or ketones

1.5 Mass Spectrometry Detection: MALDI-TOF MS

A range of SNP genotyping methods has been developed that employ matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, or MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry) is routinely employed for the analysis of a range of biomolecules (e.g. peptides, proteins and nucleic acids) as a read-out tool^{38,39,40,41}. Briefly, laser energy is used to ionize the analyte which has been co-crystallized with a matrix of a small organic molecule, typically an acid. Different matrices are used depending upon the nature of the analyte. The matrix absorbs the energy of the laser and transfers some to the analyte, which is ionized. Since MALDI is a soft ionization technique it tends to produce little or no fragmentation. Although different analysis methods are possible, MALDI usually coupled with time-of-flight (TOF) detectors that distinguish between ions of differing mass-to-charge (m/z) ratio by measuring the time it takes them to reach a detector after acceleration across a potential difference into a flight tube (ions with a larger m/z ratio take longer to reach the detector)

2 Material and Methods

2.1 Materials

Aldehyde-modified nucleobases (“SMART Nucleobases”) and DGL probes containing a free secondary amine (“blank position” or “abasic site”) at defined locations were provided by DestiNA Ltd²⁷. Reactions were done by using synthetic DNA as template, in order to optimize

³⁷ P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J. L. Wietor, J. K. Sanders and S. Otto, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 3652-3711.

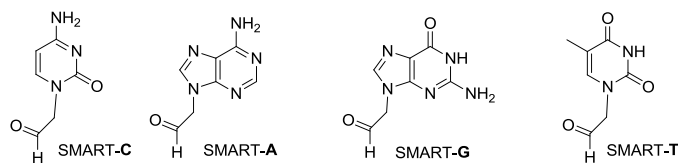
³⁸ J. Tost and I. G. Gut, *Clin. Biochem.*, 2005, **38**, 335-350.

³⁹ J. Tost and I. G. Gut, *Mass Spectrom. Rev.*, 2002, **21**, 388-418.

⁴⁰ K. Chughtai and R. M. A. Heeren, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 3237-3277.

⁴¹ J. Ragoussis, G. P. Elvidge, K. Kaur and S. Colella, *PLoS Genet.*, 2006, **2**, 920-929.

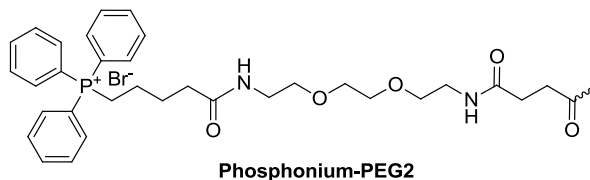
reaction conditions. Anion exchange resin Q Sepharose™ was obtained from GE Healthcare. Further work is being developed in order to obtain similar results with biological samples.



SMART Nucleobases (aldehyde-modified Nucleobases) used in the dynamic incorporation

2.2 Instrumentation: MALDI-TOF as read-out tool

Mass spectrometry, specifically, MALDI-TOF MS was selected as the detection method allowing the direct read-out of the reaction products without the need for additional probe or nucleobase labeling. PNA is well-suited to detection by MALDI-TOF MS as the neutral backbone renders it less prone to adduct formation and its ions (which tend to be singly charged) are more stable than those of DNA⁴². Triphenylphosphonium charge tags were used as N-terminal caps to enhance the MALDI-TOF detection limit. DGL probes were connected to the charge-tag through polyethylene glycol (PEG) spacers, which improves aqueous solubility of the pseudopeptidic backbone, and would also permit multiplexed analysis of template reactions by differentiating the probe masses to prevent overlap in the mass spectrum.



Phosphonium-PEG2

2.3 DNA-Templated Base Filling Reactions on a DGL probe

Typical protocol for DNA-templated reductive aminations: A DGL probe (2.5 mL, 40 mM aq.), DNA template (1 mL, 100 mM aq.), aldehydes A, G, C, and T (1.6 mL of each, 1.7 mM aq.), and pH 6 phosphate buffer (8.1 mL, 10 mM aq.) were combined in a 1.5 mL tube and placed in a Thermomixer at 80°C and 1200 rpm for 5 min. The reaction mixture was then cooled to 40°C (at 3°C/min) before NaBH₃CN (2 mL, 1 mM aq.) was added and shaking continued for 1 h. Pre-equilibrated Q Sepharose Fast Flow (5 mL) was added before the reaction mixture was agitated at room temperature for 20 min. The reaction tube was centrifuged and the supernatant removed, then the Q Sepharose was washed centrifugally with 3% MeCN in water (3 × 200 mL). Sinapinic acid matrix (10 μL) was added to the resin, and this mixture was spotted (1 μL in duplicate) onto a stainless steel MALDI plate.

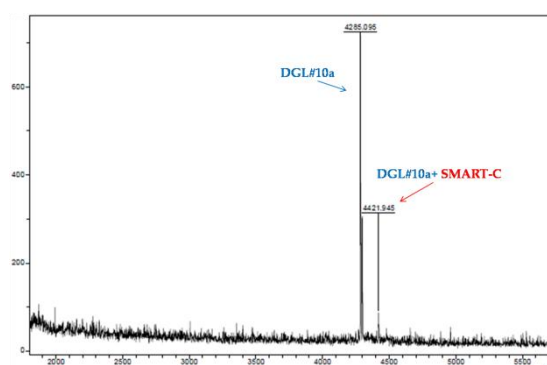
3 Results

Herein we report the application of dynamic chemistry to miRNA detection. This was achieved by the synthesis of DGL probes (DGL#10a and DGL#10b) that contained a “blank” position opposite a nucleobase under analysis in a complementary synthetic DNA template whose sequences were the same than the one in our target miRNAs. A reversible reaction, between these DGL/DNA duplexes (specifically the secondary amine of the “blank position”) and four aldehyde-modified nucleobases means that the templating power of Watson-Crick base pairing would drive the selection of the fully complementary iminium nucleobase. Subsequent reduction and MALDI-TOF MS would allow rapid determination of base incorporation. Because of the previously observed better performance of SMART-C, all the DGL probes were designed so that the “blank position” was opposite a G in the DNA template.



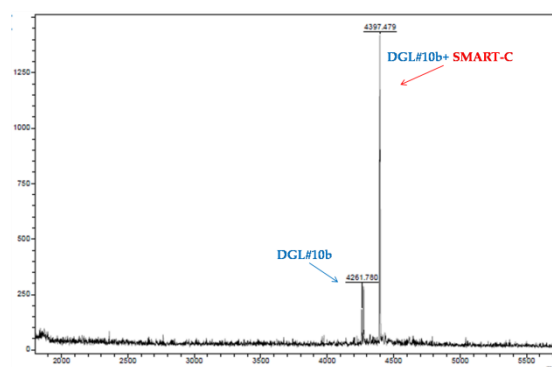
⁴² P. Jiang-Baucom, J. E. Girard, J. Butler and P. Belgrader, *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 4894-4898.

DGL#10a: C- GA CAT CTA GG_ TTA -N



DNA10b: 5'-TAC CCT GTA GAA CCG AAT TTG TG-3'

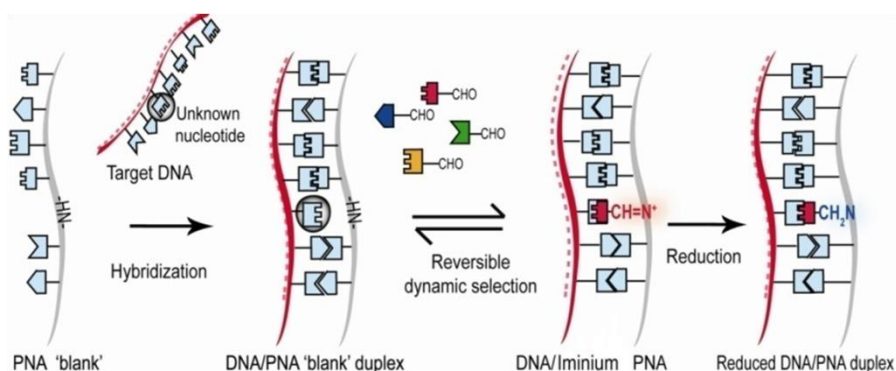
DGL#10b: C- CAT CTT GG_ TTA AA -N



4 Discussion

The strategy underpinning this project applies dynamic chemistry to PNA for the development of an entirely novel method of Nucleic Acids (NA) sequence analysis²⁷. The chemical-based approach for nucleic acid testing (Chem-NAT) commercialized by DestiNA Genomics had been validated by genotyping, with 100% read accuracy, using DNA from mouth swabs from Cystic Fibrosis patients and mass spectrometry (MALDI-TOF) for analysis

It was hypothesized that Watson-Crick base pairing could be harnessed to template a dynamic reaction on a “DGL probe”. DGL probes consist of a PNA backbone containing a nucleobase-free position in which there is a free secondary amine (so called “abasic site” or “blank” position). DGL probes can be made complementary to any target NA and they will be designed so that the “blank position” will lay opposite a nucleotide under interrogation on a complementary NA strand. A reversible reaction, between an aldehyde-modified nucleobase (“SMART Nucleobase”) and the free secondary amine at the blank position of the DGL probe would generate an iminium intermediate that could be reduced and analyzed. In the presence of all four aldehyde-modified nucleobases (i.e. adenine, thymine, guanine and cytosine derivatives) the NA template would stabilize the iminium species with the correct hydrogen-bonding motif (obeying Watson-Crick base pairing), thereby amplifying it over the other possible iminium products. This would be reflected in the final product distribution after reduction to the corresponding amine^{27,30}.



Sequence specific NA-templated reductive amination on a DGL probe

The resulting mass spectra would demonstrate a selective incorporation of the nucleobase complementary to the templating base on the NA strand. The DGL probe signals suggested complete dehybridization from the NA template, which may occur either upon addition of the acidic matrix or during desorption/ionization in the mass spectrometer. In each reaction, some unreacted probe was observed together with a peak of +14Da. This is hypothesized to be the result of a borane adduct due to the available free amine at the blank position of the probe.

Under these conditions, guanine and cytosine are incorporated in greater yield and more selectively than either adenine or thymine (attributed to the greater number of templating hydrogen-bonds). A control reaction in the absence of DNA has demonstrated the role of the DNA template in promoting selective nucleobase incorporation. The reductive amination reaction gave good sequence-selectivity which supports the hypothesis that dynamic iminium formation provides a route to reverse the generation of mis-templated products^{27,28,29}.

5 Conclusions

The chemical-based approach for nucleic acid reading proposed in this project represents the first step in the development of a novel suite of assays for the medical diagnostic field. We aim to create highly innovative products with a true diagnostic potential and utility for rapid detection of nucleic acids, focusing on microRNAs due to their putative role in cancer development.

6 Acknowledgements

DestiNA Genomica SL whose employees are supporting this project and M.A.L.G. PhD. This research is partly supported by the FP7-PEOPLE-2012-CIG grant

CO-53 Development of conjugation strategies for delivery of nucleic acids mediated by polystyrene nanoparticles

Victoria Cano-Cortés,^{1,2} Juan Diego Unciti-Broceta,^{1,2} Juan José Díaz-Mochón,^{1,2} Rosario M. Sánchez-Martín^{1,2}

¹ Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENyO), P. T. Ciencias de la Salud, ² Dep. Medicinal and Organic Chemistry, School of Pharmacy, University of Granada; victoria.cano@genyo.es

Abstract

The efficient introduction and delivery of bioactive materials into cells (such as a drug, protein, nucleic acid, etc) to elicit, induce or control specific biological functions is of fundamental importance throughout many areas of biology and medicine. The ability to add a specific plasmidic DNA into cells to modify cellular function or to deliver RNA sequences into cells to silence a cellular function has significant applications in Biomedicine. However, their cellular access can often be severely limited by properties such as solubility, charge or size. Several techniques for the delivery of these therapeutic molecules are in development such as cationic lipids, polymers and nanoparticles. However, due to certain issues (such as poor uptake efficiencies, major perturbations of cellular function or high cellular mortality) there is still a need to improve transfection efficiency for specific cell lines that are difficult to transfect.

Herein we present our last advances in the development of nanotechnology-based transfection agents. For this purpose, several chemical strategies, based on solid phase chemistry, and basic molecular biology techniques has been optimized for the conjugation of DNA to nanoparticles.

Keywords

Polystyrene nanoparticles, DNA delivery system, transfection, bioconjugation.

1 Introduction

Gene therapy has gained significant attention over the past two decades as a potential method for treating genetic disorders such as severe combined immunodeficiency, cystic fibrosis, and Parkinson's disease, as well as an alternative method to traditional chemotherapy used in treating cancer.¹

The development of efficient carrier system for the delivery of plasmid DNA into cells is key to achieve research progression in biological sciences. In the last few years, different technologies and methodologies have been developed in order to efficiently deliver nucleotides at the cellular level. Examples include cell penetrating peptides², peptidomimetics as cationic liposomes², nanodevices such as nanoparticles⁴⁻⁷ and quantum dots⁸ or invasive techniques such as particle bombardment⁹. In particular polymer mediated delivery offers many advantages over more traditional methods. For instance, oligonucleotides can be encapsulated within polymer microparticles, which can then release their cargo intracellularly in a tunable manner. Such systems include cationic polymers^{10,11}, poly(amidoamine)s¹² and copolymers¹³. Even though all these approaches are currently available, there is still a need to improve transfection efficiency for specific cell lines that are difficult to transfect.

Previously, we have reported the application of polymeric nanoparticles as a cellular delivery and tracking device capable of introducing a range of biological and chemical modalities into cells. Our research team have developed the synthesis and application of multifunctionalised, cross-linked, polystyrene nanoparticles, which as mentioned previously, are taken up by the great majority of cell types studied so far¹⁴⁻²⁰. Importantly, the nature of these synthetic beads allows multistep solid-phase chemistry and the possibility to bind any molecule/sensor/nucleic acid to them. Populations of cells containing beads can be readily sorted from other cells for

subsequent analysis with very high, but controllable, uptake rates that can be modulated through changing the bead size and incubation time.¹⁵ To be able to follow the movement of nanoparticles inside cells and to study their cellular uptake, nanoparticles have been covalently labelled with several dyes. The fact that the nanoparticles could be labelled with different fluorescent molecules was very important because it meant that standard organic and solid-phase protocols to nanoparticles coupling could be successfully applied. This opens a great number of possibilities for the application of these nanoparticles because it means that many different molecules could be bound to them.

Cargoes delivered to-date include proteins (such as Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) and β -Galactosidase), oligonucleotides (siRNA), and sensors for measuring intracellular pH and calcium ions, all of which have been demonstrated to be fully functional once internalized¹⁴⁻¹⁸.

By using amino functionalised polystyrene nanoparticles changes in the concentration of intracellular Ca^{2+} ions in single living cells in real time could be measured. The fact that nanoparticles are firmly retained for several days also allows changes in the concentration of intracellular Ca^{2+} ions to be followed in a single cell for much longer periods of time than when using established sensors. These results open the door to a range of possible applications, such as nanoparticles acting as carriers of sensors for enzymatic activity assays¹⁴. Remarkably, sensor immobilization on to nanoparticles avoids the dilution and cellular degradation observed with other conventional sensors.

Additionally these nanoparticles have been used as intracellular pH sensors in living cells and successfully proven by using a number of different techniques such as spectrofluorometry, fluorescence microscopy and flow cytometry.¹⁶ Covalent binding of fluorescein to nanoparticles significantly improves the stability of the indicator over time and eliminates escape. At the same time it retains the properties of fluorescein for pH sensing. These fluorescein-loaded nanoparticles provide a reliable way to complete long-term cell monitoring studies.

These nanoparticles have been used for the delivery of small sequences of RNA. In particular, Green fluorescent protein (GFP) expressed in human ovarian cancer (HeLa) cells has been successfully silenced using amino functionalised siRNA linked to 500 and 200 nm nanoparticles via cleavable and non-cleavable linkers.¹⁷

The application of these nanoparticles for tracking and molecular delivery in embryonic stem cells has been reported.¹⁸ Amino functionalised polystyrene nanoparticles were employed for the coupling and efficient delivery of a variety of cargoes into both undifferentiated and differentiated embryo derived stem cells. Cargoes included proteins, siRNAs and fluorescent dyes. Thus, nanoparticles represent an effective means to introduce biological cargoes into real time differentiating ES cell cultures, opening a new area of research in the transfection of Stem Cells.

Recently we have developed a method for the activation of molecules by carrying on palladium-catalyzed chemical reactions inside living cells using a metal as toxic as palladium without inducing cellular death. This was possible by immobilizing palladium nanoparticles on nanoparticles which allowed the catalytic activity of palladium while avoiding palladium cellular toxicity.¹⁹⁻²⁰

The fact that these nanoparticles are easy to functionalise with high controllability over cargo loading and they are taken up by cells with any undesired cytotoxic effects observed, make them enormously attractive as carrier/delivery systems in molecular biology. The opportunity to sort cells individually based on the number of beads per cell, allowing defined cellular doses, is very important for the application of nanoparticles in the field of molecular biology. Therefore, nanoparticles are shown as a potential transfection agent. Herein several chemical strategies, based on solid phase chemistry, and basic molecular biology techniques has been optimized for the conjugation of DNA to nanoparticles and an evaluation of selective release has been carried out.

2 Materials and Methods

2.1. Preparation of carboxy functionalised nanoparticles

2.1.1. Preparation of PEGylated nanoparticles (3)

Amino functionalized nanoparticles **1** (1 mL; 1eq) were washed in DMF (3 x 1 mL) and suspended in DMF (1 mL). Separately, Fmoc-PEG-OH (5eq) was dissolved in DMF (1 mL), then Oxyma and DIC (5 eq) was added and the solution mixture mixed for 8-10 minutes at rt. The solution mixture was then added to amino nanoparticles. The suspension was mixed on the Thermomixer at 1400 rpm for 2 hours at 60°C. *Fmoc deprotection* was achieved by treating nanoparticles with 20% piperidine/DMF (1 mL; 3 x 20 minutes). PEGylated nanoparticles **3** were obtained by centrifugation and subsequently washed with DMF (3 x 1 mL), MeOH (3 x 1 mL), deionised water (3 x 1 mL) and finally DMF (3 x 1 mL). Next, ninhydrin test was performed to check the presence of primary amine.

2.1.2. Preparation of carboxy functionalised nanoparticles (4)

PEGylated nanoparticles **3** (1 mL; 1eq) were washed in DMF (3 x 1 mL) and suspended in DMF (1 mL). Separately, 3,3'-Dithiodipropionic acid (Sigma- Aldrich, 5 eq) was dissolved in DMF (1 mL), then DIC (2.5 eq) was added and the solution mixture mixed for 8-10 minutes at rt. The solution mixture was then added to amino nanoparticles and DIPEA (0.1 eq) was added. The suspension was mixed on the Thermomixer at 1400 rpm for 2 hours at 60°C. Nanoparticles **4** were obtained by centrifugation and subsequently washed with DMF (3 x 1 mL), MeOH (3 x 1 mL), deionised water (3 x 1 mL).

2.2. DNA linearization and aminoallyl-dUTP incorporation

2.2.1. Plasmid DNA linearization

pCEP-EGFP (11kb) plasmid containing the coding sequence for human EGFP protein, cloned into the vector pCEP 4 was used. Linearisation of 5µg DNA required 5U of restriction endonuclease and was incubated at 60°C for 2 hours. *Protocol:* A cocktail mix containing 1x digestion buffer, 1U restriction enzyme/µg DNA in molecular biology grade water was prepared. pDNA (pCEP-EGFP) was added to the cocktail mix and incubated at 60°C for 2 hours.

2.2.2. Analytical electrophoresis gel

Efficiency of restriction digest was analysed by agarose gel electrophoresis. *Protocol:* Agarose electrophoresis gel was performed on 1x Tris-Acetate-EDTA buffer. Samples were loaded at 0.5µg in 1x Blue juice loading dye where a 1 kb molecular weight DNA was used as ladder. Gel was visualised by UV.

2.2.3. Ethanol precipitation

Linear DNA (IDNA) was ethanol precipitated and resuspended in molecular biology grade water. *Protocol:* To precipitate IDNA, 1/10 volume of 3M Sodium Acetate and 3 volumes of ethanol were added to the DNA solution. DNA was precipitated at -20°C for 18 hours. The DNA was pelleted by centrifugation, ethanol aspirated to allow the DNA to air-dry and then be resuspended in molecular biology grade water at 1µg/µl.

2.2.4. Aminoallyl-dUTP incorporation

Terminal deoxynucleotidyl transferase (New England BioLabs) addition of 2 mM aminoallyl-dUTP (Sigma Aldrich) to the 3' end of the linear DNA was performed at 37°C for 30 min,

with subsequent enzyme deactivation for 10 min at 70°C. *Protocol:* DNA was added to a solution containing 1x TdT buffer, CoCl₂, 10 mM aa-dUTP and 1U TdT/μg DNA and incubated at 37°C for 30 min. The enzyme was then inactivated by heating up to 70°C for 10min. The DNA **6** was then ethanol precipitated as described above in 2.2.3.

2.2.5. DNA-nanoparticles conjugation (7)

Carboxy functionalised nanoparticles (**4**) (0.1 mL; 1eq) were washed in 0.1M MES buffer pH 5.5 (0.1 mL x 3 times) and suspended in 0.1 M solution of EDC in 0.1M MES buffer pH 5.5 (0.2 mL) and solution mixed for 4 hours at rt. After mixing, nanoparticles were collected by centrifugation and nanoparticles resuspended in PBS pH 7.4, then DNA **6** solution (0.02 mL, 1μg/μl) was added and the solution mixture mixed at room temperature for 18 hours to yield nanoparticles-DNA conjugates (**7**).

2.3. Evaluation of disulfide bond breakage

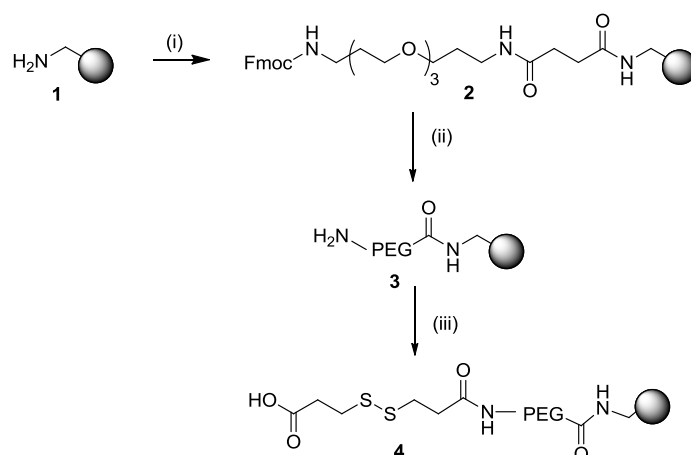
Nanoparticles-DNA conjugates (**7**) were suspended in 30 μl of complete DMEM and treated with a 5 mM and 50 mM solution of DL-Dithiothreitol (Sigma Aldrich) and 2-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich). IDNA unconjugated, naked nanoparticles and DNA conjugated to nanoparticles via a non – cleavable linker were used as a negative control. Following 24 hours of incubation at 37°C on an incubator (BINDER), all samples were loaded at 150 ng in 1x Blue juice loading dye where a 1 kb molecular weight DNA was used as ladder. Gel was visualised by UV.

3 Results

3.1. Funtionalization of polystyrene nanoparticles

In a first stage of this research, several chemical steps for microsphere conjugation to DNA were designed. These strategies are based on a solid phase approach (a Fmoc solid phase protocol using Oxyma/DIC as coupling reagents). Conjugation of large biomolecules, such as DNA, is always complex due to compatibility issues with standard organic solvents and also to difficult purification processes that are required. Solid-phase chemistry protocols using these nanoparticles, being developed by our research group, address these two problems: chemical reactions can be done in both organic and water based solvents and purification steps are easy to be done as this is achieve by doing series of simple centrifugation cycles to remove excess of reagents and sideproducts from biomolecule-microsphere conjugates.

A monodispersed population of 205 nm aminofunctionalized cross-linked polystyrene nanoparticles (**1**) was obtained by dispersion polymerization as previously described.^{15,19} Firstly PEGylation of amino functionalized polystyrene nanoparticles (**1**) was performed. This PEGylation increases the biocompatibility of these nanoparticles and consequently their transport across cell membrane will be facilitated. Additionally, unfavorable interactions between nanoparticles and DNA will be reduced, increasing the efficiency of the conjugation of the polynucleotide cargo to the nanoparticle. Secondly, a release strategy was carried out by conjugation of an intracellular cleavable linker, dithiopropionic acid, to PEGylated nanoparticles (**3**). This disulfide bridge will be cleavage by intracellular glutathione releasing the desired cargo. (**Scheme 1**).



Reagents and Conditions: (i) Fmoc-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine succinamic acid (PEG), Oxyma, DIC, DMF, 60 °C, 1400rpm, 2h, 100%; (ii) 20% piperidine in DMF; (iii) ácido dithiopropionico, Oxyma, DIC, DMF, 60 °C, 1400rpm, 2h, 100%.

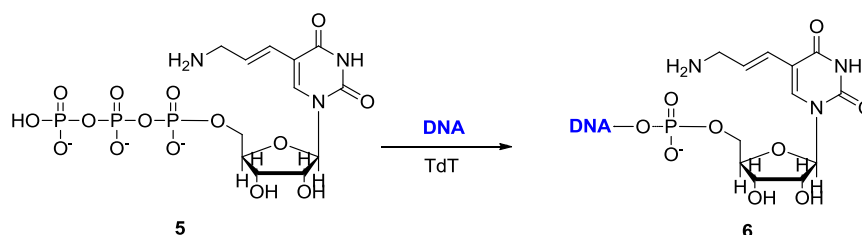
Scheme 1. Functionalization of nanoparticles

3.2. DNA linearization and functionalization

The conjugation of pDNA to nanoparticles was carried out by incorporation of modified nucleobases. An established molecular biological approach to linearise and functionalise pDNA with a terminal functionalized base using Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) will enabled its conjugation to nanoparticles. These strategy has been carried out using an amino modified nucleobase (aminoallyl-dUTP, **5**) as functionalized base to be incorporated to pDNA and disulfide bridge as chemical strategy (**Scheme 2**).

For this study Green Fluorescent Protein (GFP) was chosen to be expressed as model to prove this concept. For this purpose pCEP-EGFP (11kb) plasmid containing the coding sequence for human EGFP protein, cloned into the vector pCEP 4 was used. Linearisation was done using a specific restriction enzyme (BstEII) that digests downstream. Then, an amino functionalization was carried out by incorporation of a modified nucleotide 5-(3-aminoallyl)-2'-deoxyuridine 5'''-triphosphate (dUTP) to the 3'-overhangs.

The modified dUTP was readily incorporated by Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). TdT is a specialized DNA polymerase wich catalyse the addition o nucleotides to the 3'-terminus of a DNA molecule (**Scheme 2**). In order to test if the restriction and nucleobase incorporation had been performed successfully, an agarose gel (0.8 %) electrophoresis was carried out to check the efficiency of this procces. As can be seen in **Figure 1** digestion was successful as indicated by linear DNA (IDNA) and plasmidic DNA (pDNA) running differently through the gel. It is important to recall that even though the molecular wight of pDNA and IDNA is the same, the run differently because linearised DNA migrates faster through the gel than plasmid or circular DNA.



Scheme 2. Amino functionalization of linearized DNA using TdT.

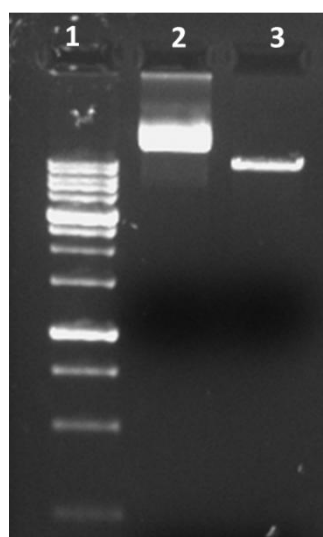
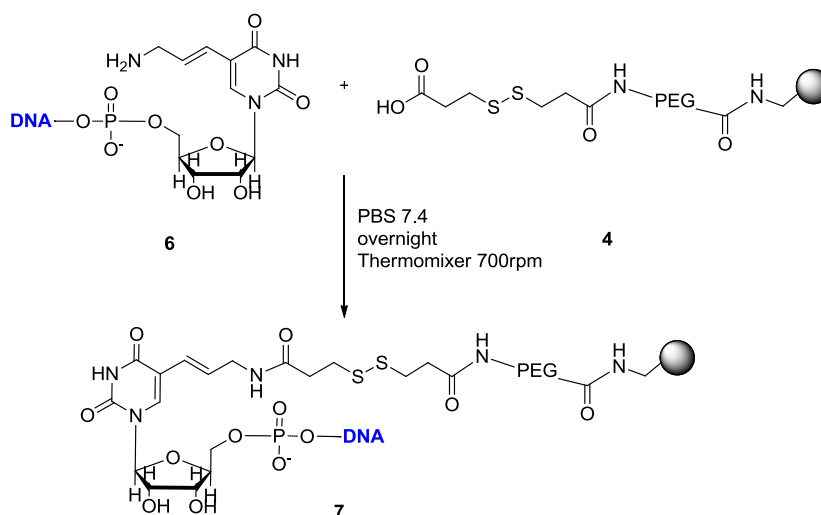


Figure 1. Agarose Gel Electrophoresis of linearised DNA compared to pDNA. Line 1: DNA ladder (2-log NEB), line 2: pCEG-EGFP, line 3: linearised CEG-EGFP.

3.3. Conjugation of DNA to nanoparticles

The next step was the conjugation of amino functionalized linearised DNA (**6**) to carboxyfunctionalised polystyrene nanoparticles (**4**). As said previously, the conjugation involved an amino modified nucleotide that has been incorporated into the DNA sequence (*section 3.2*), which subsequently reacted with the carboxylic group present on nanoparticles, to form an amide bond. The aminoallyl modification enables downstream reaction with amine-reactive compounds such as activate ester in a single step; thus aminoallyl –modified IDNA could be conjugated into activated carboxyfunctionalised nanoparticles using a water soluble carbodiimide (**Scheme 3**).



Scheme 3. Conjugation of DNA to nanoparticles.

3.4. Evaluation of efficiency of disulfide as DNA release strategy.

DNA has been coupled to nanoparticles via a disulphide linker which could be cleaved intracellularly by endogenous glutathione. Glutathione is a reducing molecule which is present naturally in living cells. To evaluate the release efficiency of DNA using this approach, DNA-nanoparticle conjugate **7** was suspended in culture media (DMEM complete media) for 24 h and subsequently treated with 5mM and 50mM dithiothreitol (DTT) or mercaptoethanol *ex vivo* for 30 minutes. Unconjugated DNA and DNA conjugated to nanoparticles via a non-cleavable linker were used as control.

Figure 2 shows results obtained by agarose gel electrophoresis. It can be observed that the DNA is efficiently released from the nanoparticle following treatment with both reducing agents. Additionally it can be observed that the DNA-nanoparticle conjugate is stable in cell culture media.

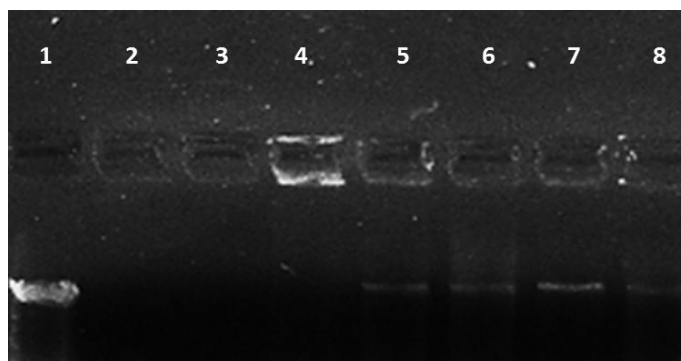


Figure 1. Evaluation of release of DNA from nanoparticles. Agarose gel electrophoresis. Line 1: unconjugated DNA, Lines 2 and 3: naked nanoparticles **4** (without DNA), Line 4: DNA conjugated to nanoparticles via non cleavable linker, Lines 5-8: conjugate **7** treated with 5 mM DTT (line 5), 50mM DTT (line 6), 5mM mercaptoethanol (line 7) and 50 mM mercaptoethanol (line 8).

4 Discussion

Gene therapy has a huge therapeutic potential for the treatment of several diseases. The efficiency of current available transfection systems is limited by toxicity issues. Additionally, there are some cell lines that are hard to transfect. The design of noninvasive, nontoxic, and efficient DNA delivery method with the potential to be applied to transfection-resistant cells is of maximum relevance to implement gene therapy.

The aim of this research work was to develop an efficient and safe transfection technology based on the use of polystyrene nanoparticles for DNA delivery. The preparation of the carboxy functionalised nanoparticles with the disulphide bridge has been carried out efficiently. In another hand, a molecular biology based protocol for the linearization and TdT incorporation of an aminofunctionalised nucleotide has been successfully developed. However when DNA-nanoparticle conjugate was treated with reducing agents to break the disulphide bridge, the amount of DNA released from the nanoparticle is low (as it can be observed in Figure 3) and further studies should be carried out to improve the loading of DNA on each nanoparticle. Consequently, an optimisation of the DNA : nanoparticle ratio should be carried out to achieve a maximum efficiency of the transfection agent. Furthermore, the efficiency of this nanodevice should be compared to commercial available transfection agents.

5 Conclusions

In conclusion, an efficient approach for microsphere-mediated delivery of plasmid DNA has been developed. Basic molecular biology techniques were used to linearize and functionalize plasmid DNA by aminomodification, enabling efficient conjugation to carboxy-functionalized microspheres. Based on solid phase protocols previously developed in our research team, a strategy for the conjugation and selective delivery of DNA using polystyrene nanoparticles has been successfully developed. Future work will be focussed in the *in vitro* evaluation of these DNA-nanoparticle conjugates using a cell line hard to transfect.

Acknowledgements . This research was partially supported by a Marie Curie Career Integration Grants within the 7th European Community Framework Programme (FP7-PEOPLE-2011-CIG-Project Number 294142).

6 References

1. Meredith A. Mintzer and Eric E. Simanek; Nonviral Vectors for Gene Delivery *Chem. Rev.* 2009, 109, 259–302
2. Trabulo, S.; Mano, M.; Faneca, H.; Cardoso, A. L.; Duarte, S.; Gomes, P.; Simoes, S.; Pedroso de Lima, M. D., Association of S4(13)-PV cell penetrating peptide with cationic liposomes: A synergistic effect on the intracellular delivery of plasmid DNA. *Journal of Peptide Science* 2008, 14, (8), 135-135.
3. Blum, J. S.; Saltzman, W. M., High loading efficiency and tunable release of plasmid DNA encapsulated in submicron particles fabricated from PLGA conjugated with poly-L-lysine. *Journal of Controlled Release* 2008, 129, (1), 66-72.
4. Gu, W. W.; Xu, Z. H.; Gao, Y.; Chen, L. L.; Li, Y. P., Transferrin-mediated PEGylated nanoparticles for delivery of DNA/PLL. *Nanotechnology* 2006, 17, (16), 4148-4155.
5. Mok, H. J.; Park, T. G., Direct plasmid DNA encapsulation within PLGA nanospheres by single oil-in-water emulsion method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008, 68, (1), 105-111.
6. Noh, S. M.; Kim, W. K.; Kim, S. J.; Kim, J. M.; Baek, K. H.; Oh, Y. K., Enhanced cellular delivery and transfection efficiency of plasmid DNA using positively charged biocompatible colloidal gold nanoparticles. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 2007, 1770, (5), 747-752.
7. Xu, Z. P.; Walker, T. L.; Liu, K. L.; Cooper, H. M.; Lu, G. Q. M.; Bartlett, P. F., Layered double hydroxide nanoparticles as cellular delivery vectors of supercoiled plasmid DNA. *International Journal of Nanomedicine* 2007, 2, (2), 163- 174.
8. Zhang, P.; Liu, W., ZnO QD@PMAA-co-PDMAEMA nonviral vector for plasmid DNA delivery and bioimaging. *Biomaterials* 2010, 31, (11), 3087-3094.
9. Uchida, M.; Li, X. W.; Mertens, P.; Alpar, H. O., Transfection by particle bombardment: Delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 2009, 1790, (8), 754-764.
10. Villa, A.; Marziliano, N.; Dina, G.; Biffi, A.; Conese, M., Comparison between Cationic Polymer and Lipid in Plasmidic DNADelivery to the Cell Nucleus. *The Open Gene Therapy Journal* 2009, 2, (8), 21-28.

11. Wilschut, K. J.; van der Aa, M.; Oosting, R. S.; Hennink, W. E.; Koning, G.A.; Crommelin, D. J. A.; Mastrobattista, E., Fluorescence in situ hybridization to monitor the intracellular location and accessibility of plasmid DNA delivered by cationic polymer-based gene carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *72*, (2), 391-396.
12. Peng, L.; Liu, M.; Xue, Y. N.; Huang, S. W.; Zhuo, R. X., Transfection and intracellular trafficking characteristics for poly(amidoamine)s with pendant primary amine in the delivery of plasmid DNA to bone marrow stromal cells. *Biomaterials* **2009**, *30*, (29), 5825-5833.
13. Cavallaro, G.; Scire, S.; Licciardi, M.; Ogris, M.; Wagner, E.; Giammona, G., Polyhydroxyethylaspartamide-spermine copolymers: Efficient vectors for gene delivery. *Journal of Controlled Release* **2008**, *131*, (1), 54-63.
14. Sanchez-Martin, R. M.; Cuttle, M.; Mittoo, S.; Bradley, M., Microsphere based real-time calcium sensing. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, (33), 5472-5474.
15. Sanchez-Martin, R. M.; Muzerelle, M.; Chitkul, N.; How, S. E.; Mittoo, S.; Bradley, M., Bead-based cellular analysis, sorting and multiplexing. *ChemBiochem* **2005**, *6*, (8), 1341-1345.
16. Bradley, M.; Alexander, L.; Duncan, K.; Chennaoui, M.; Jones, A. C.; Sanchez-Martin, R. M., pH sensing in living cells using fluorescent microspheres. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, (1), 313-317.
17. Alexander, L. M.; Sanchez-Martin, R. M.; Bradley, M., Knocking (Anti)- Sense into Cells: The Microsphere Approach to Gene Silencing. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, (3), 422-426.
18. Tsakiridis, A.; Alexander, L. M.; Gennet, N.; Sanchez-Martin, R. M.; Livigni, A.; Li, M.; Bradley, M.; Brickman, J. M., Microsphere-based tracing and molecular delivery in embryonic stem cells. *Biomaterials* **2009**, *30*, (29), 5853-5861.
19. Broceta, A.; Johansson, E. M.V.; Yusop, M.; Sánchez-Martín, R. M.; Bradley, M.; Synthesis of Polystyrene Microspheres and Functionalization with Pd0 Nanoparticles to perform Bioorthogonal Organometallic Chemistry in Living Cells. *Nature Protocols* **2012**, (7), 1207-1218
20. Yusop, M.; Unciti-Broceta, A.; Johansson, E. M.V.; Sánchez-Martín, R. M.; Bradley, M. Palladium-Mediated Intracellular Chemistry, *Nature Chem* **2011**, 239-243

CO-56 Ensayo In Vivo de Sistemas Terapéuticos Transdérmicos

Herminia Castán¹, M^a Carmen Leiva², Raúl Ortiz³, Beatriz Clares¹ y M^a Encarnación Morales¹

¹Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

²Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER). Departamento de Anatomía y Embriología Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.

³Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER). Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén.

Resumen

La incidencia de cáncer de piel ha aumentado en los últimos años con efectos significativos en la salud pública. La queratosis actínica puede ser la primera etapa en el desarrollo de un cáncer de piel siendo 5-fluorouracilo el fármaco citostático de elección por su eficacia en diferentes formas de cáncer de piel como la queratosis actínica. Por otro lado, ha surgido un interés creciente en los sistemas terapéuticos transdérmicos que permitan la administración sistémica o el efecto localizado de fármacos debido a las numerosas ventajas que presentan. Por ello, el objetivo principal de este trabajo es el diseño de un sistema terapéutico transdérmico que controle y facilite la permeación de 5-fluorouracilo en el tratamiento de la queratosis actínica así como su comparación con sistemas tradicionales de 5-fluorouracilo.

En concreto, se ha llevado a cabo un ensayo in vivo en ratones para determinar la cantidad de fármaco retenido en la piel expuesta a las preparaciones tras un tiempo determinado de aplicación de las mismas.

Los resultados obtenidos muestran que la cantidad y el porcentaje cedido son mayores en los parches que en las pomadas así como la cantidad cedida por cm² de piel. La cantidad cedida es 40,62 µg/cm² en los parches, en la pomada al 0,7 % y 5 % es 19,35 µg/cm² y 14,79 µg/cm², respectivamente. En consecuencia, podemos afirmar que la cantidad cedida en ambas pomadas es similar constituyendo los parches el sistema que permite una mayor permeación de 5-fluorouracilo (16,51 %).

Palabras clave

Queratosis actínica, sistema terapéutico transdérmico, 5-fluorouracilo, ensayo *in vivo*.

1 INTRODUCCIÓN

La incidencia de cáncer de piel ha aumentado en los últimos años con efectos significativos en la salud pública siendo un problema internacional que abarca todos los países del mundo. La queratosis actínica puede ser la primera etapa en el desarrollo de un cáncer de piel y por consiguiente, se le considera una condición precancerosa de la piel. En este sentido es fundamental el tratamiento de los carcinomas en su fase inicial debido a que, aunque no se pueden considerar melanomas, en el 50 % de los pacientes pueden llegar a serlo en los siguientes 5 años. Se estima que una de cada seis personas desarrollará una queratosis actínica, que puede ser la primera etapa de un cáncer de piel, a lo largo de su vida. La queratosis actínica es la presencia de manchas gruesas, con escamas o costras en la piel, la base puede ser clara u oscura, de color tostado, rosado o rojo, o una combinación de ellos, o bien del mismo color que la piel, la escama o costra es dura, seca y áspera y se detecta más fácilmente al tacto que a la vista. Esta patología evoluciona lentamente y aparecen con mayor frecuencia en áreas fotoexpuestas, causadas por la exposición prolongada a los rayos ultravioleta solares. Estas lesiones inducidas por los rayos ultravioletas son las lesiones cutáneas más comunes con potencial maligno que podrían

progresar a un carcinoma de células escamosas. El riesgo de que las lesiones no tratadas progresen a una lesión maligna es muy alto, si bien el reconocimiento y el tratamiento oportunos pueden ayudar a prevenir esta progresión. No obstante, estas lesiones no suelen poner a riesgo la vida si se detectan y se tratan en las primeras etapas. Sin embargo, si esto no sucede, pueden aumentar de tamaño e invadir los tejidos circundantes, formar metástasis o extenderse a órganos internos y convertirse en carcinomas de células escamosas. Por ello, es importante detectar, diagnosticar y tratar esta patología así como su prevención adoptando diferentes medidas como la utilización de cremas protectoras con un factor de protección solar alto y evitando o reduciendo la exposición al sol, especialmente durante las horas en las que la luz solar es más intensa.

El 5-fluorouracilo es un fármaco citostático muy utilizado por su eficacia en diferentes formas de cáncer de piel, como la queratosis actínica o carcinoma cutáneo. Existen estudios donde se demuestra la eficacia de este principio activo en este tipo de patología y dónde se compara la eficacia y tolerabilidad de cremas de fluorouracilo al 0,5 % y 5 % en el tratamiento de la queratosis actínica (Levy y col., 2001; Loven y col., 2002; Werschler, 2008). Sin embargo, esta forma de administración conllevan un problema asociado como es la reducida permeabilidad del fármaco y la irritación que causa en la piel sana (Paolino y col., 2007), lo que provocaría un efecto terapéutico insuficiente. Este inconveniente se podría solventar, desde el punto de vista tecnológico, mediante el empleo de formas transdérmicas.

La investigación de nuevas formas farmacéuticas así como la utilización de nuevas formas de administración nos obliga a plantearnos objetivos que contribuyan a mejorar los beneficios terapéuticos de las terapias actuales, y del mismo modo, a aumentar el cumplimiento por parte del paciente. En los últimos años, ha surgido un interés creciente en los sistemas terapéuticos transdérmicos que permitan la administración sistémica o el efecto localizado de fármacos citostáticos debido a las numerosas ventajas que presentan (Jennifer, 1994; Berti y Lipsky, 1995; Lee y col., 2000), como demuestra el gran número de publicaciones al respecto (Birudaraj y col., 2005; Smart, 2005; Maurya y col., 2010; Patel y col., 2011). Concretamente, estas formas de administración suponen un amplio abanico de posibilidades para el diseño galénico de sistemas que posibiliten una óptima permeación y absorción de principios activos a través de la piel. Estos sistemas, además de incrementar el tiempo de residencia, permiten un estrecho contacto con el tejido diana por lo que el principio activo se absorbería fácilmente debido al gradiente de concentración que se establece y se evitaría la posible degradación enzimática. Por otro lado, estos sistemas podrían proporcionar una administración sencilla con muy poca o ninguna irritación y de este modo aumentar el cumplimiento de las pautas de dosificación por parte del paciente. Es por este motivo, que se hace necesario el diseño de estos sistemas terapéuticos que permitan la administración transdérmica de 5-fluorouracilo. Los parches que proponemos pueden ser de gran utilidad en el tratamiento de la fase inicial de carcinomas.

En definitiva, creemos que nuestra investigación puede contribuir en los siguientes aspectos:

- Tecnología y diseño de parches transdérmicos, lo que supone avanzar en el estudio de nuevas formas farmacéuticas.
- Mejorar la permeación del 5-fluorouracilo desde estas formas farmacéuticas.
- La aceptación del paciente a la utilización de estas formas farmacéuticas y con ello favorecer el cumplimiento terapéutico.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo es el diseño de un sistema terapéutico transdérmico que controle y facilite la permeación de 5-fluorouracilo en el tratamiento de la queratosis actínica, así como su comparación con sistemas tradicionales de 5-fluorouracilo (pomadas). Este sistema permitirá, además, reducir la irritación cutánea inherente al uso tópico de este antineoplásico, puesto que se podría delimitar de manera precisa la zona de aplicación y, en ningún caso, la totalidad de la dosis administrada estaría en contacto con la piel sana.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

El principio activo 5-fluorouracilo ha sido suministrado por Sigma (Madrid, España). Los componentes empleados para la elaboración de los sistemas terapéuticos, ácido láurico, ácido adípico y glicerol son suministrados por Panreac Química (Barcelona, España) mientras que Eudragit® E100 por Degussa (Darmstadt, Alemania) y alcohol polivinílico (PVA) de Guinama (Valencia, España). Para la elaboración de las pomadas se ha utilizado vaselina filante suministrada por Acofarma (Barcelona, España) y parafina líquida por Guinama (Valencia, España).

2.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES

2.2.1 Elaboración de pomadas

Se han elaborado pomadas a dos concentraciones diferentes, al 5 % y a la concentración utilizada en la preparación de los parches, 0,7 %. Una vez pesado el principio activo se pulveriza finamente, se añade unas gotas de vaselina líquida y, por último, se procede a la incorporación de la vaselina filante homogeneizando con la ayuda del pistilo.

2.2.2 Ensayo *in vivo*

Para la realización de este ensayo se sedaron los ratones en una cámara con gas isofluorano y se les afeitó el lomo. Las muestras a probar fueron los parches transdérmicos con 5-fluorouracilo y pomadas de 5-fluorouracilo al 0,7 % y 5 %, además de las correspondientes formulaciones sin principio activo utilizadas como control. Como muestras para la aplicación, se han utilizado parches de forma circular de 2 cm de diámetro y en el caso de las pomadas se pesó 0,3 gramos y se aplicó en una zona similar a la ocupada por el parche. Tras 4 horas de aplicación de los parches y pomadas, se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se cortó una superficie de la piel correspondiente a la ocupada por el parche, o en el caso de las pomadas, una similar a la anterior. La piel se colocó en eppendorf con 250 µl de agua.

La cantidad de principio activo retenido en las muestras de piel se determinó espectrofotométricamente. De todas las muestras estudiadas se han realizado 6 replicados (Xi y col., 2010).

2.2.3 Método analítico: Espectrofotometría

El método analítico utilizado es la espectrofotometría ultravioleta-visible. Estas medidas se han llevado a cabo utilizando un espectrofotómetro Pelkin-Elmer UV/Vis Lambda 40.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 LABORACIÓN DE SISTEMAS TERAPÉUTICOS TRANSDÉRMICOS

En el presente trabajo, se han elaborado parches matriciales, esto es, un sistema que consiste en una única lámina constituida por un polímero que actúa como reservorio del principio activo, además de proporcionarle la bioadhesividad necesaria para su fijación a la piel. Por lo tanto, el componente clave, en cualquier formulación de este tipo, es el material polimérico que debe poseer buenas propiedades filmógenas y bioadhesivas, no producir irritación en el lugar de aplicación y ser estable e inerte respecto al principio activo utilizado. Asimismo y como cualquier otra forma de dosificación, para la puesta a punto de los sistemas terapéuticos se tienen en cuenta factores como la velocidad de liberación, pH, conveniencia de uso, seguridad, compatibilidad entre los componentes, etc. Teniendo en cuenta todas y cada una de las consideraciones expuestas anteriormente, procedimos al

diseño y elaboración de la fórmula que ha sido objeto de estudio. El método utilizado se describe a continuación.

Para la elaboración de este tipo de sistemas y como componente principal de la formulación se utilizó el Eudragit®E100. La selección de este polímero se llevó a cabo en base a los buenos resultados obtenidos en trabajos realizados por otros autores (Padula y col., 2003) y sus propiedades bioadhesivas. Este polímero necesita un pH de $2,5 \pm 0,1$ para su adecuada dispersión en agua, lo que se consigue mediante la adición de ácido láurico y ácido adípico. A la mezcla resultante se la conoce como Plastoid®E35H (Tabla 1). Seguidamente, se detalla el método de preparación utilizado:

Se dispersa el polímero bioadhesivo, Eudragit®E100 al 15 % (m/m), en una solución de ácido láurico 9,2 % (m/m) y ácido adípico 1,8 % (m/m) a $80 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. La mezcla se agitó a 450 rpm durante 45 minutos, tiempo suficiente para obtener una dispersión clara.

La solución se enfrió hasta $60 \text{ }^\circ\text{C}$ y, posteriormente, se añadió, como humectante, glicerol al 1 % (m/m).

Finalmente, se enfrió hasta temperatura ambiente bajo agitación continua

Eudragit®E100	15,9g
Ácido Láurico	9,2g
Ácido Adípico	1,8g
Glicerol	1g
Agua destilada	72,1g

Tabla 1. Composición del Plastoid®E35H.

Una vez preparado el material bioadhesivo, se procedió a la elaboración del sistema terapéutico transdérmico propiamente dicho. Para ello, se dispersó alcohol polivinílico (PVA) en el agua de la fórmula, se le adicionó el Plastoid®E35H (27 % m/m) y glicerol al 1 % (m/m), como plastificante. Esta operación se llevó a cabo bajo agitación continua y dicha agitación se mantuvo durante 24 horas, para lo que utilizamos un agitador magnético. La dispersión formada se vertió en el interior de un extensiómetro y se procedió a la laminación del parche sobre papel siliconado colocado, previamente, sobre una superficie lisa de modo que se pueda formar la película del parche (Figura 1). Con la finalidad de potenciar la resistencia y manejabilidad del parche, elaboramos películas de un espesor mayor a las anteriores, para lo que se procedió a una segunda laminación tras la desecación de la primera transcurridas 24 horas.

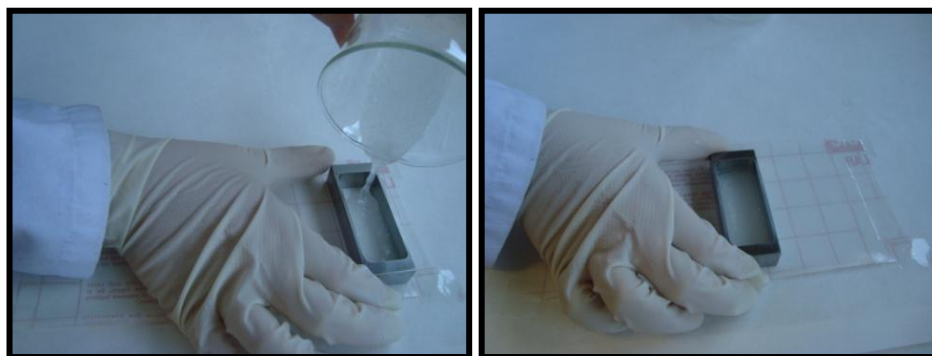


Figura 1. Proceso de laminación del parche.

Una vez comprobada que la película resultante reunía las propiedades que nos planteamos en un principio, se procedió a la elaboración de parches incorporando el fármaco a la fórmula propuesta (Tabla 2). El 5-fluorouracilo se adicionó al agua de la formulación, bajo agitación magnética y protegido de la luz, dado su carácter fotosensible. Una vez disuelto, se añadieron progresivamente el resto de componentes.

PVA	12,4g
Plastoid	27g
Glicerol	1g
Agua	59,6g
Principio Activo	700mg

Tabla 2. Composición del sistema terapéutico transdérmico propuesto.

Finalmente, tras el proceso de síntesis, la desecación es un paso básico en la técnica de elaboración de los sistemas de administración transdérmica. Este proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 24 horas.

Tras la elaboración de estos sistemas siguiendo la metodología descrita anteriormente se obtienen películas homogéneas, uniformes y fácilmente manipulables, como se muestra en la Figura 2. Esta película no es adhesiva *per se*, sino que es necesario aplicarla sobre la piel previamente humedecida para que la fijación de la misma sea óptima y duradera.



Figura 2. Parche resultante tras el laminado y desecación.

3.2 ENSAYO *IN VIVO*

Con el fin de realizar una comparación en cuanto a la permeación del principio activo de estos sistemas terapéuticos transdérmicos, respecto a las formas farmacéuticas semisólidas de aplicación tópica usadas tradicionalmente en el tratamiento de la queratosis actínica, hemos elaborado pomadas de 5-fluorouracilo. La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos, de los parches elaborados con plastoid y las pomadas a diferentes concentraciones, en el ensayo *in vivo* realizado en ratones.

	Cantidad (μg)	Porcentaj e cedido	Cantidad (μg)/ cm^2
Parche Plastoid	103,17	16,51	40,62
Pomada 5FU 0,7%	49,15	2,34	19,35
Pomada 5FU 5%	37,56	0,25	14,79

Tabla 3. Cantidades y porcentaje cedido de las diferentes formulaciones en el ensayo *in vivo* realizado en ratones.

Los resultados obtenidos muestran que la cantidad y el porcentaje cedido son mayores en los parches que en las pomadas así como la cantidad cedida por cm^2 de piel. La cantidad cedida es $40,62 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en los parches, en la pomada al 0,7 % y 5 % es $19,35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $14,79 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente. En consecuencia, podemos afirmar que la cantidad cedida en ambas pomadas es similar constituyendo los parches el sistema que permite una mayor permeación de 5-fluorouracilo (16,51 %).

4 CONCLUSIONES

El método de elaboración propuesto ha sido idóneo para la obtención de láminas homogéneas, uniformes, delgadas, transparentes, flexibles y fácilmente manipulables, así como una adecuada adhesividad que permite la adherencia del sistema. En cuanto a los resultados obtenidos en el ensayo in vivo podemos afirmar que la permeación desde el sistema terapéutico transdérmico es mayor que en las pomadas, sistemas tradicionales utilizados actualmente. Esto supone un avance en el estudio de nuevas formas farmacéuticas y posiblemente, una buena aceptación por parte del paciente debido a las numerosas ventajas que presenta.

5 BIBLIOGRAFÍA

Berti JJ, Lipsky JJ (1995) Transcutaneous drug delivery: A practical review. *Mayo Clin Proc* 70(6): 581-586.

Birudaraj R, Mahalingam R, Li X, Jasti BR (2005) Advances in buccal drug delivery. [Crit Rev Ther Drug](#) 22(3): 295-330.

Jennifer K (1994) Understanding transdermal medication. *J Prof Nurs* 10(2): 121-125.

Lee JW, Park JH, Robinson JR (2000) Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. *J Pharm Sci* 89(7): 850-866.

Levy S, Furst K, Chern W (2001) A comparison of the skin permeation of three topical 0.5% fluorouracil formulations with that of 5% formulation. *Clin Ther* 23(6): 901-907.

Loven K, Stein L, Furst K, Levy S (2002) Evaluation of the efficacy and tolerability of 0.5% fluorouracil cream and 5% fluorouracil cream applied to each side of the face in patients with actinic keratosis. *Clin Ther* 24(6): 990-1000.

Maurya SK, Pathak K, Bali V (2010) Therapeutic potential of mucoadhesive drug delivery systems - An updated patent review. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 4(3): 256-265.

Padula C, Colombo G, Nicoli S, Catellani PL, Massimo G, Santi P (2003) Bioadhesive film for the transdermal delivery of lidocaine: in vitro and in vivo behavior. *J Control Release* 88(2): 277-285.

Paolino D, Muzzalupo R, Ricciardi A, Celia C, Picci N, Fresta M (2007) In vitro and in vivo evaluation of Bola-surfactant containing niosomes for transdermal delivery. *Biomed Microdevices* 9(4): 421-433.

Patel VF, Liu F, Brown MB (2011) Advances in oral transmucosal drug delivery. *J Control Release* 153(2): 106-116.

Smart JD (2005) Buccal drug delivery. *Expert Opin Drug Del* 2(3): 507-517.

Werschler WP (2008) Considerations for use of fluorouracil cream 0.5% for the treatment of actinic keratosis in elderly patients. *J Clin Aesthet Dermatol* 1(2): 22-27.

Xi H, Yang Y, Zhao D, Fang L, Sun L, Mu L, Liu J, Zhao N, Zhao Y, Zheng N, He Z (2010) Transdermal patches for site-specific delivery of anastrozole: In vitro and local tissue disposition evaluation. *Int J Pharm* 391 (1-2): 73-78.

CO-59 Magnetite/Polyethylenimine non-viral vector as a magnetofection agent

R. Megías Iglesias. Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain. Master student. gcetern@correo.ugr.es
J. L. Arias Mediano. Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain. jlarias@ugr.es
A. Ruiz Martinez. Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain. adolfin@ugr.es
M. López-Viota. Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain. mlvg@ugr.es

Abstract

Magnetofection is a novel gene therapy variant based on transfection processes guided by an external magnetic field. As novel and emergent therapeutic tool it needs news and specific carriers able to load genetic material and responsive to external magnetic gradients.

The aim of the present work is to develop a reproducible synthesis method for a magnetic responsive non-viral vector employing polyethylenimine (PEI) and magnetite. Later, we have done an intensive surface and size characterization in order to study if the obtained carrier would be successful to use as a parenteral gen carry. Data obtained was for particle size $110,1 \pm 21$ nm, and zeta potential (ZP) $66,8 \pm 8,6$ mV. We have studied the zeta potential behavior of magnetite core and non-viral vector when they have been treated with different pH and ionic strength solutions showing a different behavior in both cases. In fact, some TEM microscopy photographs were made to elucidate the exactly system structure.

Thanks to the intensive physicochemical characterization we can conclude that the non-viral vector is able to work as a parenteral gene carrier to use at magnetofection.

Keywords

Gene therapy, magnetofection, polyethylenimine, magnetite.

1 Introduction

Gene therapy is an emergent field inside pharmacy. Its core idea is to use genetic materials as active in order to produce different processes which can be helpful to fix some health disorders (Wysocki P.J. et al., 2002). This basic idea needs new carriers able to deliver, specifically those news actives, to its goal. Traditionally it has been used viral structures due to its high capacity to protect and transport genetic material and recognize specific ligands. Now, viral vectors still are the most effective way to deliver genes. However, viral vectors have an inherent problem due to its viral structure: they are immunogenic. Non-viral vectors have emerged as an alternative that fix this immunogenicity problem thanks to the use of polymers that can form nanocomplexes with genes (Wang T. et al., 2012). Another advantage they have against viral vectors is a wide capacity to be functionalized, for example, including magnetic cores allowing them to be guided by external magnetic gradients. This is what magnetofection proposes: non-viral vectors loading genetic material that can be externally guided by a magnetic field (Plank C. Et al., 2011).

PEI/Magnetite nanocarrier had been recently reported as a powerful non-viral vector which combines one of the most promising polymer at gene therapy, PEI, and a perfectly described magnetic core, magnetite (Lungwitz U. et al., 2005).

The aim of this work is to describe an easy and reproducible synthesis method for a PEI/magnetite nanocarrier able to work as a magnetofection agent and elucidate its physicochemical properties in order to show its real application in this field.

2 Materials and Methods

2.1 Materials

All chemicals were of analytical reagent grade and used without further purification. PEI 25kD and all other reagents were purchased from Sigma-Aldrich. Ultra-pure deionized (Milli-Q) water was used in all synthesis steps.

2.2 Methods

Superparamagnetic nanoparticles were prepared by alkaline co-precipitation of ferric and ferrous chlorides in aqueous solution as already described elsewhere in detail (*Massart, R. 1981*). Later, the obtained magnetic cores were sonicated by 40 min in presence of citric acid and neutralized to pH 7 by adding a NaOH solution.

To obtain the PEI/magnetite nanoconjugates, a PEI water solution 5% (w/w) was added dropwise to the magnetite suspension under a 2.000 rpm mechanical stirring. After 5 minutes the mechanical stirring was removed and then the suspension was neutralized to pH 7 by adding a HCL solution. Finally the mixture was centrifugated 20 min at 9.500 rpm and the pellet was discarded.

Different ionic strength (IS) solutions were prepared employing KNO_3 as electrolyte.

Different pH solutions were prepared from a 1×10^{-3} KNO_3 solution. For pH calibrate a NaOH 1M and a HNO_3 1M solutions were used.

Transmission electron microscopy (TEM) was performed using a LIBRA 120 PLUS from Carl Zeiss SMT. For sample preparation, dilute drops of suspension were allowed to dry slowly on carbon coated copper grids.

Particle size analysis was done using a photon correlation spectrometer (PCS) from Zetasizer Nano ZS series.

ZP analysis was done using laser Doppler electrophoresis (LDE) with a spectrometer from Zetasizer Nano ZS series.

3 Results and discussion

3.1 Magnetite characterization

As shown on Table 1, sonicating the magnetic cores in presence of citric acid changes its positive superficial charge ($29,9 \pm 8,6$ mV) to negative ($-40,1 \pm 3,7$ mV). This change is essential because PEI/magnetite interactions that allow the nanoconjugates to be formed are mainly electrostatic and PEI is a highly cationic polymer.

Citric acid (mV)	-44,4	-45,5	-44,3	-35,2	-36,5	-37,8	-39,6	-39,4	-38,2
Non citric acid (mV)	29,5	37,9	21,8	41	39,3	34,6	23,7	22,5	18,4

Table 1. Magnetite ZP (mV) before and after sonication in presence of citric acid

The magnetite nanoparticles ZP behavior in different pH and IS medium was also characterized. Measurements are shown at Figure 1.

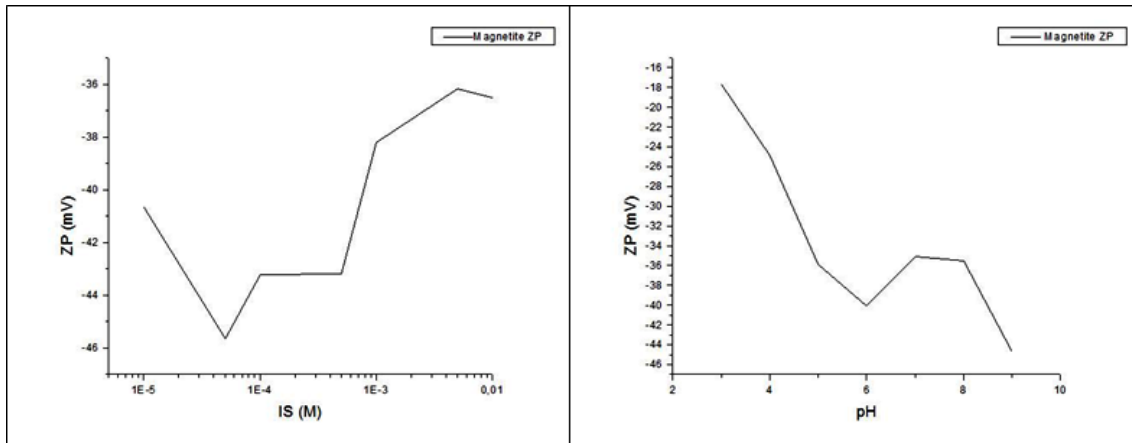


Figure 1. Magnetite zeta potential behavior when it is exposed to different pH and IS medium.

Some TEM microphotographs were also made (Figure 2). Magnetite suspension appearance shows a little particle diameter, homogeneous form and sharpless structure. This let to conclude that the citric acid sonication process does not affect to the original magnetite structure and it is a valid process to change magnetite ZP sign without any further modification.

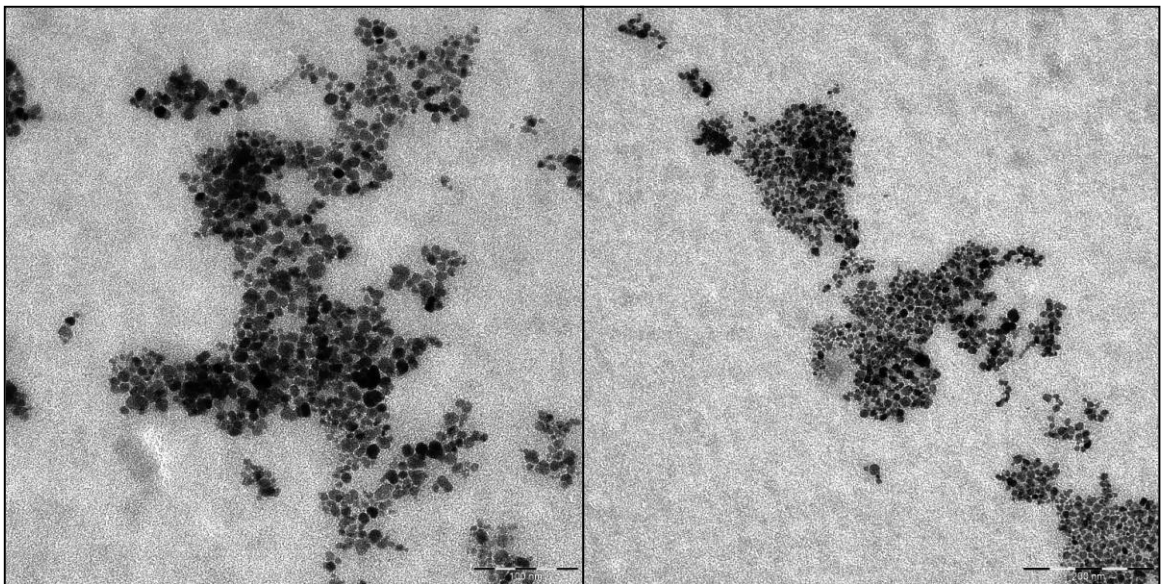


Figure 2. Magnetite TEM microphotographs. Bar length 100 nm

3.2 PEI/Magnetite nanocomplexes characterization

In Table 2 are collected the ZP ($66,8 \pm 8,6$) and particle size ($110,1 \pm 2,1$) measurements of the nanocomplexes obtained as described above. The strong positive superficial charge found at the nanocomplexes means that the polymeric coating of the magnetite cores is effective. Moreover, its very small size allow them to be useful for parenteral medication, a strong reason to considerate them as a magnetofection agent.

Table 2. PEI/magnetite nanocomplexes superficial charge and particle size.

PEI/magnetite nanocomplexes ZP behavior in different pH and IS medium were also characterized. Measurements are shown at Figure 3.

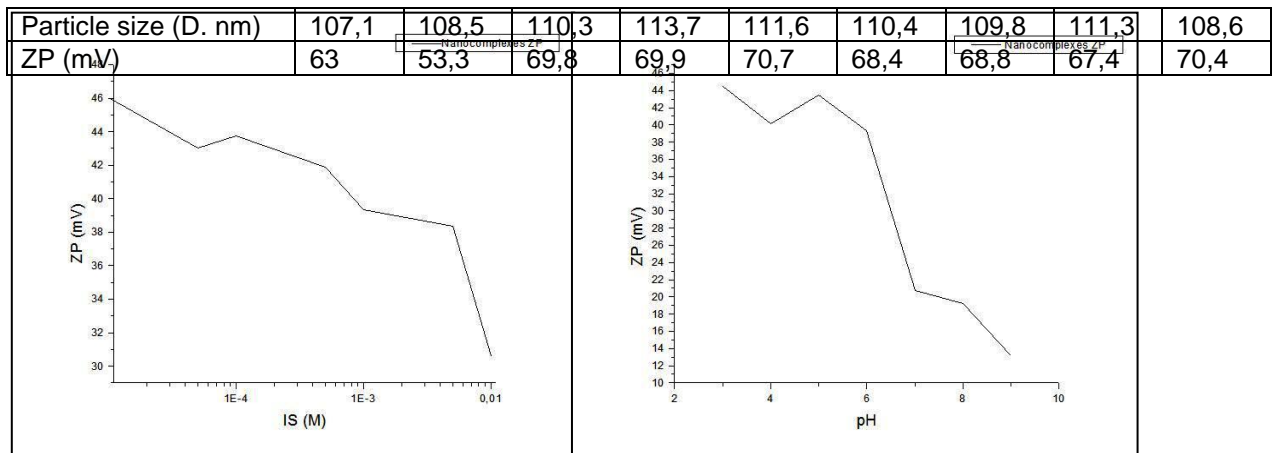


Figure 3. PEI/Magnetite nanocomplexes ZP behavior when its exposed to different pH and IS medium.

In order to strongly reveal the polymeric coating of the ferrous cores some TEM microphotographs were made. Even the exactly form of the nanocomplex is not clear due to the aggregation of the sample, the difference between this images and the ones above is evidenced. The polymeric coating its perfectly clear which can be seen as a “dark cloud” around the magnetic cores.

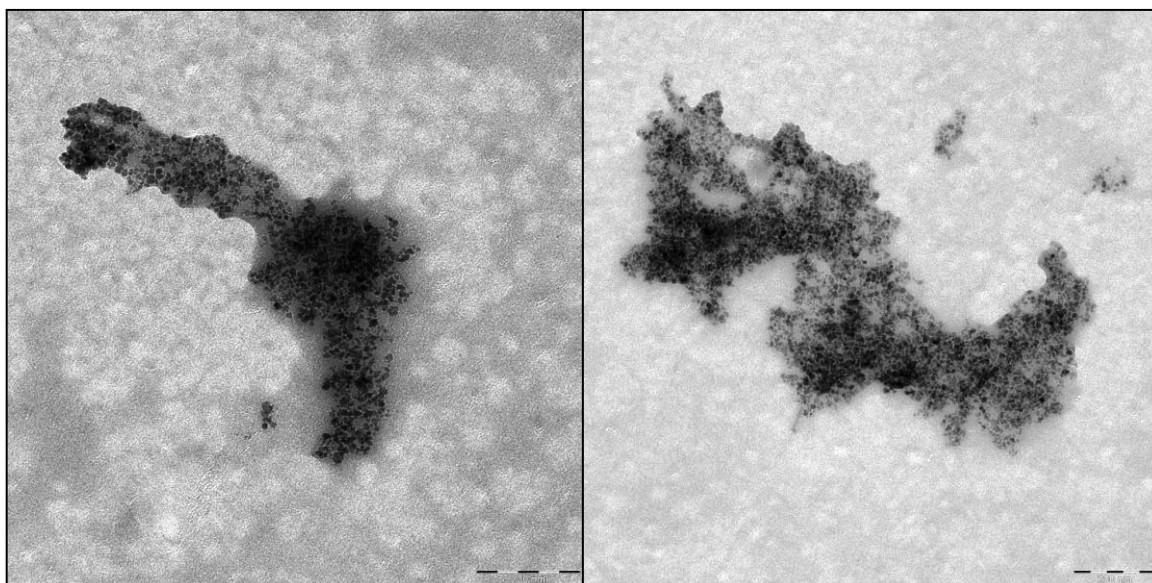


Figure 4. PEI/Magnetite nanocomplexes TEM microphotographs. Bar length 200 nm

4 Conclusions

In the present paper an easily and reproducible synthesis method for a PEI/magnetite nanocomplex has been described. A correct way to switch the magnetite nanoparticles positive superficial charge to negative has been described and demonstrated by the LDE technique. TEM study shows the clear difference between the magnetite samples and the coated one, proving an effective coating by using the described synthesis method. In order to confirm such affirmation some different experiments were done. First of all, the superficial electrical charge from the magnetite and PEI/magnetite samples were characterized, finding a significant difference between them. It was also described the behavior of both samples at different pH and IS medium. The differences between the superficial electrical charge in both cases is another evidence that the polymer coating is effective and leads the magnetite as a core at the nanocomplex.

5 References

1. Wysocki, P.J.; Mackiewicz-Wysocka, M., and AndrzejMackiewicz. Cancer gene therapy – state-of-the-art. *Rep Prac Oncol Radiother.* 2002; 7(4):149-155
2. Wang, T.; Upponi, J.R., and Torchilin V.P. Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: dilemmas and strategies. *Int J Pharm.* 2012; 427(1):3-20
3. Plank, C.; Zelphati, O., and Mykhaylyk, O. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-progress and prospects. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63(14-15):1300-1331
4. Lungwitz, U.; Breunig, M.; Blunk, T., and Göpferich, A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur J of Pharm Biopharm.* 2005; 60(2):247-266
5. Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magn.* 1981; 17(2):1247-1248

CO-61 Diseño de Formas Farmacéuticas Sólidas de Liberación Modificada

M^a Teresa Sánchez, M^a Encarnación Morales y M^a Adolfinia Ruiz.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

Abstract

En los últimos años se ha producido un creciente interés por parte de la Industria Farmacéutica en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas que favorezcan la incorporación de una amplia gama de productos a disposición del consumidor y su aceptación en la utilización de los mismos. De aquí deriva nuestro interés en el diseño y desarrollo de un nuevo comprimido matricial de liberación prolongada, con el que se consiga reducir el número de administraciones de fármaco al día, lo cual supondrá una mayor aceptación y cumplimiento terapéutico por parte del paciente, además de otros muchos beneficios para éste.

Palabras clave:

comprimidos matriciales, liberación prolongada, alginato sódico, hidroxipropilmetilcelulosa.

1 Introducción

Los comprimidos de liberación modificada son aquellos preparados con objeto de modificar la velocidad, el lugar o el momento de la liberación del principio activo. Entre ellos encontramos los sistemas matriciales o de liberación prolongada, los cuales garantizan la liberación del principio activo durante mayor tiempo. Desde hace ya algunos años, la investigación en el diseño de formas farmacéuticas se ha centrado en la búsqueda de nuevos sistemas que prolonguen la liberación del principio activo tras su administración. Las razones, entre otras, se derivan del deseo de alcanzar la liberación prolongada de los compuestos altamente solubles en agua, alcanzar velocidades de liberación que responden a un objetivo dado, disminuir el número de administraciones diarias y reducir al mínimo los efectos secundarios (Maderuelo y cols., 2011).

Los **sistemas matriciales hidrofílicos** resultan de los más interesantes en cuanto a sistemas de administración de fármacos con liberación controlada o modificada, debido a que son más simples de formular, su producción es barata y fácil y presentan una buena correlación *in vivo- in vitro*. En estos comprimidos matriciales la sustancia activa se encuentra uniformemente distribuida en un soporte o matriz, generalmente polimérica, que controla su liberación, manteniéndose así una concentración eficaz durante más tiempo.

La hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) es uno de los materiales de soporte utilizados con más frecuencia en este tipo de comprimidos (Alderman, 1984; RangaRao y Padmalatha, 1988; Colombo y cols., 2000; Siepmann y Peppas, 2001; Miller-Chou y Koenig, 2003), además de otros derivados celulósicos como hidroxipropilcelulosa (HPC), metilcelulosa (MC) y etil-hidroxietilcelulosa (EHEC). Estos derivados celulósicos, actúan como agentes promotores de la liberación, favoreciendo la hidratación de la matriz completa y uniforme y la formación de una capa de gel. Otros polímeros hidrófilos de interés son los alginatos, gomas, gelatina, almidones modificados, chitosanos, carbopol, óxido de polietileno, etc. También podemos encontrar componentes tales como diluyentes, lubricantes, solubilizantes, reguladores de pH, etc.

El **objetivo fundamental** de este trabajo consiste en diseñar y estudiar las propiedades tecnológicas de comprimidos matriciales de naturaleza hidrófila que garanticen la liberación de la sustancia activa vehiculizada a lo largo del tracto gastrointestinal.

2 Materiales y métodos

2.1 Materiales

Los materiales utilizados en la elaboración de los comprimidos son alginato sódico, suministrado por Guinama (España) y Methocel® K-15 M EP, suministrado por Laboratorios Palex S.A (Jaén). Además de diluyentes como maltodextrina, suministrada por Guinama (España), y lubricantes como la mezcla de talco y estearato de magnesio, suministrados por Guinama (España).

Seleccionamos la mezcla universal compuesta por talco y estearato magnésico en proporción 9/1, en la cual el estearato de magnesio actúa como propio lubricante mientras que el talco actúa como antiadherente y deslizante principalmente.

2.2 Métodos experimentales.

Método de compresión

Por compresión directa se entiende la compresión de principios activos pulveriformes (previa pulverización) o mezclas de éstos con excipientes o coadyuvantes, sin tratamiento previo. La compresión directa presenta ciertas ventajas frente a otros métodos de compresión, entre las que destacan un menor tiempo de elaboración de los comprimidos, no se usa agua ni calor, de modo que tienen una estabilidad alta y adecuada para sustancias tanto termolábiles como hidrolizables y, además, permite la obtención de comprimidos de liberación modificada.

La prensa hidráulica manual es un instrumento de laboratorio compacto, muy fácil y seguro de operar. La prensa hidráulica utilizada SPECAC, proporciona una fuerza de compresión de hasta 15 toneladas por lo que es ideal para la preparación de muestras sólidas caracterizadas por una gran estabilidad. La presión alcanzada puede leerse claramente en la escala del manómetro. Existen matrices y punzones de diferentes tamaños, siendo los punzones empleados de un diámetro de 10 mm.

Dimensiones

El *pie de rey* es el instrumento utilizado para medir dimensiones de objetos relativamente pequeños, desde centímetros hasta fracciones de milímetros. Nos aportará datos tanto de diámetro como de grosor de nuestros comprimidos.

Ensayo de friabilidad de comprimidos no recubiertos

Se llama friabilidad al fenómeno por el cual la superficie de los comprimidos se ve dañada y/o presenta señales de abrasión o de ruptura bajo el efecto de choques mecánicos o de roce.

Se toma una muestra de 20 comprimidos al azar los cuales se someterán a ensayo siguiendo las pautas descritas en la RFE, quedando expuestos a rodamiento y caídas libres dentro del dispositivo utilizado, sufriendo así abrasión por choque entre sí y con las paredes del mismo.

La friabilidad se expresa como pérdida de masa y se calcula como porcentaje de la masa inicial de la muestra, siendo aceptable una pérdida de masa del 1% respecto a la masa inicial.

Determinación de la resistencia a la rotura

Tiene como objetivo la determinación de la fuerza necesaria para provocar la rotura de los comprimidos por aplastamiento.

El dispositivo utilizado es el durómetro de ERWEKA.

Uniformidad de masa de preparaciones unidosis

Se realiza pesando individualmente 20 unidades escogidas al azar, y determinando su masa media y correspondiente desviación estándar. La masa individual de cómo máximo 2 de las 20 unidades puede desviarse de la masa media en un porcentaje más elevado que el indicado en la siguiente tabla; pero la masa de ninguna unidad puede desviarse más del doble de ese porcentaje.

Forma farmacéutica	Masa media	Desviación del porcentaje
Comprimidos sin cubierta o con cubierta pelicular	80 mg o menos	10
	Más de 80 mg y menos de 250 mg	7,5
	250 mg o más	5

Tabla 1. Desviaciones permitidas en el ensayo de uniformidad de masa.

Ensayo de disgregación

El dispositivo utilizado para realizar este estudio, es el correspondiente al ensayo A para comprimidos de tamaño normal descrito en la USP. Se someten a ensayo 6 comprimidos seleccionados al azar, Al tratarse de comprimidos de liberación modificada, se mantienen primero 1 hora en medio HCl 0,01N y, posteriormente, se cambia el medio por tampón fosfato a pH 6,8 durante 24 horas.

La disgregación del comprimido se considera terminada cuando:

- No queda residuo sobre la rejilla.
- Si queda residuo, éste está constituido solamente por una masa blanda que no constituye un núcleo no impregnado.
- No permanecen sobre la rejilla más que fragmentos de recubrimiento del comprimido que se adhieren al aparato.

3 Resultados y discusión

Preparación del comprimido matricial hidrófilo y dimensiones del mismo

De acuerdo con el objetivo planteado en nuestro trabajo de investigación, procedimos, en primer lugar, al diseño de un comprimido matricial hidrófilo que garantice la liberación prolongada de la sustancia activa contenida a lo largo de todo el tracto gastrointestinal.

Para ello, hemos seleccionado dos polímeros ampliamente utilizados en la elaboración de este tipo de comprimidos, como son el alginato sódico y un derivado de celulosa (Methocel® K-15 M EP). Hemos seleccionado el alginato porque presenta la propiedad de formar un hidrocoloide; esto es, su capacidad de hidratarse en agua caliente o fría para formar soluciones viscosas, dispersiones o geles. Los alginatos son, de esta manera, únicos en cuanto a sus propiedades como espesantes, estabilizantes, gelificantes y formadores de películas. Por otro lado, de la gama disponible de agentes de liberación controlada de celulosa, la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) es el más utilizado. La evidencia sugiere que la química de HPMC fomenta una formación de gel fuerte, compacto. Como resultado de la combinación de ambas sustancias, se espera mantener durante más tiempo las tasas de liberación del fármaco.

Además, se vio adecuada la incorporación a la fórmula de agentes lubricantes para favorecer las propiedades de flujo del polvo y evitar adherencias, así como un diluyente, la maltodextrina.

Componente	Cantidad (mg)
Methocel® K- 15 M EP	100
Alginato sódico	100
Maltodextrina	100
Talco/ estearato de magnesio (9/1)	10

Tabla 2. Composición comprimido matricial hidrófilo.

Una vez establecida la composición del comprimido matricial deseado, procedemos a su compresión directa en prensa hidráulica. La presión seleccionada para la operación de compresión es 2,5 T durante un tiempo de 30 segundos, con ello obtenemos un comprimido con adecuada cohesión entre sus partículas y resistencia mecánica, cuyas dimensiones son $3,30 \pm 0,01$ mm de grosor y $10,12 \pm 0,01$ mm de diámetro.

Uniformidad de masa

Los resultados obtenidos al pesar individualmente los 20 comprimidos seleccionados son $\bar{X} = 0,3165 \text{ g} \pm 0,0158$. La masa de los 20 comprimidos debe estar comprendida entre 0,3007 y 0,3323 gramos.

La masa individual de cómo máximo 2 de las 20 unidades puede desviarse de la masa media en un porcentaje más elevado del 5%; pero la masa de ninguna unidad puede desviarse más del doble de ese porcentaje.

Por tanto, atendiendo a los resultados obtenidos en el ensayo, podemos afirmar que estos comprimidos cumplen el ensayo de uniformidad de masa descrito en la R.F.E.

Friabilidad de comprimidos no recubiertos

La muestra compuesta por 20 comprimidos seleccionados al azar se pesa, siendo este el peso inicial de la misma ($P_1 = 6,3121 \text{ g}$). Tras ser sometida a 100 rotaciones de dispositivo, se repite la pesada de la muestra ($P_2 = 6,3093 \text{ g}$).

Pérdida de masa ($P_1 - P_2$) en gramos	Friabilidad (%)
0,0028 g	0,0443%

Tabla 3. Resultados obtenidos en ensayo de friabilidad

Puesto que la pérdida de masa es del 0,0443 %, siendo este un resultado inferior al 1% de la masa inicial, podemos afirmar que los comprimidos seleccionados cumplen el ensayo de friabilidad descrito en la R.F.E.

Resistencia a la rotura (dureza)

Determinamos la resistencia a la rotura de 10 comprimidos seleccionados al azar; de acuerdo con los resultados obtenidos, la fuerza máxima empleada ha sido de 276 N y la mínima de 198 N, por tanto el valor medio estimado es de $240,7 \pm 55,1 \text{ N}$.

Podemos concluir que la dureza de nuestros comprimidos es óptima, puesto que garantiza una friabilidad óptima de los mismos y además permite su disgregación como muestran los citados ensayos.

Ensayo de disgregación

El objetivo del ensayo de disgregación llevado a cabo es poder observar la disgregación del comprimido a lo largo del tracto gastrointestinal y el tiempo requerido para ello.

El elemento central que controla la liberación del fármaco en nuestros comprimidos es la capa de gel que formará el polímero tras su hidratación, capaz de prevenir la desintegración de la matriz y la rápida penetración de agua en el interior de la misma (Colombo y cols., 1996). Hemos podido observar como trascurridas 3 horas desde su inmersión en medio alcalino, los comprimidos ya han perdido su forma inicial debido al hinchamiento de los mismos. La matriz polimérica forma una capa de gel a partir de la cual el fármaco se liberará por difusión. La continua entrada de agua hacia la matriz provoca un aumento progresivo de su espesor y una prolongada liberación del fármaco.

Después de permanecer 4 horas en medio alcalino, podemos ver como los comprimidos pierden por completo la forma inicial, pasando a ser una masa deforme y con una progresiva disminución de su tamaño, indicando así una evolución en el proceso de disgregación.

Tras 24 horas en medio alcalino, sólo se aprecia en cada compartimento del cesto del dispositivo una matriz transparente deforme, con aspecto de gel, totalmente agotada.

Por tanto, nuestros comprimidos satisfacen el ensayo de disgregación descrito en la RFE, ya que a pesar de quedar un residuo sobre la rejilla de cada compartimento, éste está constituido solamente por una masa blanda que no constituye un núcleo no impregnado.

4 Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos afirmar que la utilización de polímeros biocompatibles, como derivados celulósicos y alginato, permiten la obtención de comprimidos matriciales que garantizan la protección del fármaco y una liberación prolongada del mismo. Asimismo, son sustancias cuya idoneidad para su uso en humanos ha sido ampliamente testada y, por tanto, resultan de gran utilidad en la industria alimentaria y farmacéutica. La fórmula seleccionada para la compresión, es aquella constituida por los polímeros Methocel®

K-15 M EP y alginato sódico, además de maltodextrina y la mezcla universal de talco y estearato magnésico como coadyuvantes. La presión seleccionada es de 1,5 T durante 30 segundos.

Los resultados de todos los ensayos tecnológicos realizados demuestran que, tanto la fórmula propuesta como el método utilizado, permite la obtención de comprimidos de liberación prolongada.

5 Bibliografía

1. Alderman, D.A. (1984). A review of cellulose ethers in hydrophilic matrices for oral controlled-release dosage forms. *Int. J. Pharm., Technol. Prod. Manuf.*, 5: 175–179.
2. Colombo, P., Bettini, R., Santi, P., De Ascentiis, A., Peppas, N.A. (1996). Analysis of the swelling and release mechanism from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. *Journal of Controlled Release* 39, 231-237.
3. Colombo, P., Bettini, R., Peppas, N.A., (1999). Observation of swelling process and diffusion front position during swelling in hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC) matrices containing a soluble drug. *J. Controlled Release*, 61: 83–91.
4. Colombo, P., Bettini, R., Santi, P., Peppas, N.A. (2000). Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optical performance. *Pharm. Sci. Technol.*, 3: 198–204.
5. Ferrero, C., Massuelle, D., Jeannerat, D., Doelker, E. (2008). Towards elucidation of the drug release mechanism from compressed hydrophilic matrices made of cellulose ethers. I. Pulse-field-gradient spin-echo NMR study of sodium salicylate diffusivity in swollen hydrogels with respect to polymer matrix physical structure. *J. Control. Release*, 128 (1): 71–79.
6. http://www.colorcon.com/literature/marketing/mr/Extended%20Release/METHOC EL/English/hydroph_matrix_broch.pdf. Consulta día 15/ 07/ 2013.
7. http://www.monografias.com/trabajos12/alginato/alginato.shtml#_Estructura_q%C3%ADmica_de#ixzz2Yj4shHQv. Consulta día 11/07/2013.
8. Maderuelo, C., Zarzuelo, A., Lanao, J.M. (2011). Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *Journal of Controlled Release*, 154: 2–19.
9. Mrsny, R.J. (2012). Oral drug delivery research in Europe. *Journal of Controlled Release*, 161: 247–253.
10. Rajabi-Siahboomi, A.R., Bowtell R.W., Mansfield, P., Henderson, A., Davies, M.C., Melia, C.D. (1994). Structure and behaviour in hydrophilic matrix sustained release dosage forms: NMR-imaging studies of dimensional changes in the gel layer and core of HPMC tablets undergoing hydration. *Journal Controlled Release*, 31: 121-128.
11. Ranga Rao, K.V., Padmalatha, D.K., (1988). Swelling controlled-release systems: recent developments and applications. *Int. J. Pharm.*, 48: 1–13.

12. Siepmann, J., Peppas, N.A. (2001). Modelling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 48: 139–157.
13. Sriamornsak, P., Thirawong, N., Korkerd, K. (2007). Swelling, erosion and release behavior of alginate- based matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66: 435–450.
14. Vila Jato J.L., editor. *Tecnología Farmacéutica, Volumen I: Aspectos Fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Capítulo 2: Formas Sólidas Orales.*
15. Vueba, M.L., Batista de Carvalho, L.A.E., Veiga, F., Sousa, J.J., Pina, M.E. (2004). Influence of cellulose ether polymers on ketoprofen release from hydrophilic matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58: 51–59

CO-62 *Lavatera maritima*: filogeografía y modelos de distribución de una especie poliploide endémica de la Cuenca Mediterránea

Villa-Machío I., Claudio Moyano s/n (Madrid), Real Jardín Botánico (CSIC), ivilla@rjb.csic.es
 González Fernández de Castro A., Claudio Moyano s/n (Madrid), Real Jardín Botánico (CSIC), ja-no@rjb.csic.es

Nieto Feliner G., Claudio Moyano s/n (Madrid), Real Jardín Botánico (CSIC), nieto@rjb.csic.es
 Fuertes Aguilar J., Claudio Moyano s/n (Madrid), Real Jardín Botánico (CSIC), jfuertes@rjb.csic.es

Resumen

La región mediterránea presenta una gran biodiversidad de plantas debido a los procesos geológicos y climáticos sufridos a lo largo de su historia. Los ciclos de glaciación del Cuaternario han influido tanto en la diversidad genética actual de las especies vegetales mediterráneas como en las rutas de colonización y migración. El malvavisco marino (*Lavatera maritima*) es una especie costera distribuida por el oeste de la cuenca mediterránea. Su importancia radica en sus específicos requerimientos ecológicos y de hábitat. En este estudio, la combinación de estudios filogeográficos con la modelización de distribución de especies permite interpretar cómo la estructura genética actual de la misma se debe a la interacción entre los cambios climáticos del Cuaternario y el nicho ecológico de la especie. Tras muestrear 43 poblaciones a lo largo su área de distribución, se han secuenciado marcadores de ADN nuclear (ITS) y plastidial (*matK*) para describir el patrón geográfico de la diversidad genética de la especie. Se han realizado dos modelos para conocer la distribución potencial actual y pasada de la especie, uno para el Mediterráneo occidental con variables climáticas (WorldClim), proyectado al Último Interglaciario y al Último Máximo Glaciario, y otro exclusivamente para España con variables climáticas y topográficas actuales (AEMET). De acuerdo con nuestros resultados, las poblaciones actuales de *L. maritima* tienen su centro de origen en Marruecos, a partir de donde se dispersó hacia la costa oriental de la península Ibérica y a las islas de Menorca y Cerdeña (eventos de dispersión a larga distancia).

Palabras Clave:

región mediterránea, filogeografía, diversidad genética, malváceas, nicho ecológico.

2 Introducción

La región mediterránea, que incluye para algunos biogeógrafos tanto la cuenca mediterránea como las islas macaronésicas (Quézel, 1985), es uno de los 25 *hotspots* (puntos calientes) de biodiversidad del mundo. Los conocimientos que existen sobre su compleja historia geológica y paleoclimática (Dercourt *et al.*, 2000; Krijgsman, 2002), su diversidad biótica bien documentada (Blondel *et al.*, 2010) y su gran variabilidad de tipos de hábitat (Blondel & Aronson, 1999) hacen a esta región especialmente atractiva para estudiar el efecto de los procesos geológicos y climáticos sobre el origen y patrón de distribución de las especies vegetales. Los cambios climáticos del Cuaternario, que comienzan a inicios del Pleistoceno (2.6 millones de años AP), han modelado los patrones geográficos de diversidad de muchas especies de forma diferente (Bennett & Provan, 2008; Stewart *et al.*, 2010). En Europa, durante los períodos de glaciación, la distribución geográfica de muchas especies se limitó a áreas que actuaron como refugio principalmente en las penínsulas mediterráneas del sur (Taberlet *et al.*, 1998; Comes & Kadereit, 1998). Durante los períodos interglaciares se produjo una re-expansión y las áreas habitables del norte de Europa fueron recolonizadas. Estos ciclos de contracción-expansión se repitieron, al menos, cuatro veces (Weising & Freitag, 2007).

Las Malváceas constituyen una gran familia de las Angiospermas con linajes muy diversificados en áreas de clima mediterráneo. El interés por esta planta radica en sus específicos requerimientos ecológicos y de hábitat, ya que se trata de una especie nitrófila (requiere altas concentraciones de materia orgánica), que crece a los pies de paredones o acantilados calizos (Castroviejo *et al.*, 1993). *Lavatera maritima* Gouan (malvavisco marino),

una especie poliploide (hexaploide) (Escobar, 2007), taxonómicamente integrada en la alianza *Malva*, que incluye aproximadamente 60 spp. (Bates, 1968; Kubitzki & Bayer, 2003). El objetivo de este estudio es describir el patrón de distribución geográfica y la estructura poblacional de esta especie teniendo en cuenta los factores ecológicos, geográficos y genéticos. Nuestra principal hipótesis es que la estructura genética poblacional presente está condicionada por los factores del nicho ecológico actual o pasado más que por factores históricos.

Para conseguir este objetivo, se ha llevado a cabo un estudio filogeográfico de la especie mediante el uso de marcadores moleculares en poblaciones actuales y se ha estimado el modelo de distribución de la especie actual y su proyección a climas del pasado.

6 Material y Métodos

6.1 Especie de estudio y estrategia de muestreo.

Lavatera maritima es un arbusto de 1-1,5 m de altura, muy ramificado, cuyas flores tienen pétalos color rosa pálido con la uña purpúrea (Castroviejo *et al.*, 1993). Vive junto a matorrales en medios alterados de forma natural, predominantemente al pie de paredes calizas, y más raramente de margas y esquistos. Aparece tanto en lugares litorales como en zonas del interior, hasta una distancia de 300 km de la costa, en altitudes que oscilan entre los 0 y los 900 m. Se distribuye por el oeste de la cuenca mediterránea (Península Ibérica, Francia, Italia, Córcega, Cerdeña, Túnez, Argelia) y Marruecos (norte y oeste) (Castroviejo *et al.*, 1993).

Se han muestreado 43 poblaciones a lo largo de su distribución natural, con un total de 597 individuos. Se recolectaron hojas nuevas de unos 10-15 individuos de cada población. Las muestras se deshidrataron y conservaron con gel de sílice.

6.2 Aislamiento de ADN, amplificación y secuenciación de regiones génicas.

El ADN genómico se extrajo empleando el DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN Inc., California), siguiendo el protocolo del fabricante.

Se llevó a cabo un estudio piloto con el objetivo de buscar variabilidad intraespecífica en secuencias de ADN para el estudio filogeográfico. Se secuenciaron diversas regiones del genoma en un bajo número de individuos por población (2-3), y se exploraron un marcador nuclear (*ITS*, espaciador transcrito interno del ADN ribosomal nuclear, ADNrn) y diferentes marcadores plastidiales (*ndhF*, *ndhF-rpl32*, *psbB-psbH*, *matK*, *rpl16*, *trnL(UAG)-rpl32*, *rpoB-trnC^{GCA}R*, *rps16*, *trnS-trnFM*, *trnD-trnT*, *trnK+matK*, *trnL*, *trnL-trnF*). La amplificación de cada región se efectuó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos obtenidos se enviaron a STAB Vida Lda. (Portugal) para su secuenciación.

6.3 Análisis de secuencias.

Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon manualmente usando el programa BioEdit v.7.0.5.1 (Hall, 1999). El estudio se ha centrado en la región plastidial *matK* y en la región nuclear *ITS*. Ambas regiones han sido analizadas por separado.

6.4 Identificación de haplotipos. Red de haplotipos.

Se construyeron una red de ribotipos (nucleares) y una red de haplotipos (plastidiales) usando el método de parsimonia estadística con el programa TCS v1.21 (Clement *et al.*, 2000).

6.5 Estimación de la diversidad genética.

Agrupamos las localidades de nuestra especie con el fin de compensar el bajo número de individuos secuenciados por cada población hasta el momento: *Sistemas Béticos* (Málaga, Granada, Almería, Jaén), *Levante* (Murcia, Alicante, Valencia, Castellón), *Sur de Pirineos* (Huesca, Zaragoza), *Sureste de Pirineos* (Girona), *Islas Baleares* (Menorca), *Cerdeña*, *Montañas del Rif* (Al-Hoceima, Taza, Nador, Berkane) y *Anti Atlas* (Agadir).

Se calculó el número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π) y número de sitios segregantes (S) con DnaSP v5.10.01 (Librado & Rozas, 2009) para cada marcador.

6.6 Modelos de distribución de especies (SDM, por sus siglas en inglés).

6.6.1 Predictores ambientales

Se han utilizado dos fuentes de variables predictivas:

1) 19 variables bioclimáticas de WorldClim (<http://www.worldclim.org/bioclim>, Hijmans *et al.*, 2005). El modelo de distribución actual fue proyectado para el Último Máximo Glacial (LGM, *Last Glacial Maximun*, 21000 años AP) y el último Interglacial (LIG, *Last Interglacial*, 120000-140000 años AP) usando las capas paleoclimáticas simuladas en el modelo general de circulación atmosférica MIROC (Model for Interdisciplinary Research on Climate) (Hasumi & Emori, 2004).

2) Datos de clima reciente proporcionados por la agencia estatal de meteorología (AEMET).

6.6.2 Modelización de la distribución espacial

Para modelizar la distribución geográfica de la especie se usó MAXENT v3.3 (Phillips *et al.*, 2006), una aplicación basada en ajustes de máxima entropía. Se calculó el estadístico AUC o área bajo la curva ROC que es una medida del ajuste del modelo a los datos de entrada. También se realizó el test Jackknife que viene implementado en el análisis de Maxent.

7 Resultados

7.1 Análisis de secuencias.

Solo las regiones *ITS* y *matK* mostraron variabilidad nucleotídica entre individuos de *L. maritima* en el estudio piloto. Para la región *ITS* se obtuvo una matriz formada por 164 secuencias con una longitud de 472 pb, y se detectaron cuatro sitios polimórficos. La matriz obtenida para la región plastidial *matK* estuvo compuesta por 89 secuencias cuya longitud total fue de 606 pb con tres sitios polimórficos.

7.2 Análisis de ribotipos.

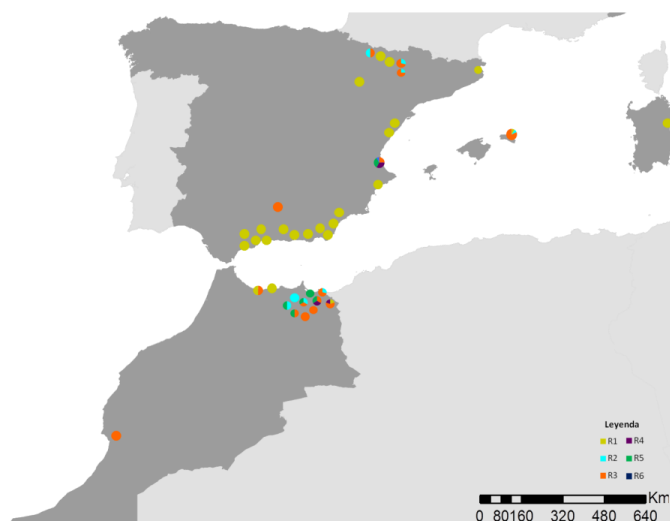


Figura 1. Distribución geográfica de los ribotipos. Cada círculo representa una localidad muestreada y la proporción en la que aparecen los ribotipos. Los colores representan los ribotipos tal como se muestran en la Fig. 2

El análisis de la región nuclear *ITS* identificó seis ribotipos basados en sustituciones nucleotídicas (Fig. 1). Los ribotipos más frecuentes fueron **R1** y **R3**, ambos distribuidos a ambos lados del estrecho de Gibraltar.

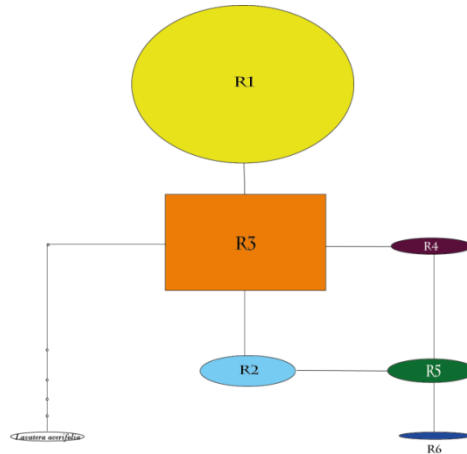


Figura 2. Red de ribotipos obtenida para *L. maritima*. Análisis de parsimonia estadística para los ribotipos *ITS*. Las líneas representan sustituciones simples de nucleótidos, y los puntos ribotipos perdidos (extintos o no encontrados). El tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias obtenidas para cada ribotipo.

La red de ribotipos obtenida con TCS (Fig. 2) muestra las relaciones entre los seis ribotipos

7.3 Análisis de haplotipos plastidiales.

El análisis de la región plastidial *matK* proporcionó cuatro haplotipos diferentes (Fig. 3). El haplotipo que aparece en mayor proporción es **H1**, que está ampliamente distribuido por la costa peninsular ibérica (28 poblaciones), Cerdeña y norte de Marruecos (8 poblaciones).

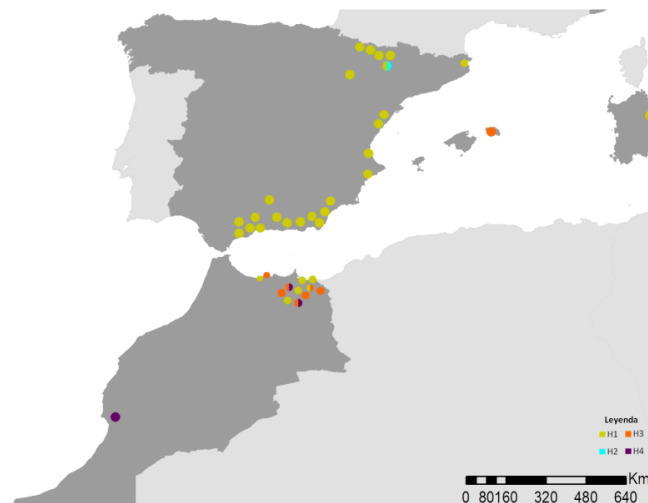


Figura 3. Distribución geográfica de los haplotipos plastidiales. Cada círculo representa una localidad muestreada y la proporción en la que aparece el haplotipo. Los colores representan los haplotipos tal como se muestran en la Fig. 4.

La red de haplotipos resultante del análisis TCS (Fig. 4) muestra las relaciones entre los cuatro haplotipos de *L. maritima*.

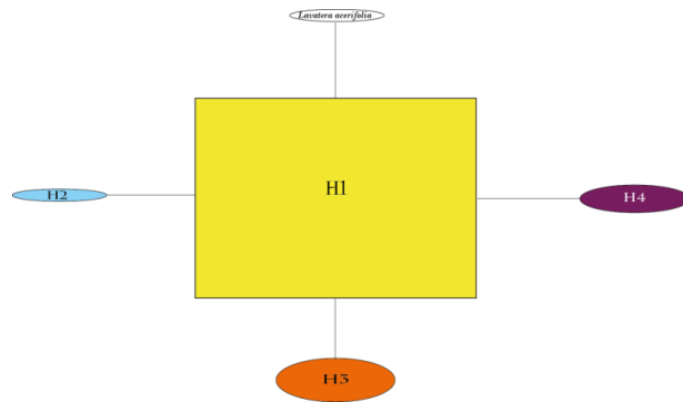


Figura 4. Red de haplotipos plastidiales obtenida para *L. maritima*. Análisis de parsimonia estadística para los haplotipos *matK*. Las líneas representan sustituciones simples de nucleótidos, y los puntos haplotipos perdidos (extintos o no encontrados). El tamaño de los círculos es proporcional al número de secuencias obtenidas para cada haplotipo.

7.4 Estimación de la diversidad genética.

Los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica de ambos marcadores están resumidos en la Tabla 1. Teniendo en cuenta los valores obtenidos para *ITS*, los grupos de poblaciones con mayor diversidad haplotípica son las *Montañas del Rif* ($H_d= 0,74$) y el *Sur de Pirineos* ($H_d=0.655$), mientras que la mayor diversidad nucleotídica aparece en las poblaciones de las *Montañas del Rif* y *Levante* ($\pi =0.00238$). Los datos obtenidos para la región plastidial apoyan la existencia de una mayor diversidad genética en las poblaciones agrupadas en las *Montañas del Rif*, ya que es donde aparece la mayor diversidad haplotípica ($H_d=0.578$) y nucleotídica ($\pi=0.00106$).

Tabla 1. Diversidad genética *Lavatera maritima*. *N* = Número de secuencias; *S* = Número de sitios segregantes; *h* = Número de haplotipos; H_d = Diversidad haplotípica; π = Diversidad nucleotídica

	ITS					matK				
	<i>N</i>	<i>h</i>	H_d	π	Sitios informativos	<i>N</i>	<i>h</i>	H_d	π	Sitios informativos
Todas las secuencias	1	0,	0,	0,00		8	0,	0,	0,00	
	64	6	642	205	3	9	4	363	064	2
Sur Pirineos (ES)	4	0,	0,	0,00		1	0,	0,	0,00	
	0	3	655	176	2	2	2	167	028	0
SE Pirineos (ES)	7	1	0	0	0	2	1	0	0	0
	3	0,	0,	0,00		1				
Levante (ES)	7	5	527	238	3	8	1	0	0	0
		0,	0,	0,00						
Islas Baleares (ES)	6	3	6	142	0	2	1	0	0	0
Sistemas Béticos (ES)	2	0,	0,	0,00		2				
	3	2	166	035	1	3	1	0	0	0
Montañas del Rif (MA)	3	0,	0,	0,00		2	0,	0,	0,00	
	4	5	74	238	3	6	3	578	106	2
	1									
Anti Atlas (MA)	1	1	0	0	0	4	1	0	0	0
Cerdeña (IT)	6	1	0	0	0	2	1	0	0	0

7.5 Modelos de distribución de especie.

El modelo de distribución de especie obtenido con las 19 variables bioclimáticas en MAXENT abarca la distribución actual conocida de *L. maritima* (Fig. 5). El valor AUC fue de 0.977. Estos datos indican que el modelo calibrado con las condiciones actuales es fiable y, por lo tanto, puede ser proyectado a épocas pasadas. El análisis de contribución de variables pone de manifiesto que la variable con mayor porcentaje de contribución al modelo es

bio19 (42%). De acuerdo al análisis Jackknife, las variables más informativas e importantes para el modelo son bio19 y bio17.

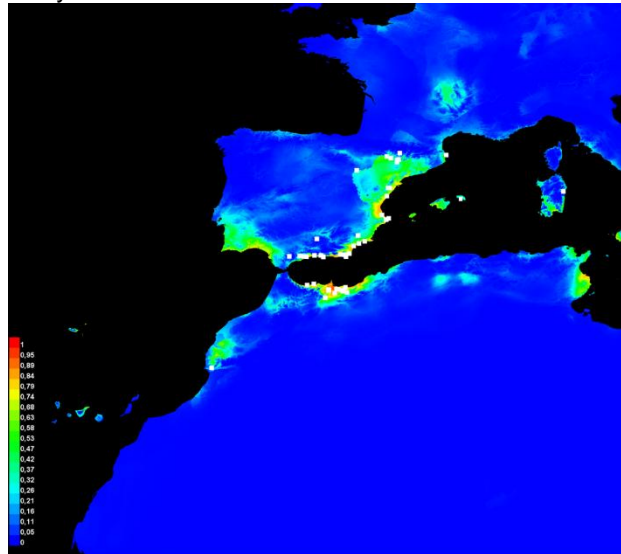


Figura 5. Modelo de distribución de *L. maritima* en la actualidad (variables Bioclim). La escala presenta los niveles de idoneidad para la especie.

El modelo de distribución obtenido usando las variables ambientales proporcionadas por AEMET (Fig. 6) obtuvo un valor de AUC de 0.980. El análisis de la contribución de variables revela que las variables con mayor contribución al modelo son la pendiente (27.3%), tm8 (20.6%) y tx7 (13.3%). El análisis Jackknife aporta unos resultados similares. Así pues, son tm8 y pendiente las variables que aportan mayor información al modelo.

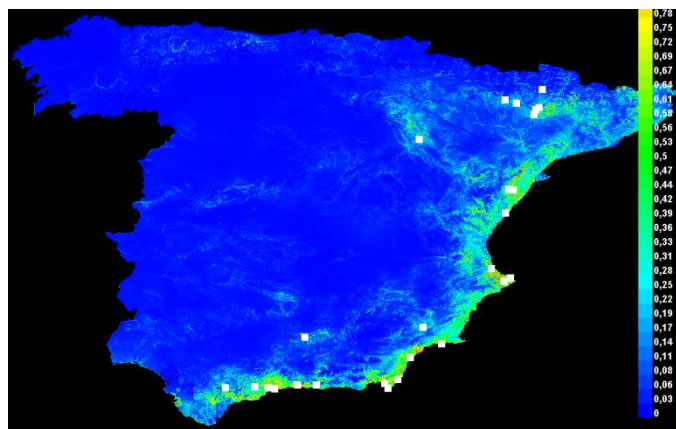


Figura 6. Modelo de distribución actual de *Lavatera maritima* para España (variables AEMET). La escala presenta los niveles de idoneidad para la especie.

El modelo proyectado para el LIG sitúa claramente la distribución potencial de la especie en el oeste de Marruecos y una pequeña área en el norte de Marruecos (Fig. 7), mientras que la proyección con MIROC para el LGM coloca la distribución potencial de la especie principalmente en el oeste del Marruecos, pero reconoce otras zonas con alta idoneidad como son el norte de Marruecos, la costa mediterránea española, Islas Baleares y Túnez (Fig. 8).

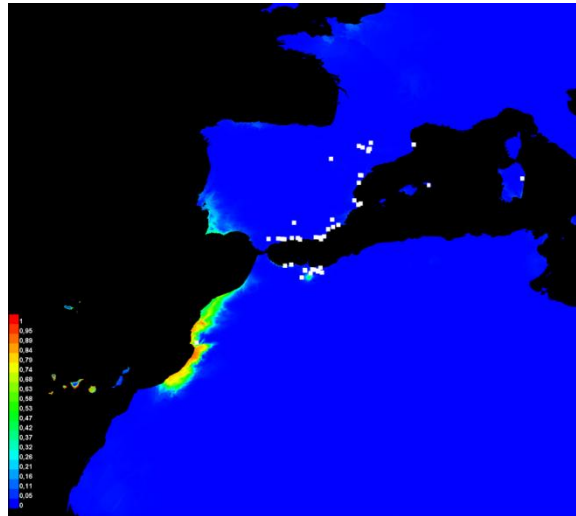


Figura 7. Modelo de distribución de *Lavatera maritima* para el LIG. La escala presenta los niveles de idoneidad para la especie

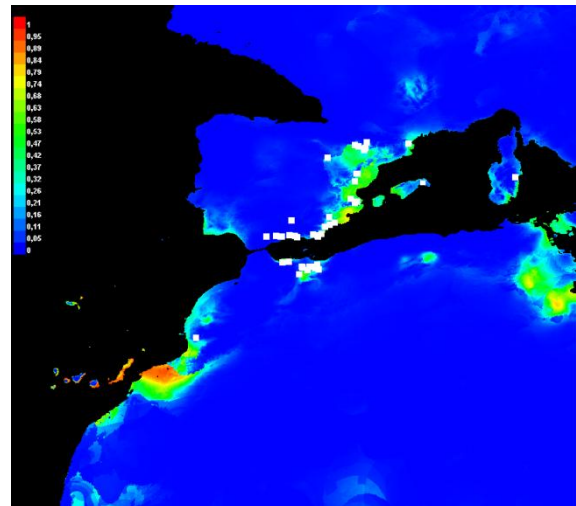


Figura 8. Modelo de distribución de *Lavatera maritima* para el LGM. La escala presenta los niveles de idoneidad para la especie.

8 Discusión

En este estudio se ha empleado una combinación de análisis filogeográficos y de modelización para explorar la relación entre la estructura genética y la distribución geográfica de la especie costera *L. maritima*. La proyección de su distribución a climas del pasado, durante el LIG (Último Interglaciario) y LGM (Último Máximo Glaciar) nos puede ayudar a entender si la estructura geográfica de la variación genética está relacionada con los cambios en su distribución potencial a lo largo del tiempo. Estas proyecciones de escenarios pasados en el marco de estudios de cambio global suelen asumir que la especie está en equilibrio con sus requerimientos ecológicos, esto es, su distribución está determinada principalmente por el ambiente, y no por otros factores como la competición o la limitación de la dispersión.

Diversidad genética y áreas de refugio

A pesar de las diferentes tasas de mutación observadas entre el genoma nuclear y plastidial, los marcadores moleculares empleados en el análisis filogeográfico, de herencia distinta, son congruentes y útiles para explicar la diversidad genética de la especie. El

análisis filogeográfico revela que las áreas geográficas que presentan mayor diversidad genética están situadas al norte de Marruecos (Montañas del Rif) y en el noreste de España (Sur de Pirineos) (Tabla 1).

Los refugios glaciares son enclaves donde la diversidad genética, perdida en otros lugares por efecto de los cambios climáticos, se ha conservado y concentrado (Médail & Diadema, 2009). Basándonos en el análisis poblacional de la diversidad genética podemos considerar el norte de Marruecos como el principal refugio durante el Cuaternario para *L. maritima*, debido a que presenta los mayores valores de diversidad haplotípica y nucleotídica para ambos marcadores moleculares (ITS y matK). Otras zonas que presentan alta variabilidad genética son Levante y sur de Pirineos (Pre-Pirineo). Estas regiones presentan alelos únicos tanto en las secuencias nucleares como en las plastidiales (R6 en Marzuquera y H2 en Castillonroy). Según Widmer & Lexer (2001), este patrón ayudaría a distinguir refugios glaciares en zonas de latitudes intermedias donde se hubieran acumulado poblaciones durante la recolonización. Los datos genéticos obtenidos para las poblaciones de la región del sur de España muestran baja o nula variabilidad genética. Estos datos sugieren que pueda tratarse de áreas de colonización post-glaciar.

L. maritima y su especie hermana, *L. acerifolia* (endémica de las Islas Canarias) se han originado de un antepasado común. Este dato junto con la presencia del ribotipo ancestral (R3) de *L. maritima* al oeste de Marruecos, apuntan a Marruecos como el posible centro de origen de la especie.

Origen, dispersión y colonización postglacial

El patrón de distribución geográfica de la diversidad genética es congruente con el modelo de distribución potencial obtenido de *L. maritima* para la actualidad y el LGM, ya que las zonas con mayor diversidad genética coinciden con las zonas de alta idoneidad para la presencia de la especie a lo largo del tiempo.

El área del norte de Marruecos aparece como una zona de alta idoneidad para la presencia de la especie en los modelos de distribución analizados desde el LIG (140000-120000 años AP) hasta la actualidad. Levante y sur de Pirineos (Pre-Pirineo) aparecen como zonas con alta idoneidad para *L. maritima* desde el Último Máximo Glaciar (21000 años AP) hasta la actualidad. Por lo tanto, pueden haber formado un refugio secundario, de origen más reciente, con respecto al refugio del norte de Marruecos. Las poblaciones de la región del sur de España no aparecen como zonas con alta idoneidad de presencia ni durante el LIG ni en el LGM, por lo que se pueden considerar áreas de colonización post-glaciar.

El modelo es validado por las referencias existentes de presencia en Portugal y Macizo Central francés (GBIF), localidades no utilizadas en el análisis pero predichas por el modelo (Fig. 5). El modelo realizado con las variables climáticas más precisas de AEMET ofrece una distribución actual de la especie muy similar a la proporcionada con los datos de Bioclim para la península Ibérica (Fig. 6). Sin embargo, existen algunos puntos de discrepancia como la alta idoneidad mostrada en la costa de Valencia en el modelo propuesto con variables Bioclim, que desaparece en el modelo propuesto con las variables AEMET. También ocurre algo similar en el suroeste de España. Esto puede deberse a la inclusión de las variables topográficas (pendiente y orientación) en el modelo realizado con las variables de AEMET.

Observamos que de las poblaciones actuales, el modelo proyectado para LIG solo infiere presencia de *L. maritima* en el noreste y oeste de Marruecos, por lo que la península Ibérica, Islas Baleares y Cerdeña, de acuerdo con este modelo, han debido ser colonizadas más recientemente desde el norte de África. Dada la ausencia de conexiones terrestres posteriores al LIG, podemos suponer eventos de dispersión para explicar (1) la colonización a través del estrecho de Gibraltar (desde el norte de África a la península Ibérica), y (2) el salto hacia las islas continentales del Mediterráneo occidental (Baleares y Cerdeña) que podría ser un caso de dispersión a larga distancia.

La distribución de las poblaciones de *L. maritima* en Marruecos sugiere la existencia de una disyunción antigua entre las poblaciones de las montañas del Rif (noreste) y el Anti Atlas (suroeste). Esta distribución disyunta se observa en los patrones de distribución potencial de la especie desde el LIG hasta la actualidad, pero sin embargo no está apoyada por los datos moleculares, ya que no existe una clara diferenciación genética entre las poblaciones de ambas regiones.

9 Conclusión

El análisis conjunto filogeográfico y de los modelos de distribución de especies sugieren que, en efecto, las variaciones climáticas del Cuaternario han determinado la actual estructura genética de la especie. Es decir, los factores que influyen en el nicho ecológico de la especie determinan su diversidad genética actual.

Nuestros resultados ilustran cómo el uso de métodos filogeográficos y modelos de distribución de especies, junto con la proyección a climas del pasado, pueden ayudar a entender los patrones de colonización, diferenciación y biogeografía de las especies.

10 Referencias

- Bates, D.M. (1968). Generic relationships in the Malvaceae, tribe Malveae. *Gentes Herbarum* 10: 117-135.
- Bennett, K.D. & Provan, J. (2008). What do we mean by "refugia"? *Quaternary Science Review* 27: 2449-2455.
- Blondel, J. & Aronson, J. (1999). *Biology and Wildlife of the Mediterranean Region*. Oxford University Press, Oxford, Gran Bretaña.
- Blondel, J., Aronson, J., Bodiou, J.Y. & Boeuf, G. (2010). *The Mediterranean region: biological diversity in space and time*. Oxford University Press, Oxford, Gran Bretaña.
- Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Muñoz Garmendia, F., Navarro, C., Paiva, J. & Soriano, C. (eds.) (1993). *Flora ibérica* 3. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid, España.
- Clement, M., Posada, D. C. K. A. & Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659.
- Comes, H. P. & Kadereit, J. W. (1998). The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science* 3: 432-438.
- Dercourt, J., Gaetani, M., Vrielynck, B., Barrier, E., Biju-Duval, B., Brunet, M. F., Cadet, J.P., Crasquin, S. & Sandulescu, M. E. (2000). *Atlas Peri-Tethys, Palaeogeographical maps*. CCGM/CGMW, Paris, Francia.
- Escobar Garcia, P. (2007). Filogenia de la alianza genérica de Malva: un enfoque molecular. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium series*, 41:95-98.
- Hasumi, H. & Emori, S. (2004). *K-1 coupled gcm (miroc) description*. Center for Climate System Research, University of Tokyo, Tokyo, Japón.
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G. & Jarvis, A. (2005). Very High Resolution Interpolated Climate Surfaces for Global Land Areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965–1978.
- Krijgsman, W. (2002). The Mediterranean: *mare nostrum* of Earth sciences. *Earth and Planetary Science Letters* 205: 1-12.
- Kubitzki, K. & Bayer, C. (2003). Flowering Plants: Dicotyledons: Capparales, Malvales and Non-betain Caryophyllales. In, Kubitzki, K. (ed) *The Families and Genera of Vascular Plants* 5. Springer Verlag, Berlin, Alemania.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Médail, F. & Diadema, K. (2009). Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography* 36: 1333-1345.
- Phillips, S. J., Anderson, R. P. & Schapire, R. E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231-259.
- Quézel, P. (1985) Definition of the Mediterranean region and the origin of its flora, in Gomez-Campo, C (ed.), *Plant conservation in the Mediterranean area*, pp. 9-24., W. Junk, Dordrecht, Países Bajos.
- Stewart, J.R., Lister, A.M., Barnes, I. & Dalén, L. (2010). Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277: 661-671.

Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. G. & Cosson, J. F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.

Weising, K. & Freitag, H. (2007). Phylogeography of halophytes from European coastal and inland habitats. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology* 246: 279-292.

Widmer, A. & Lexer, C. (2001). Glacial refugia: sanctuaries for allelic richness, but not for gene diversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 16: 267-269.

CO-65 Enantiomers with different apoptosis indexes: the importance of homochirality in anticancer agents

M.E. García-Rubiño, c/ Campus de Cartuja, s/n, 18071 Granada (Spain), Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, rubino@ugr.es
 A. Conejo-García, c/ Campus de Cartuja, s/n, 18071 Granada (Spain), Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, aconejo@ugr.es
 M.C. Núñez-Carretero, c/ Campus de Cartuja, s/n, 18071 Granada (Spain), Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, mcnunez@ugr.es
 C. Lozano-López, c/ Campus de Cartuja, s/n, 18071 Granada (Spain), Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, dga1989@correo.ugr.es
 M.A. Gallo, c/ Campus de Cartuja, s/n, 18071 Granada (Spain), Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, magallo@ugr.es
 J.M. Campos, c/ Campus de Cartuja, s/n, 18071 Granada (Spain), Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, jmcampos@ugr.es

Abstract

Mitsunobu reaction was carried out between (*R*)- and (*S*)-3,4-dihydro-2*H*-1,5-benzoxathiepin-3-ol and purines under microwave irradiation. A contraction into a six-membered ring takes place with concomitant inversion at the stereocentre with excellent enantioselectivities. One of the enantiomers is more potent as apoptosis inducer than the clinically-used paclitaxel against the MCF-7 cell line.

Keywords

Antitumour drugs, apoptosis, 1,4-benzoxathiepin, breast cancer cell line MCF-7, eIF2 α , enantiospecific synthesis, neighbouring-group participation

1 Introduction

Breast cancer is the most common malignancy amongst women in the United States, and the second leading cause of cancer-related death in women.¹ Standard treatments include cytotoxic non-specific chemotherapy and therapies targeted against the estrogen receptor (ER) or HER2. Despite the availability of effective ER- and HER2-targeted therapies,^{2,3} drug discovery efforts continue to seek additional agents that may prove to be effective in monotherapy or in combination with cytotoxic therapy or other targeted therapies. Our group recently reported the synthesis and biological activity against the MCF-7 cancer cell line of a series of eleven substituted racemic 9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiepin-3-ylmethyl)-9*H*-purines **1-11**, and 9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiepin-2-ylmethyl)-9*H*-purines **12-15** (Fig. 1).^{4,5}

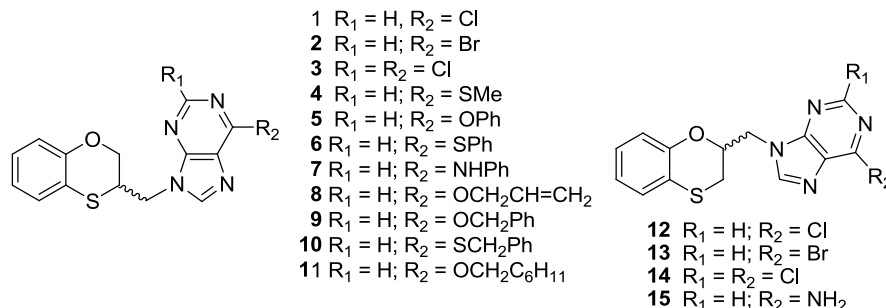
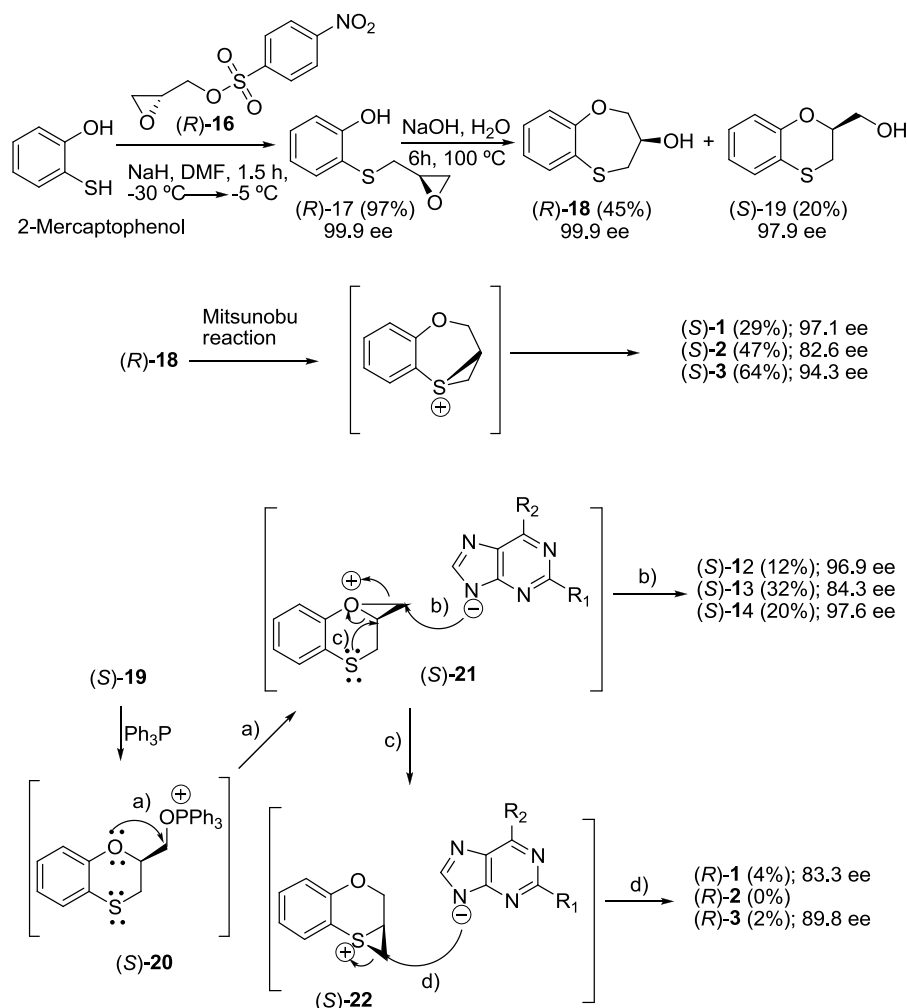


Figure 1. Racemic molecules previously synthesized by our Group.^{4,5}

2 Materials and Methods

The issue of drug chirality is now a major theme in the design and development of new drugs, underpinned by a new understanding of the role of molecular recognition in many pharmacologically relevant events.⁶ For the first time we report herein the stereospecific synthesis both enantiomers of **1-3** and **12-14** from 2-mercaptophenol and enantiomeric pure epichlorohydrin or glycidyl 3-nitrobenzenesulfonate, subsequent cyclization reaction to produce the homochiral seven-membered secondary and six-membered primary alcohols, which after separation via flash chromatography undertook the Mitsunobu reaction to yield the target compounds with excellent enantiomeric excesses (ee). The anticancer activity of homochiral compounds **1-3** and **12-14** are evaluated against the human breast cancer cell line MCF-7.

The intrinsically chiral and non-racemic nature of the living world often results in its different interactions with the enantiomers of a given substance. If this substance is a drug, it might well be that only one of the two isomers is capable of exerting the desired therapeutic effect. The other may be inert (but must still be metabolized by the organism), harmful (causing even dramatic biological damages), or responsible for difficult-to-predict (and possibly undesirable) side effects. Three-carbon (C-3) epoxides bearing halide substituents are highly versatile synthetic building blocks because each carbon is functionalized and is a potential site of nucleophilic attack. Sharpless *et al.* described the preparation of a series of crystalline arenesulfonate derivatives of enantiomerically enriched glycidol and their application to the synthesis of homochiral β -adrenergic blocking agents.⁷ In other similar reports, marked racemisation occurs on the reaction and the optical purity decreases.⁸ As we have used the *p*-nitrobenzenesulfonyl moiety for the preparation of interesting anticancer derivatives⁹ we decided to employ (*R*)-glycidyl *p*-nitrobenzene sulfonate **16** as reagent (Scheme 1). The formation of (*R*)-**17** from (*R*)-**16** is very troublesome and the experimental conditions outlined in Scheme 1 must be carried out precisely; a slight variation would lead to a drop in the yield of (*R*)-**17**. After cooling in an ice-water bath a solution of 2-mercaptophenol in dry DMF, NaH 60% was added, and the reaction mixture was stirred at rt for 30 min. A solution of (*R*)- or (*S*)-**16** was then added subsequently dropwise to the above solution cooled to -30 °C. The reaction mixture was allowed to reach -5 °C progressively during one hour and 45 min. After standard workup conditions, intermediates (*R*)- and (*S*)-**17** were obtained with 99.9% ee and the purity of each enantiomer was confirmed by HPLC analysis. When **16** was used equimolarly in relation to 2-mercaptophenol, the major product was 1,3-bisphenoxy-2-propanol rather than the epoxypropoxyphenol **17**. With double equivalents of glycidyl-*p*-nitrobenzene sulfonate **16**, the reaction proceeded to selectively give the desired product.



Scheme 1. Synthesis of the homochiral derivatives (R)-18 and (S)-19, that are starting materials for the preparation of di- and tri-substituted purines. Proposed mechanism for the formation of (S)- and (R)-1-3, (S)- and (R)-12-14.

The Synthesis of (R)-3-[(2-Hydroxyphenyl)thio]-1,2-Epoxypropane (8) from (S)-Epichlorohydrin (7) was carried out according to a reported procedure,¹ except that racemic epichlorohydrin was changed for its enantiomer. (R)-8: 99.9 ee, $[\alpha]_D^{25} = -46.6$ (*c* 1.0; CH_2Cl_2); HPLC analysis: Chiralpak IA, hexane/*i*-propanol = 90/10, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (R)-8 = 12.4 min.

Synthesis of (S)-3-[(2-Hydroxyphenyl)Thio]-1,2-Epoxypropane (8) from (S)-Glycidyl *p*-Nitrobenzene Sulfonate (7).

Under argon atmosphere a solution of 2-mercaptophenol (1.989 mmol, 0.2ml) and dry DMF (30ml) in a round-bottom flask, was cooled in an ice-water bath and NaH 60% (1.989 mmol, 80mg) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min until obtain a yellow solution.

A solution of (S)-Glycidyl-*m*-nitrobenzenen sulfonate 7 (3.978 mmol, 1.025g) in dry DMF (20ml) was added

(30 min) dropwise to above solution cooled to -30 °C. The reaction mixture was allowed to reach -5 °C progressively during one hour and 45 min. (10 min: -30 °C, 10 min: -25 °C, 10 min: -23 °C, 10 min: -21 °C, 20 min: -10 °C, 30 min: -7 °C, 15 min: -5 °C). The colour solution changed from brown-red to yellow.

The pH was fixed to 4-5 with HCl (1N). The solvent was evaporated and water (30ml) was added to the residue. The aqueous layer was extracted (CH₂Cl₂, 3x 30ml), the organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure.

The purification from the crude product (3.15g) by flash column chromatography on silica gel with a gradient elution (dichloromethane/methanol: 9.9:0.1 → 9:1), provided (S)- **8** (294.5 mg, 96.6%) as a yellow oil in good yield. These intermediate (S)- **8** were obtained with high enantiomeric purities (99.9% ee) and the purity of each enantiomer was confirmed by HPLC analysis.

The compound (S)- **8** were obtained with a 97% yield; (S)- **8**: 99.9 ee, $[\alpha]_D^{25} = +43.5$ (c 1.0; CH₂Cl₂); Chiralpak IA, hexane/*i*-propanol = 90/10, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (S)-**8** = 11.3 min.

The synthesis of (R)- and (S)-3,4-Dihydro-2H-1,5-Benzoxathiepin-3-ol (10), and (S)- and (R)-2,3-Dihydro-1,4-Benzoxathiin-2-Methanol (11) was carried out according to a reported procedure,¹ except that the racemic 3-[(2-hydroxyphenyl)thio]-1,2-epoxypropane was changed for (R)- and (S)-3-[(2-hydroxyphenyl)thio]-1,2-epoxypropane. Both (R)- and (S)-**10** were obtained with a 45% yield, and both (S)- and (R)-**11** were obtained with a 20% yield; (R)-**10**: 99.9 ee, $[\alpha]_D^{25} +39.0$ (c 1.0 in CH₂Cl₂); HPLC analysis: Chiralpak IA, hexane/dichloromethane = 65/35, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (R)-**10** = 10.717 min; (S)-**10**: 95.3 ee, $[\alpha]_D^{25} -36.7$ (c 1.0 in CH₂Cl₂); Chiralpak IA, hexane/dichloromethane = 65/35, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (R)-**10** = 10.896 min, t_R (S)-**10** = 12.079 min. (S)-**11**: 95.84 ee, $[\alpha]_D^{25} -39.8$ (c 1.0 in CH₂Cl₂); HPLC analysis: Chiralpak IA, hexane/dichloromethane = 65/35, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (S)-**11** = 14.899, t_R (R)-**11** = 16.249 min; (R)-**11**: 98.54 ee, $[\alpha]_D^{25} +38.1$ (c 1.0 in CH₂Cl₂); Chiralpak IA, hexane/dichloromethane = 65/35, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (S)-**11** = 14.682 min, t_R (R)-**11** = 15.890 min.

General Procedure for the Microwave-Assisted Synthesis of Compounds (S)- and (R)-1-3 and (R)- and (S)-4-6, from (S)- and (R)-2,3-Dihydro-2H-1,4-Benzoxathiin-2-Methanol (11). It was performed according to a reported procedure,² except that racemic 2,3-dihydro-2H-1,4-benzoxathiin-2-methanol (**11**) was changed for their enantiomers.

(S)-6-Chloro-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-2-ylmethyl)-9H-purine [(S)-1] and (R)-6-chloro-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-3-ylmethyl)-9H-purine [(R)-4]. (S)-1 and (R)-4 were obtained with 12% and 4% yields, respectively; (S)-1: 96.9 ee, $[\alpha]_D^{25} -23.2$ (c 1.0 in CH₂Cl₂); HPLC analysis: Chiralpak IA, hexane/ ethanol = 80/20, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (R)-1 = 14.163 min, t_R (S)-1 = 18.574 min.

(R)-6-Chloro-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-2-ylmethyl)-9H-purine [(R)-1] and (S)-6-chloro-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-3-ylmethyl)-9H-purine [(S)-4]. (R)-1 and (S)-4 were obtained with 34% and 9% yields, respectively; (R)-1: 94.1 ee, $[\alpha]_D^{25} +22.8$ (c 1.0 in CH₂Cl₂); HPLC analysis: Chiralpak IA, hexane/ ethanol = 80/20, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (R)-1 = 13.881 min, t_R (S)-1 = 18.751 min.

(S)-6-Bromo-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-2-ylmethyl)-9H-purine [(S)-2]. (32%); 92.3 ee, $[\alpha]_D^{25} -93.7$ (c 1.0 in CH₂Cl₂); HPLC analysis: Chiralpak IA, hexane/ ethanol = 80/20, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (R)-2 = 18.622 min, t_R (S)-2 = 19.78 min.

Compound (R)-6-Bromo-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-2-ylmethyl)-9H-purine [(R)-5] was not isolated.

(R)-6-Bromo-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-2-ylmethyl)-9H-purine [(R)-2] and (R)-6-bromo-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-3-ylmethyl)-9H-purine [(S)-5]. (R)-2 and (S)-5

were obtained with 54% and 4% yields respectively; (*R*)-**2**: 94.3 ee, $[\alpha]_D^{25} +101.2$ (*c* 1.0 in CH₂Cl₂); HPLC analysis: Chiralpak IA, hexane/ ethanol = 80/20, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (*R*)-**2** = 18.19 min, t_R (*S*)-**2** = 19.804 min.

(S)-2,6-Dichloro-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-2-ylmethyl)-9H-purine [(S)-3] and **(R)-2,6-dichloro-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-3-ylmethyl)-9H-purine [(R)-6]**. (*S*)-**3** and (*R*)-**6** were obtained with 20% and 2% yields, respectively; (*S*)-**3**: 97.6 ee, $[\alpha]_D^{25} -37.7$ (*c* 1.0 in CH₂Cl₂); HPLC analysis: Chiralpak IA, hexane/*i*-propanol = 90/10, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (*S*)-**3** = 15.231 min, t_R (*R*)-**3** = 17.392 min.

(R)-2,6-Dichloro-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-2-ylmethyl)-9H-purine [(R)-3] and **(S)-2,6-dichloro-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-3-ylmethyl)-9H-purine [(S)-6]**. (*R*)-**3** and (*S*)-**6** were obtained with 72% and 3% yields, respectively; (*R*)-**3**: 96.2 ee, $[\alpha]_D^{25} +38.2$ (*c* 1.0 in CH₂Cl₂); HPLC analysis: Chiralpak IA, hexane/*i*-propanol = 90/10, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (*S*)-**3** = 15.021 min, t_R (*R*)-**3** = 17.032 min.

General Procedure for the Microwave-Assisted Synthesis of Compounds (S)- and (R)-1-3 from (R)- and (S)-3,4-Dihydro-2H-1,5-Benzoxathiepin-3-ol (10). It was performed according to a reported procedure,¹ except that racemic 3,4-dihydro-2H-1,5-benzoxathiepin-3-ol (**10**) was changed for their enantiomers.

(S)-6-Chloro-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-3-ylmethyl)-9H-purine [(S)-4]. (29%); 97.1 ee, $[\alpha]_D^{25} +26.9$ (*c* 1.0 in CH₂Cl₂); HPLC analysis: Chiralpak IA, hexane/*i*-propanol = 90/10, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (*R*)-**4** = 19.176 min, t_R (*S*)-**4** = 21.388 min. **(R)-6-Chloro-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-3-ylmethyl)-9H-purine [(R)-4]**. 78% yield; 83.3 ee, $[\alpha]_D^{25} -24.9$ (*c* 1.0 in CH₂Cl₂); HPLC analysis: Chiralpak IA, hexane/*i*-propanol = 90/10, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (*R*)-**4** = 19.017 min, t_R (*S*)-**4** = 21.754 min.

(S)-6-Bromo-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-3-ylmethyl)-9H-purine [(S)-5]. (47%); 90.6 ee, $[\alpha]_D^{25} +53.9$ (*c* 1.0 in CH₂Cl₂); HPLC analysis: Chiralpak IA, hexane/*i*-propanol = 90/10, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (*R*)-**5** = 19.018 min, t_R (*S*)-**5** = 21.216 min. **(R)-6-Bromo-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-3-ylmethyl)-9H-purine [(R)-5]**. 53% yield; 94.4 ee, $[\alpha]_D^{25} -55.9$ (*c* 1.0 in CH₂Cl₂); HPLC analysis: Chiralpak IA, hexane/*i*-propanol = 90/10, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (*R*)-**5** = 20.075 min, t_R (*S*)-**5** = 21.698 min.

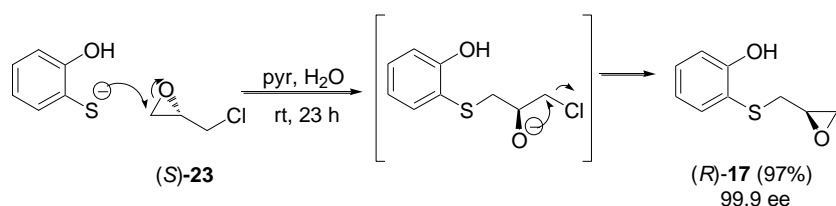
(S)-2,6-Dichloro-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-3-ylmethyl)-9H-purine [(S)-6]. 64% yield; 94.3 ee, $[\alpha]_D^{25} +64.7$ (*c* 1.0 in CH₂Cl₂); HPLC analysis: Chiralpak IA, hexane/*i*-propanol = 90/10, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (*R*)-**6** = 14.353 min, t_R (*S*)-**6** = 16.92 min. **(R)-2,6-Dichloro-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-3-ylmethyl)-9H-purine [(R)-6]**. 32% yield; 89.8 ee, $[\alpha]_D^{25} -62.5$ (*c* 1.0 in CH₂Cl₂); HPLC analysis: Chiralpak IA, hexane/*i*-propanol = 90/10, flow rate 1.0 mL/min, $\lambda = 250$ nm, t_R (*R*)-**6** = 14.183 min, t_R (*S*)-**6** = 17.006 min.

3 Results

It has to be pointed out that the stereochemistry of homochiral derivatives **1**, **2** and **3** are inverted depending on the configuration of the starting material (*R*)-**18** or (*S*)-**19**, although the yields of the products formed from the benzo-fused seven-membered secondary alcohol **18** are higher than those synthesized from the benzo-fused six-membered primary alcohol **19**.

Epichlorohydrin is a readily available C-3 unit that is widely employed in organic and polymer synthesis.¹⁰ When (*S*)-epichlorohydrin [(*S*)-**23**] was used instead of (*R*)-glycidyl *p*-nitrobenzene sulfonate [(*R*)-**16**], the same homochiral product (*R*)-3-[(2-hydroxyphenyl)thio]-1,2-epoxypropane [(*R*)-**17**] was obtained, implying nucleophilic attack at the less hindered ep-

oxide carbon atom and subsequent opening of the three-membered ring, which cyclizes again to the oxirane with complete inversion of its configuration (Scheme 2). Moreover, the preparation of the homochiral derivative **17** from epichlorohydrin is far more convenient and easier than that starting from glycidyl *p*-nitrobenzene sulfonate **16**.



Scheme 2. Complete inversion of the oxirane ring through the intermediacy of an alkoxide that effects a second displacement on the Cl-bearing carbon atom.

When the reactions explained in Schemes 1 and 2 were carried out using (*S*)-**16** as starting material, the corresponding enantiomers were obtained with the following yields:

a) From (*S*)-**18**: (*R*)-**1** (78%, 89.8% ee), (*R*)-**2** (53%, 94.4% ee), and (*R*)-**3** (32%, 82.3% ee).
 b) From (*R*)-**19**: (*R*)-**12** (34%, 96.2 % ee), (*R*)-**13** (54%, 94.3% ee), (*R*)-**14** (72%, 94.1% ee), (*S*)-**1** (14%, 97% ee), (*S*)-**2** (4%, 82.6% ee), and (*S*)-**3** (8%, 94.3% ee).

Racemic compounds **1-3** and **12-14** were selected because of their high anticancer activity between the two series of compounds.^{4,5} The activities against the MCF-7 cell line for the racemic and homochiral compounds having the 1,4-benzoxathiin-3-ylmethyl (**1-3**) and the benzoxathiin-2-ylmethyl (**12-14**) motifs are shown in the Table 1.

Comp.	IC ₅₀ (μM) ^a	Total apoptosis	Comp.	IC ₅₀ (μM) ^a	Total apoptosis
(<i>RS</i>)- 12 ⁵	9.24 ± 0.01	67.35 ± 0.90 ^b 10.3 ± 0.14 ^c	(<i>RS</i>)- 1 ⁴	10.6 ± 0.66	73.8 ± 0.42 ^b 22.55 ± 0.07 ^c
(<i>R</i>)- 12	4.73 ± 0.02	42.95 ± 0.63 ^b 9.7 ± 0.42 ^c	(<i>R</i>)- 1	15.2 ± 0.03	71.95 ± 0.21 ^b 20.25 ± 0.21 ^c
(<i>S</i>)- 12	11.4 ± 0.06	89.5 ± 0.70 ^b 19.05 ± 0.63 ^c	(<i>S</i>)- 1	3.30 ± 0.02	31.55 ± 1.40 ^b 13.95 ± 0.6 ^c
(<i>RS</i>)- 13 ⁵	4.87 ± 0.02	99.45 ± 0.07 ^b 38.45 ± 4.73 ^c	(<i>RS</i>)- 2 ⁴	6.18 ± 1.70	63.45 ± 1.50 ^b 30.6 ± 6.78 ^c
(<i>R</i>)- 13	4.45 ± 0.07	63.75 ± 6.0 ^b 15.95 ± 2.33 ^c	(<i>R</i>)- 2	6.17 ± 0.07	55.75 ± 12 ^b 26.55 ± 0.2 ^c
(<i>S</i>)- 13	3.33 ± 0.13	50.2 ± 1.13 ^b 25.15 ± 0.49 ^c	(<i>S</i>)- 2	6.32 ± 0.04	60.5 ± 9.0 ^b 41.8 ± 0.56 ^c
(<i>RS</i>)- 14 ⁵	2.75 ± 0.03	97.7 ± 0.56 ^b 29.35 ± 0.30 ^c	(<i>RS</i>)- 3 ⁴	8.97 ± 0.83	51.35 ± 0.21 ^b 15.75 ± 0.49 ^c
(<i>R</i>)- 14	3.33 ± 0.04	99.1 ± 0.65 ^b 76.95 ± 2.80 ^c	(<i>R</i>)- 3	10.3 ± 0.01	27.35 ± 0.07 ^b 6.25 ± 3.30 ^c
(<i>S</i>)- 14	1.85 ± 0.05	89.4 ± 1.50 ^b 33.15 ± 0.20 ^c	(<i>S</i>)- 3	6.93 ± 0.09	58.75 ± 2.75 ^b 60.35 ± 2.40 ^c

Table 1. Antiproliferative effect and apoptosis induction for the target compounds **1-3** and **12-14**.

^aAll experiments were conducted in duplicate and gave similar results. The data are means ± SEM of three independent determinations. IC₅₀ was determined after 6 days of treatment. ^bCells were treated with the 3 × IC₅₀ values of compounds. ^cCells were treated with the IC₅₀ values of compounds. Apoptosis was detected after 48 h of treatment.

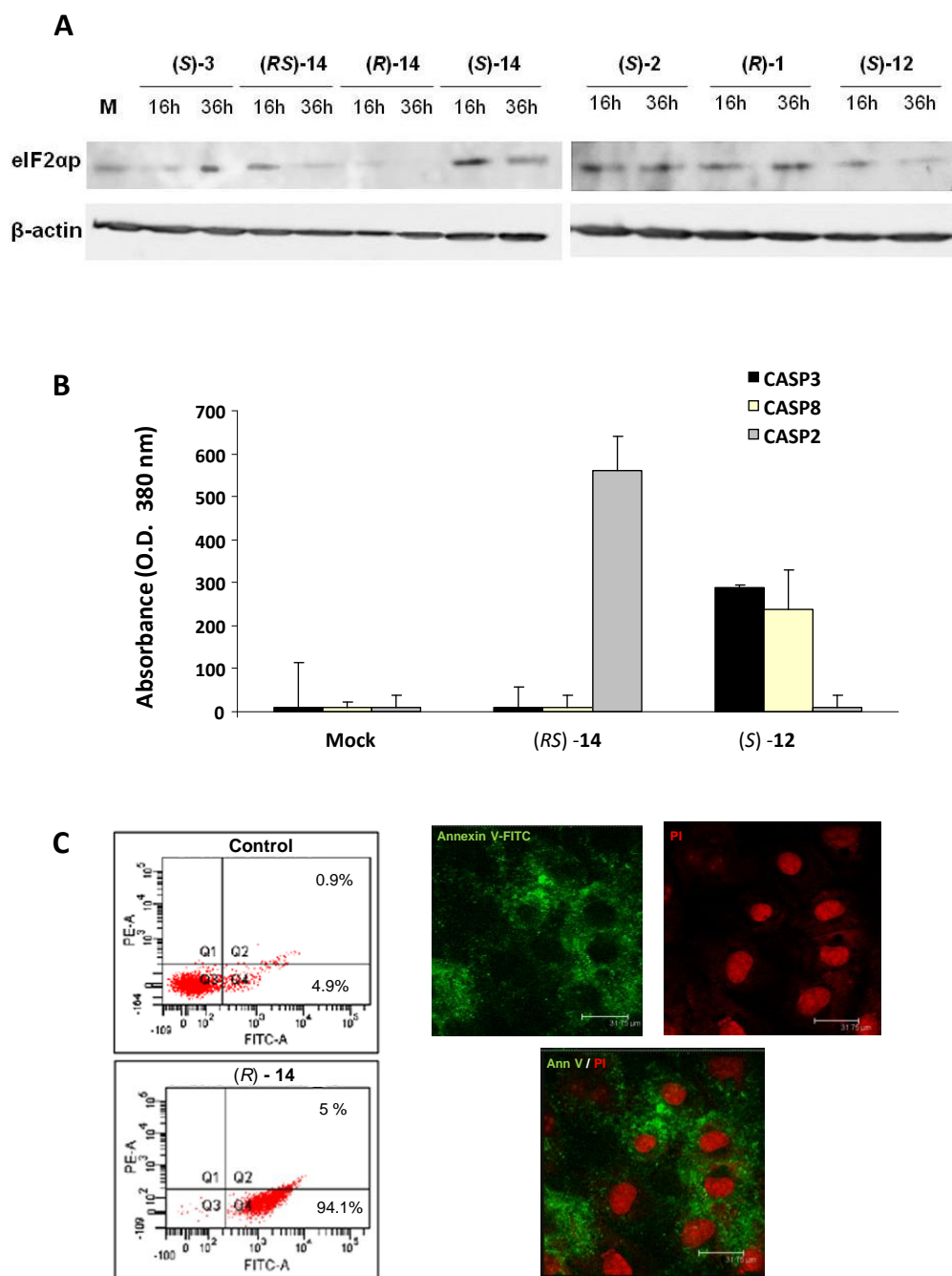


Figure 2. Biological activities of compounds (RS)-14, (R)-14, (S)-14, (R)-1, (S)-1, (S)-2, (S)-3 and (S)-12 on MCF-7 human breast cancer cell line. **(A)** Cells treated with compounds (RS)-14, (R)-14, (S)-14, (R)-1, (S)-1, (S)-2, (S)-3 and (S)-12 for 16 and 36 h. Total proteins were extracted for immunoblot analysis using anti-phospho-eIF2α, and anti-β-actin antibodies. **(B)** Fluorometric detection for caspase-3, caspase-2 and caspase-8. **(C)** Representative panels of cytometry analysis for control cells treated with 0.5% DMSO alone, and (R)-3. In each panel, lower left quadrant (Q3) shows viable cells which are negative for both annexin V-FITC and PI, lower right (Q4) shows annexin V positive cells which are in the early stage of apoptosis, upper left (Q1) shows only PI positive cells which are dead, and upper right (Q2) shows both annexin V and PI positive, which are in the stage of late apoptosis. Confocal microscopy analysis using simultaneous staining with annexin V-FITC (green) and PI (red) in MCF-7 after treatment with (R)-3.

The following can be deduced from analyzing the data of this Table: (a) (RS)-1 and (RS)-

12 isomers are equipotent. Nevertheless, (*S*)-**1** ($3.30 \pm 0.02 \mu\text{M}$) is 3-fold more active than its racemate, whilst (*R*)-**12** ($\text{IC}_{50} = 4.73 \pm 0.02 \mu\text{M}$) is 2-fold more active than (*RS*)-**12** ($\text{IC}_{50} = 9.24 \pm 0.01 \mu\text{M}$) against the MCF-7 breast cancer cell line; (b) (*RS*)-**2**, and (*RS*)-**13** isomers are equipotent. Nevertheless, (*S*)-**13** ($\text{IC}_{50} = 3.33 \pm 0.13 \mu\text{M}$) shows a slightly better activity compared with its racemate ($\text{IC}_{50} = 4.87 \pm 0.02 \mu\text{M}$; ≈ 1.5 -fold); (c) (*RS*)-**14**, is three times more active than (*RS*)-**3**. Outstanding is the fact that (*S*)-**14** is the more active derivative ($\text{IC}_{50} = 1.85 \pm 0.05 \mu\text{M}$) among the eighteen compounds screened for their antiproliferative activity, being (*R*)-**14** ($\text{IC}_{50} = 3.33 \pm 0.04 \mu\text{M}$) equipotent to (*S*)-**1** and (*S*)-**13**.

All compounds were subjected to cell cycle and apoptosis studies on the MCF-7 human breast cancer cell line. The cell cycle does not show significant differences among all the compounds (data not shown). However, since the eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) kinase is critical for mRNA translation, cell proliferation, and apoptosis,¹¹ we analysed the protein activation of this factor by western blot. Our results showed that eIF2 α is significantly phosphorylated in human breast cancer cells after treatment with the majority of compounds at 16 h and 36 h, respectively. Interestingly, (*S*)-**14** induces a high eIF2 α phosphorylation in comparison with its racemate and its enantiomer, where no activation is shown (Figure 2). These results support the highest antiproliferative activity displayed by (*S*)-**14** and suggest that no modifications in cell cycle are due to the suppression of protein synthesis provoked by eIF2 α .¹² Furthermore, a prolonged induction of eIF2 α finally triggers the cell cycle arrest and/or the apoptosis phenomena.^{13,14} Thus the more interesting apoptosis percentages are given by (*RS*)-**13** [99.45 ± 0.07 at $14.6 \mu\text{M}$], (*RS*)-**14** [97.7 ± 0.56 at $8.25 \mu\text{M}$], (*R*)-**14** [99.1 ± 0.65 at $9.99 \mu\text{M}$, and 76.95 ± 2.80 at $3.33 \mu\text{M}$] and (*S*)-**14** [89.4 ± 1.50 at $5.55 \mu\text{M}$]. Paclitaxel is by far the most important anticancer agent for the treatment of breast cancer.^{15,16} The majority of the compounds are more potent as apoptosis inducers against the MCF-7 human breast cancer cells (especially noticeable is the value of (*R*)-**14** at $3.33 \mu\text{M}$) than paclitaxel, which induced programmed cell death of up to 43% of the cell population.¹⁷

4 Discussion

The outcome of producing apoptotic defects in cancer cells is the primary obstacle that limits the therapeutic efficacy of anticancer agents, and hence the development of novel agents targeting novel canonical and non-canonical cell death pathways has become an imperative mission for clinical research.¹⁸ Our compounds are able to induce strong levels of cell death measured by cytotoxicity analysis and by phosphatidylserine externalization (Annexin V binding) (Figure 2a) even in the MCF-7 breast cancer cells that have shown deficiency in the caspase-activation mechanisms.¹⁹ Whereas compound (*S*)-**12** is able to activate the canonical intrinsic caspase8/caspase3 apoptotic pathway, compound (*RS*)-**14** induces caspase 2 activation. However, a strong apoptosis induction is also detected in the rest of the compounds analysed. Previously, it has been described the caspase-independent apoptosis in cells exposed to a diverse group of drugs/toxicants with different cellular effects.¹⁸ While caspase 2 activation could induce cell death through cytochrome *c*/mitochondria damage,²⁰ non-caspase-mediated increases in phosphatidylserine externalization can occur in response to increases in the intracellular Ca^{2+} , which alters scramblase and translocase.^{21,22} Additionally, noncaspase proteases may activate and cleave the cytoskeleton proteins attached to phospholipids, including focal adhesion kinase and the actin-capping protein α -adducin.²³ These and other antitumour effects such as autophagy or senescence events could be involved in the caspase-dependent and caspase-independent cell death induced by our compounds. This fact opens an important line of research that is yet to be explored.

5 Conclusions

Herein are reported the synthesis and anticancer activity against the human breast cancer cell line MCF-7 of a series of substituted enantiopure 9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-3-ylmethyl)-9*H*-purine derivatives and 9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-2-ylmethyl)-9*H*-purine

derivatives. Compounds (S)-**14**, (R)-**14**, (S)-**1** and (S)-**13** may serve as prototypes for the development of even more potent structures endowed with a new and so far unknown mechanism of action. Different apoptosis percentages provided by enantiomers are scarcely reported in bibliography, and the exception that proves the rule is provided by D-(-)-lentiginosine; this is the nonnatural enantiomer of the iminosugar indolizidine alkaloid that acts as apoptosis inducer on tumour cells of different origin, in contrast to its natural enantiomer.²⁴ At present we are studying several targets in order to solve the mechanism of action at the molecular level of such benzannelated six-membered derivatives.

6 References

- 1 A. Jemal, R. Siegel, J. Xu, and E. Ward, *CA Cancer J. Clin.*, 2010, 60, 277.
- 2 D. J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga and L. Norton, *New Engl. J. Med.*, 2001, 344, 783.
- 3 K. Miller, M. Wang, J. Gralow, M. Dickler, M. Cobleigh, E. A. Pérez, T. Shenkier, D. Cella and N. E. Davidson, *New Engl. J. Med.*, 2007, 357, 2666.
- 4 M. Díaz-Gavilán, A. Conejo-García, O. Cruz-López, M. C. Núñez, D. Choquesillo-Lazarte, J. M. González-Pérez, F. Rodríguez-Serrano, J. A. Marchal, A. Aránega, M. A. Gallo, A. Espinosa and J. M. Campos, *ChemMedChem*, 2008, 3, 127.
- 5 A. Conejo-García, M. E. García-Rubiño, J. A. Marchal, M. C. Núñez, A. Ramírez, S. Cimino, M. A. García, A. Aránega, M. A. Gallo and J. M. Campos, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, 46, 3795.
- 6 M. C. Núñez, M. E. García-Rubiño, A. Conejo-García, O. Cruz-López, M. Kimatrai, M. A. Gallo, A. Espinosa and J. M. Campos, *Curr. Med. Chem.*, 2009, 16, 2064.
- 7 J. M. Klunder, T. Onami and K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 1295.
- 8 (a) M. Shiratsuchi, K. Kawamura, T. Akashi, H. Ishihama, M. Nakamura, F. Takenaka, *Chem. Pharm. Bull.*, 1987, 35, 3691; (b) K. Kawamura, T. Ohta, G. Otani, *Chem. Pharm. Bull.*, 1990, 38, 2092.
- 9 L. C. López-Cara, A. Conejo-García, J. A. Marchal, G. Macchione, O. Cruz-López, H. Boulaiz, M. A. García, F. Rodríguez-Serrano, A. Ramírez, C. Cativiela, A. I. Jiménez, J. M. García-Ruiz, D. Choquesillo-Lazarte, A. Aránega and J. M. Campos, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, 46, 249.
- 10 In *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, ed. L. A. Paquette, Wiley, New York, 1995, vol. 4, 2326.
- 11 D. Baltzis, O. Pluquet, A. I. Papadakis, S. Kazemi, L.-K. Qu and A. E. Koromilas, *J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 31675.
- 12 M. Holcik and N. Sonenberg, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005, 6, 318.
- 13 J. Gil, J. Alcamí and M. Esteban, *Mol. Cell Biol.*, 1999, 19, 4653.
- 14 Y. Dagon, S. Dovrat, S. Vilchik, D. Hacohen, G. Shlomo, B. Sredni, S. Salzberg and U. Nir, *Oncogene*, 2001, 20, 8045.
- 15 S. B. Horwitz, D. Cohen, S. Rao, I. Ringel, H. J. Shen and C. P. Yang, *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 1993, 15, 55.
- 16 S. Sangrajang and A. Fellous, *Chemotherapy*, 2000, 46, 327.
- 17 D. E. Saunders, W. D. Lawrence, C. Christensen, N. L. Wappler, H. Ruan and G. Deppe, *Int. J. Cancer*, 1997, 70, 214.
- 18 B. S. Cummings, G. R. Kinsey, L. J. Bolchoz and R. G. Schnellmann, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2004, 310, 126.

- 19 S. Kagawa, J. Gu, T. Honda, T. J. McDonnell, S. G. Swisher, J. A. Roth, B. Fang, *Clin. Cancer Res.*, 2001, 7, 1474.
- 20 J. D. Robertson, M. Enoksson, M. Suomela, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 29803.
- 21 D. M. Vanags, M. I. Porn-Ares, S. Coppola, D. H. Burgess and S. Orrenius, *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 31075.
- 22 V. E. Kagan, J. P. Fabisiak, A. A. Shvedova, Y. Y. Tyurina, V. A. Tyurin, N. F. Schor and K. Kawai, *FEBS Lett.*, 2000, 477, 1.
- 23 B. van de Water, J. F. Nagelkerke and J. L. Stevens, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 13328.
- 24 B. Macchi, A. Minutolo, S. Grelli, F. Cardona, F. M. Cordero, A. Mastino and A. Brandi, *Glycobiology*, 2010, 20, 500.

CO-69 Estudio Tecnológico de Comprimidos de Clorhidrato de Metadona

María Dolores Muñoz de los Ríos, M^a Encarnación Morales y M^a Adolfinia Ruiz., Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, m.dolores.mr@hotmail.com

Resumen

Ante la necesidad de distintas dosificaciones para el tratamiento de drogodependencias, nuestro objetivo ha sido la preparación de comprimidos de metadona con distinta dosis de fármaco para su uso en la Comunidad Autónoma de Andalucía.

En concreto, se ha procedido a la puesta a punto de las formulaciones, el método de compresión y el análisis de las propiedades tecnológicas de estas formas farmacéuticas de acuerdo con los criterios de calidad exigidos por la Real Farmacopea Española y la USP. Una vez seleccionada la formulación más apropiada, los comprimidos se han elaborado por compresión directa utilizando una máquina de comprimir excéntrica y el mismo tipo de punzones en todos los casos.

Posteriormente han sido sometidos a una serie de ensayos tecnológicos con la intención de comprobar la calidad de los mismos:

Dimensiones (altura y diámetro)

Uniformidad de masa

Friabilidad

Dureza

Disgregación

Disolución

Valoración de uniformidad de contenido

Los resultados obtenidos nos indican que las formulaciones elaboradas cumplen con las normas descritas en las Farmacopeas para este tipo de formas farmacéuticas.

Palabras clave

Metadona, Comprimidos, ensayos tecnológicos, tratamiento de mantenimiento con metadona.

1 Introducción.

La metadona es un derivado de 3,3 difenilpropilamina ligeramente más potente que la morfina, con la que comparte todas sus propiedades farmacológicas, ya que, además de activar receptores opioides, antagonizan el receptor glutamato NMDA (Quillinan N. y Cols. 2011). No hay un buen paralelismo entre su actividad analgésica, depresión respiratoria y concentraciones plasmáticas, por lo que dosis sucesivas administradas con el ritmo impuesto por la reaparición del dolor llegan a producir acumulación e intensa depresión respiratoria (Henrique A. y Cols. 2010). Posiblemente esto se deba a una distribución y fijación heterogéneas en los núcleos cerebrales. En tratamiento crónico, la metadona se fija ampliamente a los tejidos donde se acumula como reservorio y desde donde se redistribuye al plasma y los tejidos; de ahí que, en tratamientos prolongados, la semivida se prolongue y la frecuencia de administración sea menor (Flórez J. y Cols., 2008).

La metadona tiene una menor intensidad del síndrome de abstinencia que la morfina (Colombini N. y Cols. 2008) esto hace posible que los adictos a heroína pasen gradualmente a ser tratados con dosis orales regulares de metadona, si bien se ha de tener en cuenta que ello constituye un método de mejora, no de curación (Rang, H.P., y Cols., 2012).

Para el tratamiento de mantenimiento de reincidentes (Havassy BE. y Cols. 1984) en el uso de opioides se puede producir deliberadamente una tolerancia de 5 a 100 mg/día de metadona oral; en este estado el adicto experimenta tolerancia cruzada con la heroína (Bohdan N. y Cols. 2012) que impide gran parte de los efectos de reforzamiento de la adicción de la misma. Un motivo de los programas de mantenimiento (Bovasso G y Cols. 2003) es que el bloqueo del reforzamiento obtenido por abuso de opioides ilícitos inhibe el impulso por obtenerlos, lo que así disminuye la actividad criminal (McKenzie M. y Cols. 2009) y hace al adicto más susceptible de tratamiento psiquiátrico de rehabilitación. Las bases

farmacológicas de uso de metadona en programas de mantenimiento son sólidas y las bases fisiológicas racionales (Caplehorn J.R. y Cols. 1995) pero algunos programas de metadona fracasan porque el tratamiento no farmacológico es inadecuado (Perneger TV. y Cols. 1998).

En estos últimos años no solo ha aumentado el número de pacientes que reciben prescripciones de metadona por dolor persistente, sino también el número de sobredosis accidentales y complicaciones por depresión respiratoria (Katzung B.G. y Cols., 2012).

Ante la necesidad de distintas dosificaciones para el tratamiento de desintoxicaciones nuestro objetivo ha sido la preparación de distintas dosis que abarcan desde 20 mg hasta los 100 mg en forma farmacéutica comprimidos de metadona para su uso en la Comunidad Autónoma de Andalucía y comprobar su eficacia.

Los comprimidos son obtenidos por compresión directa. Por compresión directa se entiende la compresión de fármacos pulveriformes o de mezclas de éstos con coadyuvantes, sin tratamiento previo.

2 Materiales y métodos.

2.1 Materiales

Clorhidrato de metadona suministrado por ESTEVE S.A., celulosa microcristalina suministrada por bencel-brentag, almidón de trigo suministrado por Roquette Laisa S.A., lactosa suministrada por Alpavit, talco suministrado por Luzenac y estearato magnésico suministrado por Farmusal.

2.2 Método de elaboración de los comprimidos

En la elaboración de los mismos se ha utilizado la compresión directa.

Para la preparación de la mezcla se ha utilizado la mezcladora en V de E. Bachiller modelo MV-50 y para la obtención de los comprimidos se ha empleado la máquina de comprimir excéntrica J. Bonals, modelo BE 30.

2.3 Ensayos tecnológicos

Todos los ensayos a los que han sido sometidos los comprimidos objeto de estudio, están descritos en la Real Farmacopea Española (RFE) y en la Farmacopea Europea 6.0.

Dimensiones (altura y diámetro)

Las dimensiones de los comprimidos se han determinado con la ayuda de calibrador digital o pie de rey PWERFIX, modelo Z22855. Es un instrumento para medir dimensiones de objetos relativamente pequeños, desde centímetros hasta fracciones de milímetros (1/10 de milímetro, 1/20 de milímetro, 1/50 de milímetro). Consta de una regla con una escuadra en un extremo sobre la cual se desliza otra destinada a indicar la medida en una escala.

Uniformidad de masa

Se ha utilizado una balanza de precisión tipo AnD INSTRUMENT LTD, GR 202.

Friabilidad

Se ha empleado un friabilómetro de Roche tipo ERWEKA GmbH (Alemania). Este dispositivo está provisto de un tambor con un diámetro interno comprendido entre 283 mm y 291 mm y con una profundidad entre 36 mm y 40 mm, hecho de un polímero sintético transparente con las superficies internas pulidas y para que no produzca electricidad estática. Una de las caras del tambor puede ser retirada. La muestra cae en cada giro del tambor debido a la presencia de una proyección curvada con un radio interno (entre 75.5 mm y 85.5 mm) que va desde el tambor a la pared exterior. Este tambor está unido al eje horizontal de un dispositivo que gira a 25 ± 1 vueltas por minuto. De esta manera, en cada vuelta la muestra rueda o se desliza y cae sobre la pared del tambor o sobre ella misma.

Dureza

Ha sido determinada por medio de un Durómetro tipo ERWEKA TBH 20, que consta de una mordaza con dos mandíbulas enfrentadas que se desplazan una hacia la otra. La superficie de aplastamiento de las mandíbulas es plana y más grande que la zona de contacto con el comprimido. El aparato se calibra con ayuda de un sistema cuya presión es de 1 Newton.

Disgregación

Utilizamos el aparato ERWEKA GmbH (heusenstamm/Alemania). El aparato se compone de un conjunto de una cesta porta-tubos, un vaso de precipitado de forma baja de 1 litro, de 149 ± 11 de altura y con un diámetro interno de 106 ± 9 mm para el líquido de inmersión, un sistema termostático para calentar el líquido entre $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $39\text{ }^{\circ}\text{C}$, y un dispositivo destinado a imprimir a la cesta, dentro del líquido de inmersión, un movimiento de ascenso y descenso a una frecuencia constante entre 29 y 32 ciclos por minuto y con una amplitud de 55 ± 2 mm. El volumen de líquido introducido en el vaso se ajusta para que en el punto más alto de ascenso, la rejilla metálica permanezca al menos 15mm por debajo de la superficie del líquido, y descienda a no menos de 25 mm del fondo del vaso en el punto más bajo del descenso. En ningún momento la parte superior de la cesta debe estar sumergida. El tiempo requerido para el ascenso es igual al tiempo requerido para el descenso, y el cambio de sentido se efectúa con una transición suave, y no con una inversión brusca del movimiento. El conjunto de cesta y tubos sigue un movimiento vertical a lo largo de su eje. No hay ningún movimiento o desplazamiento horizontal apreciable del eje con respecto a la vertical (RFE, 2010).

Disolución

Empleamos el aparato SOTX AT7 Smart. Consta de: canasta, paleta, paleta sobre disco y método de cilindro rotativo. En el panel frontal se presenta un display que muestra los parámetros del test como temperatura, velocidad, alimentación de comprimidos y tiempo de muestreo los cuáles pueden ser programados.

2.4 Método analítico

El método analítico utilizado es la espectrofotometría UV-VIS. El dispositivo utilizado es el espectrofotómetro, modelo VWR-UV-31COPC.

Siguiendo las directrices señaladas en USP 2006, se determina la cantidad y uniformidad de principio activo que hay en cada comprimido.

3 Resultados y discusión

Se han elaborado comprimidos de clorhidrato de metadona para las siguientes dosis: 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 100 mg, de manera que presenten un peso final de

200mg/comprimido. Todas las dosis contienen la misma formulación pero en distintas proporciones, excepto la dosis más alta (100 mg) que no contiene almidón.

Tabla 1. Formulación de los comprimidos

Dosis mg/comp	Celulosa microcristalina mg/comp	Almidón mg/comp	Clorhidrato de metadona mg/comp	Lactosa mg/comp	Talco mg/comp	Estearato magnésico mg/comp
20	95	30	20	45	9	1
30	95	30	30	35	9	1
40	95	30	40	25	9	1
50	95	25	50	20	9	1
60	90	20	60	20	9	1
70	90	10	70	20	9	1
80	85	5	80	20	9	1
100	77,5	0	100	12.5	9	1

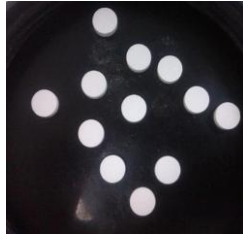


Figura 1. Fotografía comprimidos de metadona

Todos los comprimidos tienen una altura de 3.30 ± 0.05 mm y un diámetro de 8.16 ± 0.08 mm. (Fig. 1)

Con la intención de comprobar si los comprimidos elaborados cumplen los requisitos marcados por la R.F.E. acerca de la uniformidad de masa, se ha determinado el peso de 20 comprimidos por dosis escogidos al azar a los cuales se les ha calculado la media y el intervalo máximo y mínimo donde deben estar todos los pesos. Este intervalo se ha calculado sumando y restando a la media su desviación típica que en este caso, para comprimidos no recubiertos de un peso total de 200mg, será 7,5 como se describe en RFE.

Tabla 2. Peso medio de 20 comprimidos/dosis y el intervalo de valores entre los que deben de estar estos.

DOSIS mg/comp	PESO MEDIO mg	VALOR MÁX mg	VALOR MIN mg
20	198.42	213.20	183.62
30	199.85	214.08	184.28
40	198.64	213.60	183.60
50	198.66	213.46	183.86
60	195.55	210.15	180.85
70	194.91	209.51	180.31
80	199.38	214.38	184.38
100	203.58	218.78	188.35

Los resultados obtenidos muestran que todos los comprimidos elaborados cumplen este ensayo.

La figura 2 muestra los resultados del test de friabilidad, siendo la media de 3 determinaciones, en cada una de ellas se ha calculado % de pérdida de peso de 10 comprimidos elegidos al azar. El ensayo se ha realizado para todas las dosis objeto de estudio.

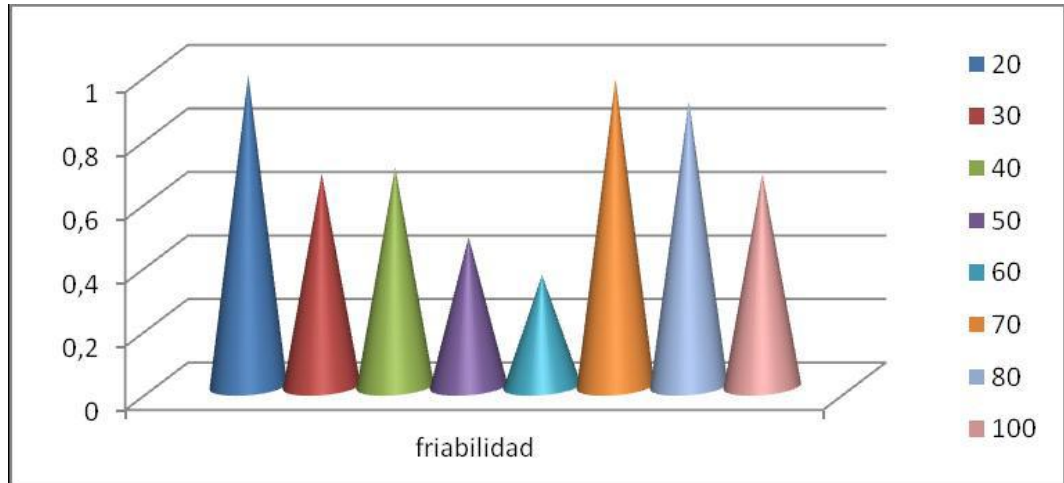


Figura 2. Friabilidad en % pérdida de peso para todas las dosis de comprimidos

En todos los casos el valor obtenido ha sido inferior al 1%, se puede decir que estos comprimidos cumplen con el ensayo de friabilidad descrito en la RFE.

La dureza se ha determinado como la media de 10 comprimidos elegidos al azar.

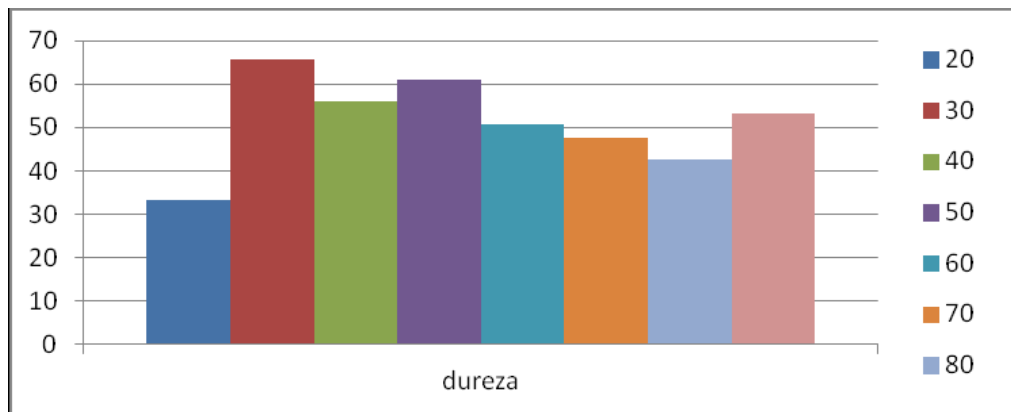


Figura 3. Dureza en Newton para todas las dosis de comprimidos

Como se observa (figura 3), los valores de dureza han oscilado entre 33.2 Newton para los comprimidos con una concentración de metadona de 20 mg/comprimido y 65.6 Newton para la dosis de 30 mg/comprimido. Los comprimidos de mayor dureza (30, 40, 50 y 60 mg/comprimidos) son los menos friables, por lo que se puede decir que la dureza es inversamente proporcional a la friabilidad.

El ensayo de disgregación se ha realizado de acuerdo con lo descrito en RFE. Los resultados son la media a tres determinaciones por dosis y quedan reflejados en la tabla 2. Los comprimidos cumplen con el ensayo de disgregación descrito en RFE, ya que todos los tiempos son inferiores a 15 minutos.

Tabla 2. Tiempo medio de disgregación de los comprimidos analizados.

Dosis (mg)	20	30	40	50	60	70	80	100
Tiempo de disgregación (segundos)	10.0	16.6	5.3	21.3	20.0	10.0	18.0	26.3

El ensayo de disolución se llevó a cabo siguiendo las pautas de USP 29 (2006). Para comprimidos convencionales de clorhidrato de metadona las condiciones fueron:

- Tiempo: 45 minutos.
- Temperatura: 37 °C.
- Velocidad de agitación de las aspas: 50 rpm.
- Medio de disolución: agua destilada.
- Volumen del medio: 500 ml (necesario para mantener las condiciones sink).
- Número de comprimidos: dos comprimidos/dosis.

Pasados los primeros 45 minutos, se observó que algunos de los comprimidos no estaban totalmente disgregados, por lo que se prolongó el ensayo hasta los 60 minutos. Se midieron las absorbancias a todas las muestras y se verificó que en todas ellas los valores obtenidos nos indicaban la total disolución de metadona, así que el resto correspondía a los excipientes insolubles de la formulación.

Finalmente, con el ensayo de uniformidad de contenido, se pretende demostrar que al menos el 90% de los comprimidos del lote analizado tienen un contenido en clorhidrato de metadona de $\pm 15\%$ del valor nominal, con un nivel de confianza del 95%. El contenido medio, en consecuencia, debe estar comprendido entre el 93 y el 107%.

Estos estudios se pueden tener en cuenta para realizar en función de:

- **Caso 1.** Comprimidos de metadona con dosis menores a 25 mg o menores al 25% de clorhidrato de metadona en peso.
 - Seleccionar aleatoriamente y pesar individualmente no menos de 30 comprimidos del lote
 - Analizar 10 comprimidos individualmente (USP 29), expresando los resultados en % del contenido nominal, y calcular el valor de aceptación (VA)
 - Si el VA está fuera de rango analizar otros 20 comprimidos y calcular un nuevo VA teniendo en cuenta los resultados de los 30.
- **Caso 2.** Comprimidos de metadona con dosis mayores o iguales a 25 o mayores o iguales al 25% de clorhidrato de metadona en peso.
 - Seleccionar y pesar individualmente no menos de 20 comprimidos, triturarlos y realizar la valoración del contenido de clorhidrato de metadona según monografía USP 29 (2006).
 - Seleccionar no menos de 30 comprimidos del lote
 - Pesar individualmente 10 comprimidos
 - Calcular el contenido en clorhidrato de metadona, expresado en % del contenido nominal, de cada comprimido a partir de su peso y el resultado del análisis anterior.
 - Calcular el VA
 - Si el VA está fuera de intervalo pesar otros 20 comprimidos y calcular un nuevo VA teniendo en cuenta los resultados de los 30.

La tabla 3 muestra los resultados obtenidos para todos los comprimidos elaborados, donde W es el peso medio de 20 comprimidos elegidos al azar, A se refiere a contenido de clorhidrato de metadona expresado en % del nominal, Xi es la media del contenido expresado en % del nominal de los comprimidos de la muestra, s es desviación estándar y VA nos indica el valor de aceptación que deberá ser menor a 15.

Tabla 3. Resultados del ensayo de valoración y uniformidad de contenido.

Dosis	W	Contenido en mg	A	\bar{X}	s	VA
30	197.48	31.68	105.6	109.77	3.37	11.96
40	198.64	43.2	108	109.13	2.16	12.82
50	198.66	54.10	108.21	109.19	2.47	14.78
60	195.55	62.76	104.6	104.79	1.94	14.46
70	194.91	76.82	109.75	112.03	1.87	15
80	199.38	88	110	109.33	2.25	10.69
100	203.58	97	97	97.69	1.26	3.83

Los comprimidos de 20 mg se analizan por un caso distinto a los anteriores, es decir, a través del caso 1, por lo que se muestran en otra tabla (tabla 4). Primero comprobamos que el peso medio de 30 comprimidos es de 195,19, de estos son analizados de forma individual 10.

Tabla 4. Resultados de 10 comprimidos analizados individualmente de 20 mg

Nº de comp.	Contenido en mg	A
1	22.5	112.5
2	22.1	110.5
3	22.2	111
4	21.6	108
5	22.6	113
6	22.6	113
7	22.7	113.5
8	21.5	107.5
9	22.6	113
10	22.3	111.5

La media de A es igual a 111,35, su desviación estándar es 2,13 y su valor de aceptación de 14.97. Por tanto, todos los comprimidos cumplen con el ensayo ya que sus valores de aceptación son menores a 15.

4 Conclusiones

Los métodos de elaboración así como las formulaciones han sido idóneos para la obtención de comprimidos de clorhidrato de metadona desde el punto de vista de su friabilidad, dureza, disgregación, disolución y contenido, tal como corroboran los datos obtenidos en cada uno de los ensayos. Por tanto, podemos concluir que todas las formulaciones elaboradas en el centro de elaboración del Hospital Virgen de las Nieves, cumplen con las normas descritas en la Real Farmacopea Española y USP para los ensayos de comprimidos y pueden ser utilizados para el tratamiento de pacientes.

5 Bibliografía

1. Anglin MD, McGlothlin WH, Speckart G. The effect of parole on methadone patient behavior. Am J Drug Alcohol Abuse 1981: 153-170.

2. Bohdan N, Daphne P, Aslam H. Cost-effectiveness of diacetylmorphine versus methadone for chronic opioid dependence refractory to treatment. *Canadian Medical Association Journal*. 2012: 317–328.
3. Bovasso G, C, J. The long-term outcomes of drug use by methadone maintenance patients. *J. Behav Health Srev Res*.2003:290-303.
4. Caplehorn JR, Ross MW. Methadone maintenance and the likelihood of risky needle-sharing. *Int J Addict*. 1995:685-698.
5. Colombini N, Elias R, Busuttill M, Dubuc M, Einaudi M, Bues-Charbit M. Hospital morphine preparation for abstinence syndrome in newborns exposed to buprenorphine or methadone. *Pharm World Sci*. 2008
6. Dobler-Mikola A, Hattenschwiller J, Meili D. Patterns of heroin, cocaine and alcohol abuse during long-term methadone maintenance treatment. *J Subst Abuse Treat*. 2005: 65-259.
7. Dole VP, Robinson JW, Orraca J, Towns E, Searcy P, Caine E. Methadone treatment of randomly selected heroin addicts. *N Engl J Med*. 1969: 1372-1375.
8. Fischer G, Ortner R, Rohrmeister K, Jagsch R, Baewert A, Langer M, et al. Methadone versus buprenorphine in pregnant addicts: a double-blind, double-dummy comparison study. *Addiction*. 2006.
9. Florey K. Methadone clorhidrate. *Analytical Profiles of Drug Sustances: Board*; 1974: 266-439.
10. Flórez J., Armijo J.A., Mediaville A. *farmacología humana*. 5th ed.: elseiver; 2008: 535-536.
11. Garrido MJ, Trocóniz I.F. Methadone: a review of its pharmacokinetic/pharmacodynamic properties. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2000: 61-66.
12. Gordon A, Lopatko O, White J. (R)- and (S)-methadone and buprenorphine concentration ratios in maternal and umbilical cord plasma following chronic maintenance dosing in pregnancy. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2010: 895-902.
13. Grönbladh L, Ohlund LS, Gunne LM. Mortality in heroin addiction: impact of methadone treatment. *Acta Psychiatr Scand*. 1990. 53
14. Henrique A, Parsons MD, Maxine de la Cruz, M.D., Eduardo Bruera MD. Methadone initiation and rotation in the outpatient setting for patients with cancer pain. *Cancer*. 2010: 520-528.
15. Hiltunen AJ, Beck O, Hjemdahl P, Liljeberg P, Almstrom U, Brodin K, et al. Rated well-being in relation to plasma concentrations of l- and d-methadone in satisfied and dissatisfied patients on methadone maintenance treatment. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999.
16. Johnson RE, Chutuape MA, Strain EC, Walsh SL, Stitzer ML, Bigelow GE. A comparison of levomethadyl acetate, buprenorphine, and methadone for opioid dependence. *N Engl J Med*. 2000: 343.
17. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Farmacología básica y clínica*. 12th ed.: Elseiver; 2012: 557.
18. Kharasch E, Campbell S, Sheffels Bedynek P. Mechanism of efavirenz influence on methadone pharmacokinetics and pharmacodynamics II: Hepatic and intestinal

CYP2B6, CYP3A and transporter activities. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2012: 673-684.

19. Lin W, Chou H, Lin C. Methadone, Buprenorphine, and Street Drug Interactions with Antiretroviral Medications. *Current HIV/AIDS Reports*. 2010: 152-160.
20. McKenzie M, Nunn A, Rich JD. Overcoming obstacles to implementing methadone maintenance therapy for prisoners: Implications for policy and practice. *Journal of opioid management*. 2009: 219-227.
21. Méndez MJ, Álvarez P, Sánchez P, Prats P, Cabanes MA. Validación de modelo analítico de una solución acuosa de clorhidrato de metadona y determinación de la estabilidad de la misma. *Revista Farmacia Hospitalaria*. 2012.
22. Meresaar U, Nilsson MI, Holmstrand J, Anggard E. Single dose pharmacokinetics and bioavailability of methadone in man studied with a stable isotope method. *Eur J Clin Pharmacol*. 1981.
23. Misra AL, Mule SJ. Physiological disposition and metabolism of levo-methadone-1-³H in nontolerant and tolerant rats. *Nature*. 1973: 99-287.

CO-80 Fluctuations in the Ising Model

Nicolás Tizón Escamilla; Dpto. Electromagnetismo y Física de la Materia, Facultad de Ciencias, Campus de Fuentenueva, Granada, 18071, España; Dpto. Electromagnetismo y Física de la Materia, University of Granada (Spain); tizon@onsager.ugr.es

Pedro L. Garrido; Dpto. Electromagnetismo y Física de la Materia, Facultad de Ciencias, Campus de Fuentenueva, Granada, 18071, España; Instituto Carlos I de Física Teórica y Computacional, & Dpto.

Electromagnetismo y Física de la Materia, University of Granada (Spain);; garrido@onsager.ugr.es

Pablo I. Hurtado; Dpto. Electromagnetismo y Física de la Materia, Facultad de Ciencias, Campus de Fuentenueva, Granada, 18071, España; Instituto Carlos I de Física Teórica y Computacional, & Dpto. Electromagnetismo y Física de la Materia, University of Granada (Spain);; phurtado@onsager.ugr.es

Abstract

Statistical physics is a branch of physics which allows us to study systems with many constituents and to establish a relationship between the laws governing the microscopic physics (e.g. Quantum Mechanics) and the emergent macroscopic behavior (e.g. Thermodynamics). This connection is nowadays fully understood if the system of interest is in thermodynamic equilibrium. In these systems, we can define a mathematical function, called equilibrium free energy, which links both levels. Nevertheless, most of the systems found in nature are out of equilibrium: they are subject to different gradients and external fields, and develop in response currents which generate transport of different magnitudes.

Despite their importance, no general theory exists yet capable of predicting nonequilibrium macroscopic behavior in terms of microscopic physics. This is due to the difficulty in combining statistics and microscopic dynamics, which plays a major role out of equilibrium. However, during the last years, new advances made in the study of macroscopic fluctuations have improved our understanding of nonequilibrium behavior. Studying fluctuations, which means analyzing rare events occurring in the system, allows us to define a new mathematical function, called large deviation function (LDF), which plays in nonequilibrium systems a role akin to the equilibrium free energy.

As a first approach, in our work we show how we can study fluctuations in a paradigmatic model of equilibrium physics, with many applications in different fields of science: the Ising Model. We build its LDF and we discover completely new structures which take place at a fluctuating level.

Keywords

Nonequilibrium physics, Macroscopic Fluctuation Theory, large deviations, Ising Model

1 Introduction

The fundamental laws of Physics are strikingly simple. Hamiltonian Mechanics, Maxwell equations from Electromagnetism or Schrödinger equation from Quantum Mechanics can be expressed in a few lines, and the ideas behind these laws are also quite simple. Nevertheless, the world we try to describe is not simple. Nature is complex at all levels. Think for instance in a neuron. It is made of atoms and molecules whose behavior can be described within the framework of Quantum Mechanics. However, we do not understand how the different processes occurring in the brain can arise from the collective dynamics of a huge number of neurons. So, the question is: how such a complex world emerges from the simple laws of Physics?

Statistical Physics is a branch of Physics which try to give an answer to this question. Its aim is to describe the complex macroscopic characteristics of physical systems from the laws governing the behavior of its microscopic constituents. For a system in thermodynamic equilibrium, i.e. an isolated system showing no hysteresis and whose properties do not change with time, Statistical Physics allows us to define the *free energy*, a mathematical function which establishes the relationship between these two levels of description. Thus, we can understand, for instance, how macroscopic properties, such as temperature or specific heat, can be determined from microscopic laws in an equilibrium system.

Nevertheless, most of the systems in Nature are out of equilibrium. These systems are subject to different fluxes and gradients or external fields developing currents in response. Think about a certain amount of water boiling in a saucepan. Water in the bottom of the saucepan has a higher temperature than water in the top, so there is a thermal gradient and a heat flux takes place. Furthermore, owing to the difference in temperature, water in the surface is denser than water in the bottom, so a mass flux occurs. This is a pure non-equilibrium process. In spite of their relevance, we are not able to link both microscopic and macroscopic level of description for systems out of equilibrium. This lack of a general theory is due to the importance of microscopic dynamic and the difficulty in mixing it with statistics. At this point, macroscopic fluctuations come into play.

In this paper we want to describe what we understand by fluctuations and their importance in non-equilibrium physics. In addition, we will show one of the most paradigmatic models in Statistical Physics, the Ising Model, and we will analyze the way we can study fluctuations in it, which will lead to the discovery of completely new structures at a fluctuating level.

2 Materials and Methods

In this section we will introduce the Macroscopic Fluctuation Theory, explaining how we can study fluctuations and which the relationship between fluctuations and non-equilibrium physics is. Furthermore, we will study the Ising Model, showing its main characteristics, and we will describe the behavior of this system in terms of new variables: fields.

2.1 Macroscopic Fluctuation Theory

Fluctuations arise universally in Nature as a reflection of a discrete and statistical microscopic world at the macroscopic level. In order to understand what macroscopic fluctuations are, consider the example of density fluctuations. Let us consider an isolated box of volume V with N particles and a subvolume v of the box with n particles. Let $\langle \rho \rangle = N/V$ be the average number of particles per volume in the box. We can ask ourselves: is it possible to find a density particles $\rho = n/v$ much larger (or much smaller) than $\langle \rho \rangle$ in the subvolume v ? Due to the probabilistic nature of the microscopic world, the answer to this question is yes, but the probability of this event is quite small. This phenomenon is what we called a fluctuation.

Nowadays, the macroscopic fluctuation theory plays an essential role in the study of systems out of equilibrium. Considering the system previously defined, we can now ask ourselves: which is the probability of measure a fluctuation? The answer is given by a mathematical principle: the *large deviation principle*, which establishes that the probability of finding n particles in a subvolume v scales as:

$$P_v(n) \sim \exp[-v\mathfrak{I}(n/v)] \quad (1)$$

This scaling means that the probability of finding a density ρ quite different from the average $\langle \rho \rangle$ decays exponentially fast with v . The function $\mathfrak{I}(n/v) \geq 0$ is called the *large deviation function* (LDF) and it is the central element of the theory. For equilibrium systems, the LDF is univocally related to free energy. Thus, the key idea of the study of non-equilibrium systems is to use LDFs as the analog of equilibrium free energy. In this way, once the choice of the relevant macroscopic variables characterizing system behavior, and whose fluctuations we want to study, is done, the calculation, measurement and understanding of the LDF and its associated optimal path will give us information about non-equilibrium properties.

2.2 Ising Model

The Ising Model was proposed Lenz in 1925 in order to explain, in a simple way, the behavior of ferromagnetic materials. Nowadays it is one of the most important models in Statistical Physics due to two main reasons: (i) it is the simplest model with exact resolution which exhibits phase transitions and (ii) it is used in a huge number of quite different kind of systems, such as neuronal and social networks, macromolecules or magnetic sensors.

The model can be described as a d -dimensional lattice Λ with Ω sites and a distance between each sites given by a . For each lattice site there is a discrete variable s_i whose values can be $+1$ or -1 . These variables are called *spins* and they can represent, for instance, the magnetic moment of a particle sitting at this precise lattice point or, in a gas, the presence ($s_i = +1$) or absence ($s_i = -1$) of a particle at such position. A *spin configuration*, $\vec{s} = s_i, \forall i \in \Omega$, is an assignment of a value for each spin variable in the lattice. The energy of a configuration is given by a function called Hamiltonian, which has the following expression:

$$H(\vec{s}) = \frac{-1}{2} \sum_{i,j \in \Omega} J s_i s_j + \sum_{i \in \Omega} h s_i \quad (2)$$

Where $\sum_{i,j \in \Omega}$ and $\sum_{i \in \Omega}$ represent the sum over all spins in the lattice. In this expression, the first sum indicates the interaction between two spins (being J the parameter which defines this interaction) and the second sum indicates the interaction of the spins with an external field h . It is important to remark that, for instance, if $J > 0$, considering the fact that the system try to minimize its energy, the spins try to be aligned and the system is called ferromagnetic.

If we put this network in contact with a heat bath at a temperature T , the bath-spin interaction makes it evolves in time in a stochastic way, i.e. the system evolution has some randomness studied by using probability theory. This evolution can be described using the Master Equation:

$$\frac{dP(\vec{s}, t; \vec{k})}{dt} = \sum_{\vec{s}'} \omega(\vec{s}' \rightarrow \vec{s}, \vec{k}) P(\vec{s}', t; \vec{k}) - \omega(\vec{s} \rightarrow \vec{s}', \vec{k}) P(\vec{s}, t; \vec{k}) \quad (3)$$

Where \vec{k} includes all relevant parameters in our system, $P(\vec{s}, t; \vec{k})$ is the probability of finding a spin configuration \vec{s} at an instant t with \vec{k} values of the parameters and $\omega(\vec{s}' \rightarrow \vec{s}; \vec{k})$ is the transition rate, i.e. the probability of occurring a transition from a configuration \vec{s}' to \vec{s} per unit of time.

In this model, we can define a physical quantity, called magnetization, as:

$$M = \frac{1}{\Omega} \sum_{i \in \Omega} s_i \quad (4)$$

This variable measure the average value of spins and it is the order parameter of the system, which means that it provides information about the grade of order/disorder of the system. In this way, the d -dimensional Ising Model ($d \geq 2$) exhibit two different phases: one phase in which the system is completely disordered ($M = 0$), which arises at high temperatures, and another in which the system has a certain order ($M \neq 0$), which takes place at low temperatures. This is one of the reasons of the importance of Ising Model: it is a paradigm of phase transitions. There are a huge number of systems in Nature that exhibit phase transitions (e.g. the transition between ice and liquid water), and the study of Ising Model allows us to improve our knowledge about them.

2.2.1 Field Theory and $\lambda\Phi^4$ Potential

When the number of sites Ω is large but finite, obtaining theoretical results become a hard task. In this kind of systems, we can work not in the microscopic level, but in a new level of description: the mesoscopic level. The key idea is to make a continuum limit, changing our spin variables to new continuum variables: fields. In this way, at a microscopic level, we can define the following quantity:

$$\Phi_\Omega(\vec{x}) \equiv \frac{1}{\Omega} \sum_{\vec{y} \in \Lambda_\vec{x}^\Omega} s(\vec{y}) \quad , \quad \vec{x} \in \Lambda \quad (5)$$

Where $\Lambda_\vec{x}^\Omega$ is a volume centered in \vec{x} with Ω sites. Taking the limit $|a| \rightarrow 0$ and $\Omega \rightarrow \infty$ simultaneously, remaining $a_0 = a\Omega$ constant, these quantities become analitic functions called fields, $\Phi(\vec{r}, t)$. These new variables give us information about the configuration of the system at any point \vec{r} and at an instant of time t .

Once the new variables are built, we need to define a new Hamiltonian which describes the energy of the system in terms of fields. One of the most used in the literature is:

$$H[\Phi(\vec{r}, t)] = \int_V d\vec{r} \left(\frac{1}{2} (\nabla\Phi(\vec{r}, t))^2 + V(\Phi(\vec{r}, t)) \right) \quad (6)$$

Where $V(\Phi(\vec{r}, t))$ is the $\lambda\Phi^4$ potential, given by:

$$V(\Phi(\vec{r}, t)) = \frac{1}{2}\mu^2\Phi^2(\vec{r}, t) + \frac{1}{4!}\lambda\Phi^4(\vec{r}, t) \quad (7)$$

This potential exhibits the same properties than the original discrete Ising Model, including the existence of two different phases: a disordered phase if $\mu^2 > 0$ and an ordered phase if $\mu^2 < 0$.

Finally, a new equation which governs the system evolution is needed. Since our model has a statistical nature, in order to describe its dynamics we use a stochastic equation: the Langevin Equation, defined by:

$$\frac{d\Phi(\vec{r}, t)}{dt} = \frac{-1}{2} \frac{\delta H[\Phi(\vec{r}, t)]}{\delta\Phi(\vec{r}, t)} + \frac{1}{\Omega^{1/2}} \zeta(t) \quad (8)$$

Where $\zeta(t)$ is a gaussian white noise, i.e. a random process with average equals to zero and no correlations in space and time. This equation describes the evolution in time of the system configuration, $\Phi(\vec{r}, t)$, as a sum of a deterministic part and a stochastic part. Nevertheless, there is another way of describing the stochastic dynamic of our model. The probability of finding the system in a particular configuration, $P(\Phi(\vec{r}, t))$, can be written as the sum of the probabilities of all possible paths, i.e. all possible histories (or sequence of configurations), which bring the system from the initial state to the final one. In this way, we can define the generating functional $Z[\tau, V]$ as:

$$Z[\tau, V] = \int D\Phi(\vec{r}, t) \exp \left[- \int_0^\tau dt \mathcal{L}(\Phi(\vec{r}, t), \dot{\Phi}(\vec{r}, t)) \right] \quad (9)$$

Where $D\Phi(\vec{r}, t)$ means the integration over all possible paths and $\mathcal{L}(\Phi(\vec{r}, t), \dot{\Phi}(\vec{r}, t))$ is the lagrangian of the model, given by:

$$\mathcal{L}(\Phi(\vec{r}, t), \dot{\Phi}(\vec{r}, t)) = \frac{\Omega}{2} \int_V d\vec{r} \left(\dot{\Phi}(\vec{r}, t) + \frac{1}{2} \frac{\delta H[\Phi(\vec{r}, t)]}{\delta\Phi(\vec{r}, t)} \right)^2 \quad (10)$$

This representation will be really useful in order to work out the LDF of our model.

3 Results

Once the Ising Model is known and we understand the importance of fluctuations, we are in a position to study macroscopic fluctuations of this system. Due to the difficulty of our task, as a first approach, we are going to study the equilibrium Ising Model.

Let us consider an equilibrium Ising Model described in terms of fields. As we have seen in Sect. 2.1, in order to study macroscopic fluctuations we need to identify the relevant macroscopic variable which characterizes the behavior of the system. In this case, we choose the order parameter of the Ising Model: the magnetization averaged in space and an interval of time $[0, \tau]$:

$$m(\tau, V) = \frac{1}{\tau V} \int_0^\tau \int_V dt d\vec{r} \Phi(\vec{r}, t) \quad (11)$$

In order to study fluctuations, we have to ask ourselves: which is the probability of finding a configuration in which the averaged magnetization, $m(\tau, V)$, has a value equal to m ? The answer to this question is given by equation (9) including the condition $m = m(\tau, V)$ (by using the Dirac delta function):

$$P[m, \tau, V] = \int D\Phi(\vec{r}, t) \exp \left[- \int_0^\tau dt \mathcal{L}(\Phi(\vec{r}, t), \dot{\Phi}(\vec{r}, t)) \right] \delta(m - m(\tau, V)) \quad (12)$$

Our aim is to manipulate this path integral in order to obtain an expression similar to (1), identifying the LDF of the Ising Model. In this way, we can change the Dirac delta function by its integral representation (introducing the Lagrange multiplier $\tilde{\lambda}$) and approximate the path integral using the method of Steepest Descent (or saddle-point method), resulting:

$$P[m, \tau, V] \propto \exp \left[-\Omega \left(\frac{1}{\Omega} \int_0^\tau dt \mathcal{L}(\Phi_{cl}(\vec{r}, t), \dot{\Phi}_{cl}(\vec{r}, t)) + \tilde{\lambda}_{cl}(m - m(\tau, V)) \right) \right] \quad (13)$$

Where $\Phi_{cl}(\vec{r}, t)$ is the optimal path, i.e. the sequence of configurations that the system selects to sustain a given fluctuation, and it minimizes the exponent of expression (13). After computing this variational problem, the minimization of the exponent leads to two different equations. The first one is the condition previously established:

$$m = \frac{1}{\tau V} \int_0^\tau \int_V dt d\vec{r} \Phi(\vec{r}, t) \quad (14)$$

The second one is the following Euler-Lagrange equation:

$$\left(\frac{-d}{dt} + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 V(\Phi(\vec{r}, t))}{\partial \Phi^2(\vec{r}, t)} - \frac{1}{2} \Delta \right) \left(\Phi(\vec{r}, t) + \frac{\partial^2 V(\Phi(\vec{r}, t))}{\partial \Phi^2(\vec{r}, t)} - \frac{1}{2} \Delta \Phi(\vec{r}, t) \right) = \tilde{\lambda} \quad (15)$$

Solutions of this partial differential equation are the optimal paths and, using the expression (13) we can obtain the LDF. However, solving analytically this PDE is quite difficult. Instead of trying to solve it, we have found two particular solutions, corresponding to two different structures which can be exhibited by the system at a fluctuating level. The first one is $\Phi(\vec{r}, t) = m$, i.e. the field is homogeneous in space, constant in time and equal to the value of the averaged magnetization. The second one is $\Phi(\vec{r}, t) = \Phi(t)$ (with $\Phi(t)$ a periodic function in t), i.e. the field has the same value at any point in space but it changes periodically with time, oscillating between two values $[\Phi_-, \Phi_+]$. In both cases, we can compute the LDFs, resulting:

$$\mathfrak{I}_{\Phi(\vec{r}, t)=m}(m) = \bar{m}^6 \lambda^2 m^2 (\text{sign}(\mu^2) + m^2)^2 \quad (16)$$

$$\mathfrak{I}_{\Phi(\vec{r}, t)=\Phi(t)}(m) = \frac{12\bar{m}}{T} \int_{\varphi_-}^{\varphi_+} d\varphi \frac{1}{\sqrt{f(\varphi)}} (f(\varphi) + \bar{m}^6 \lambda^2 \varphi^2 (\text{sign}(\mu^2) + \varphi^2)^2) \quad (17)$$

Where $\bar{m} = \sqrt{\frac{6|\mu^2|}{\lambda}}$ is the extreme point of the $\lambda\Phi^4$ potential; $\varphi = \Phi/\bar{m}$; T is the period of $\Phi(t)$, and $f(\varphi) = \lambda^2 \bar{m}^6 \varphi^2 (\text{sign}(\mu^2) + \varphi^2)^2 - 288\tilde{\lambda}\bar{m}\varphi$

4 Discussion

Both constant and periodic solutions are new structures of our equilibrium Ising Model which appear at a fluctuating level, when we forced the system to have a configuration with averaged magnetization equals to m . It is important to note that there is a region in which both solutions exist. There, the LDF of the periodic solution is lower than the LDF of the constant one, so the probability of finding our system in that structure is higher. Furthermore, studying the stability of the constant solution, we realize that there is an interval of m -values in which it is unstable. As a result, we are now focused on analyzing other kind of structures (e.g position-dependent solutions with some symmetries) and computing their stability regions and LDFs.

5 Conclusions

In this work we have seen how the study of macroscopic fluctuations improves our understanding of non-equilibrium systems and the way we can analyze them. We have shown the importance of LDF as a function which establishes a relationship between the microscopic and the macroscopic world in a similar way than equilibrium free energy. In order to understand this idea in detail, we have applied the theory of macroscopic fluctuations to the equilibrium Ising Model, computing the LDF of this system. Due to the difficulty of the partial differential equation obtained, we have decided to find particular solutions. We have discovered two completely new structures which only appears at a fluctuating level: the constant field $\Phi(\vec{r}, t) = m$ and the periodic in time field $\Phi(\vec{r}, t) = \Phi(t)$. In both cases we have determined its LDF, and we have realised that, in the region of coexistence, the periodic structure is more probable than the constant one.

These results are exciting in two different ways: (i) we are now ready to study fluctuations in more difficult systems, e.g. equilibrium models with vectorial order parameters, equilibrium quantum systems or non-equilibrium classical or quantum systems, and (ii) we can discover other new structures of the equilibrium Ising Model and study its LDF.

6 References

1. Amit, D.J., Field Theory, the Renormalization Group and Critical Phenomena. 2ed., World Scientific, 1984.
2. Derrida, B., Non-equilibrium steady states: fluctuations and large deviations of the density and of the current. Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment (2007) P07023.
3. Espigares, C.P., Fluctuaciones fuera del equilibrio en sistemas difusivos. PhD. Thesis. 2012.
4. Hurtado, P.I., Some Aspects on Dynamics of Nonequilibrium Systems. Ph.D. Thesis. 2002.
5. Hurtado, P.I.; Espigares, C.P.; del Pozo, J.J., and Garrido, P.L., Symmetries in fluctuations far from equilibrium. PNAS Early Edition 108 (2011), no. 19, 7704–7709
6. Hurtado, P.I.; Espigares, C.P.; del Pozo, J.J., and Garrido, P.L., Thermodynamics of currents in nonequilibrium diffusive systems: theory and simulations. ArXiv:1312.1246v1 [cond-mat.stat-mech], 2013.
7. Muñoz Martínez, M.A., Ecuaciones de Fokker-Planck y teoría de campos fuera del equilibrio. Ph.D. Thesis. 1994.

CO-89 External gelation technology: An approach for the encapsulation of cells

María José Martín Villena, Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja, Street s/n, 18071 Granada, Spain. PhD student. mjmv@ugr.es.

Patricia Gálvez- Martín, Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja, Street s/n, 18071 Granada, Spain. PhD student. galmafarma@gmail.com.

Julia Rodríguez Ruiz, Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja, Street s/n, 18071 Granada, Spain. PhD student. juliarodrgz@correo.ugr.es.

Cristina Lorente Guirado Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja, Street s/n, 18071 Granada, Spain. PhD student. crislg@correo.ugr.es.

Beatriz Clares Naveros, Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja, Street s/n, 18071 Granada, Spain. beatrizclares@ugr.es.

Abstract

Cell encapsulation technology is based on the immobilization of cells within a semipermeable membrane. This membrane protects the cells from mechanical stress and the host's immune system. At the same time, the layer allows the bidirectional diffusion of nutrients, oxygen and waste. Moreover, microcapsules have a larger surface/volume ratio compared to other immobilization scaffolds, which improves oxygen and nutrients' permeability.

Most of the technologies used for conventional encapsulation (spray drying, fluidized beds, coacervation or emulsification) may not be suitable for the encapsulation of cells. This is because, these processes might involve some incompatible operating conditions such as high pressure or temperature, or an organic solvent, which could in turn adversely affect the cells or cause contamination. In addition, the success of this strategy lies among other properties in the stability and biocompatibility of the microparticles. These parameters are directly linked with the polymer employed. In this regard, alginate is considered the most suitable polymer for microcapsule fabrication.

For all of this reason, external gelation is a good approach for cell encapsulation. This technology is a very simple process that provides immediate and non-toxic alginate cell entrapment. To control the size of the particles a coaxial flow can be used. In this case the size of the beads depends on the airflow, the needle diameter and solution flow rate. To obtain smaller beads ($\approx 150 \mu\text{m}$), an electrostatic field can be applied. In this sense, the aim of this study is focusing in the conditions and advantages of this technology.

Keywords

Stem cells, encapsulation and external gelation

1 Introduction

In recent years, two different strategies to deliver cells into tissue have been developed. The first procedure consists of the injection of free cells, the second one is based on cells seeded or embedded in scaffolds.

Unfortunately, in spite of the superior handling, the use of free cells holds the major drawback to elicit the host immune rejection. Therefore, they may rapidly lose their viability and functionality. To solve these limitations, various structures have been developed for cell immunoisolation. These structures are commonly called scaffold and can divide into: macrodevices and microdevices.

As have been mentioned before, a large variety of immobilization devices have been proposed for cell transplantations, being generally classified in macrodevices and microdevices. Macrodevice can produce side effect as a result of their big size. These problems are related to the scarce integration with the surrounding and a lack of a vasculature to supply blood or nutrients (Mazzitelli, et al., 2013).

In order to solve these problems, microdevices such as microparticles could be a good approach. This is because microencapsulation is based on the immobilization of cells within a semipermeable membrane. This membrane protects the cells from mechanical stress and the host's immune system. At the same time, the layer allows the bidirectional diffusion of nutrients, and waste. Moreover, microparticles have a larger surface/volume ratio compared to other immobilization scaffolds, which improves oxygen and nutrients' permeability.

However, most of the technologies used for conventional encapsulation (spray drying, fluidized beds, coacervation or emulsification) may not be suitable for the encapsulation of cells. This is because, these processes might involve some incompatible operating conditions such as high pressure or temperature, or an organic solvent, which could in turn adversely affect the cells or cause contamination.

External gelation is a very simple process that provides immediate and non-toxic alginate cell entrapment. Therefore, this technology could be an appropriate for cell encapsulation. For all this reasons, the aim of this work is focusing in the conditions and advantages of this methodology.

2 Materials and Methods

The success of microencapsulation lies among other properties in the stability and biocompatibility of the microparticles. These parameters are directly linked with the polymer used. In this respect, alginate is considered the most suitable polymer for microcapsule fabrication.

2.1 Alginate

Alginate is a linear heteropolysaccharide. Chemically it is composed of two structural units consisting of β -D-mannuronic (M) and α -L-guluronic acid (G). The shape of these monomers is different (Hernández, et al., 2010). G-blocks have a bucked shape while the M-block tends to be as an extended ribbon. Thus, when two G-blocks aligned side by side, result in the formation of a hole with specific dimension. This hole is able to bind selectively divalent ion. By dissolution in an aqueous medium, alginate forms a hydrocolloid. The polymer cross-linking occurs following the exchange of sodium ions from the guluronic acids with divalent cations (Mazzitelli, et al., 2013).

2.2 External gelation

The external gelation involves forcing a cell-polymer solution through a needle or a small-diameter tubing, into a solution containing the cross-linker to stabilize bead formation. Solely adding droplets to a cross-linking bath generates large particles (on the order of millimeters).

To form smaller bead (on the order of micrometers) a voltage gradient between the needle and cross-linking solution can be applied to overcome droplet surface tension. Alternatively, a constant vibration can be applied to a laminar liquid jet to produce small capsules. A coaxial gas flow can also be used to form beads by shearing droplets with compressed gas that flows around the needle exit. An additional extrusion approach is the co-flowing of two immiscible liquid streams in a coaxial tube, one in the aqueous phase containing the cells/polymer and the other a liquid paraffin solution. The paraffin solution, present in the outer coaxial tube, shears the polymer drops as they are extruded through a nozzle (Wilson and McDevitt, 2013)

3 Results

Microcapsules prepared by external gelation include: solid matrix beads, solid matrix beads with an external coating, liquid core capsules, and direct conformal coating. Liquid core capsules are developed by liquefying the center of a solid matrix bead as the outer membrane is stabilized by a thin polyion coating. Conformal coated microcapsules are formed by constructing a thin membrane surrounding individual cells or pre-formed cell aggregates, thereby minimizing the empty capsule volume. The particle size could range from millimeters to micrometers depending on the external gelation methodology applied.

Furthermore, the material using for the encapsulation of cells, alginate, has demonstrated to be one of the best polymer for cell encapsulation. This is because its biocompatibility, easy manipulation and gel forming capacity in mild condition.

4 Discussion

Microcapsule diameter and shape is an important issue that has to be considered for several reasons. Firstly, the size of the capsules may influence the inflammatory response. In Addition, small microcapsules have a major surface area per volume than bigger capsules. In this respect, external gelation allow to obtain particles with a small size (micrometers). Various types of particles can be developed using external gelation. These particles have different properties, for example, in solid matrix beads, encapsulated cells are more physically constrained and therefore proliferate to form smaller spheroids with multiple foci. In liquid core capsules, cell movement and proliferation are less restricted, and the cells can therefore aggregate and proliferate as a single large spheroid (Wilson and McDevitt, 2013).

5 Conclusions

Most of the technologies used for conventional encapsulation may not be suitable for the encapsulation of cells. However, external gelation technology is able to form particles with adequate particle size. Moreover, this technology uses biocompatible materials with cells and mild conditions.

6 References

1. Hernández, R.M.; Orive, G.; Murua, A. and Pedraz, J.L. Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010; 62: 711–730.
2. Mazzitelli, S.; Capretto, L.; Quinci, F.; Piva R., and Nastruzzi, C. Preparation of cell-encapsulation devices in confined microenvironment. *Advanced Drug Delivery Review*. 2013; 65: 1533–1555.
3. Wilson, J.L., and McDevitt, T.C. Stem Cell Microencapsulation for Phenotypic Control, Bioprocessing, and Transplantation. *Biotechnology and Bioengineering*. 2013; 110: 667-682.

CO-90 Radioactivity Environmental Monitoring (REM) results in southeast Spain

Francisco Piñero-García, Radiochemistry and Environmental Radiology Laboratory, Inorganic Chemical Department, Faculty of Sciences, University of Granada, Av. Fuentenueva, 18077 Granada, Spain. Tel: 958243325, franciscopigar@ugr.es.

M. Ángeles Ferro-García, Radiochemistry and Environmental Radiology Laboratory, Inorganic Chemical Department, Faculty of Sciences, University of Granada, Av. Fuentenueva, 18077 Granada, Spain. Tel: 958243325, ferro@ugr.es.

Abstract

This research is focused on the results of long-term measurements in Granada (Spain) of tap-water (January-00 to June-13) and mixed-diet (January-08 to June-13) in order to estimate their radiological risk. Tap-water was monthly collected in the laboratory while mixed-diet was quarterly taken in the university canteen. Gross- α/β indices and ^{90}Sr were determined by an α/β low-level counter moreover co-axial reverse-type germanium detector with vertical configuration was used to identify and quantify the gamma activity concentration.

Gross- α/β activities were detected in 70% and 84% of the tap-water samples, respectively. Gross- α ranged between 1.33 Bq/m^3 and 85.11 Bq/m^3 , with a mean of 14.92 Bq/m^3 . Gross- β varied from 1.21 Bq/m^3 to 331.42 Bq/m^3 with a mean of 42.94 Bq/m^3 . Therefore, gross α/β indices were always below the limits of RD140/2003 (α : 10^2 Bq/m^3 , β : 10^3 Bq/m^3). ^{90}Sr was randomly detected with a mean value of 16.11 Bq/m^3 . In four samples, ^{90}Sr activity exceeded the reporting level of European Commission (60 Bq/m^3) however it was lower than the guidance levels of WHO for ^{90}Sr in drinking water (10^3 Bq/m^3).

^{40}K was always detected in mixed-diet sample, with a mean value of $103.90 \text{ Bq/day}\cdot\text{person}$. ^{90}Sr was detected in 77.3% of the mixed-diet samples, it varied from $8.6 \text{ mBq/day}\cdot\text{person}$ to $154.2 \text{ mBq/day}\cdot\text{person}$ with a mean of $39.5 \text{ mBq/day}\cdot\text{person}$, and ^{90}Sr concentration activity was below the reporting level of European Commission, $100 \text{ mBq/day}\cdot\text{person}$.

In conclusions, the radiation exposure through tap water and mixed diet has not represented any radiological risk to human health during the monitoring period.

Keywords

Natural Radioactivity, ^{90}Sr , Tap Water, Mixed diet, Ingestion Dose

1 Introduction

Although Radioactivity belongs to the Universe since the beginning of time, Henri Becquerel did not realise it until 1896. Since its discovery, several applications were found in different fields of science, for instance, medicine, academics, industry, generation of electricity, military, etc. The applications of radioactivity showed not only their benefits, but also their hazards as results of atmospheric nuclear weapons or nuclear accidents. Therefore, to protect the environment, workers and public from radiations it is necessary monitoring radioactivity levels taking into account that the effects of radioactivity do not depend on its origin.

In order to protect and control the exposure to ionizing radiation in Spain, Spanish Nuclear Safety Council (CSN) has organised the national radiological surveillance network. This network obeys the recommendations of European Commission on the application of Article 35 and 36 of the Euratom Treaty. The dense network performs the Radioactivity Environmental Monitoring (REM) of the atmosphere and terrestrial medium. Particularly, the Radiochemistry and Environmental Radiology Laboratory of Granada carry out the radiological surveillance in the southeast Spain from 1992. For this purpose, our laboratory analyses the radioactivity levels in soils, air, drinking water and mixed diet in order to set a radiological background for future changes in environmental radioactivity originated for different human activities

The monitoring of drinking water and mixed diet allow us to control the ingestion exposure. On the one hand, the radiological surveillance of drinking water is essential due to the importance for life although its contribution to total exposure is too low. On the other hand, monitoring of mixed diet gives information about the uptake of radionuclides per day and person via the food chain. According to World Health Organization (WHO, 2004) and European Commission (2009), radionuclides in drinking water are natural: ^3H , ^{40}K and descendent of ^{232}Th and ^{238}U series. While, the radioisotopes measured in food are mainly ^{40}K and traces of nuclear accident (i.e. Chernobyl 1986, Fukushima 2011, etc.), like ^{90}Sr and ^{137}Cs . These fission products can still be detected in environmental samples due to their relatively long half-life, 28.5 and 30 year, respectively.

Therefore, the current research is focused on the study of ingestion exposure due to food and drinking water in Granada. The aim is to analyse the evolution of the results of long-term measurements on tap water and mixed-diet in Granada (Spain) in order to estimate their radiological hazard and ingestion exposure.

2 Materials and Methods

2.1 Sampling

Granada is a non-industrialized city, with a population of 240,000. It is located in southeast Spain in a natural basin surrounded by mountains of around 1000 m. Quéntar and Canales reservoir supply the water of Granada. These reservoirs collect the water of the rivers Genil and Aguas Blancas which born in Sierra Nevada. When the water of the reservoirs is not enough, the wells of the aquifer of La Vega de Granada are used. Due to the natural high quality of water in Granada, tap water was used as representative sample of drinking water. 25 L of tap water were monthly collected in the laboratory from January-00 to June-13 and the samples were stored in polyethylene vessels.

Regarding to mixed diet, European Commission recommends collecting the samples in places where many meals are consumed (i.e. factory restaurants, schools, etc). As it is known, Granada is one of the most important Spanish University with approximately 65,000 student per year (Llácer, 2013), and its canteen serves about 800,000 menus during the scholar year. For that reason, mixed diet samples were quarterly taken in the university canteen from January-08 to June-13. During one week, the breakfast, lunch and dinner were daily taken in the canteen. Finally, at the end of the week, the meals were mixed and homogenised as a single sample. Gamma radionuclides and ^{90}Sr activity consumed per day and person were analysed on all samples.

2.2 Gross alpha and gross beta activities of tap water

This research analyses the results of Gross alpha and Gross beta in water since they are used as parameter to control the radiological quality of drinking water intended for human consumption. The evaporation method was followed to determine the gross alpha and gross beta activities of water (CSN Procedure 1.9, 2006 and UNE 73311-4, 2003). The amount of tap water was calculated from conductivity measurements in order to get a mass thickness between 4 and 6 mg/cm². Firstly, this volume of water was acidified and evaporated close to dryness (3-10 mL). Then it was transferred to a stainless steel counting planchet where it was dried to constant weight. For good results, the dried residue in the planchet must be uniform and homogenous.

After preparation, the planchets were stored in desiccators until measurement to avoid contamination and/or alteration of mass thickness. Finally, the concentration activities of gross alpha and gross beta in tap water were simultaneously measured by α/β Low-Level counter (Berthold LB 770-2/5) during 12 cycles of 200 min (144,000 s). In Table 1, it is shown the features of the Gas-flow proportional counter.

Table 1. Features of α/β Low-Level counter, Berthold LB 770-2/5.

	Alpha	Beta	Comments
Gas	Pr-10		90% Argon and 10% methane
Voltage Plateau (V)	1625		
Certified standards	^{241}Am	^{90}Sr	Provided by CIEMAT
Efficiency (%)	24.7	35.7	
Background (cpm)	0.04 ± 0.01	1.1 ± 0.2	

2.3 Low-background gamma spectrometry in mixed diet

Before gamma spectrometry analysis, the samples were set up in order to attain a more accurate determination of radionuclides. Mixed diet was dried until constant weight, and then it was reduced to ashes (450°C). Finally, the ashes were put in 0.2L Marinelli beaker to carry out the gamma spectrometry analyse. Gamma activity concentrations have been detected by low-background gamma spectrometry, using a coaxial HPGe detector. The detector has a resolution of 1.9 keV at the energy of ^{60}Co (1.33 MeV) and its relative efficiency is approximately 20% (Canberra Industries, Meriden, CA). The samples were measured during 90,000 s and Genie 2000 software (Canberra Industries) was used to analyze the spectra.

^{40}K , ^{208}Tl , ^{214}Bi and ^{214}Pb were detected with activity higher than the Minimum Detectable Activity (MDA). These radionuclides were identified and quantified by the following photon emissions: 1460.8 KeV; 583.1 KeV; 238.6 KeV; 609.2 KeV and 351.9 KeV, respectively. Radioactivity was decay corrected to the mid-point of the collection period, considering the half-life of each radionuclide. Furthermore, geometry correction in efficiency was applied and background contribution was removed in all the samples. The precision of the results was tested frequently through participation in laboratory inter-comparison tests.

2.4 Determination of ^{90}Sr in tap water and mixed diet

According to ATSDR (2004), the most important sources of exposure to ^{90}Sr are food and water. ^{90}Sr has a very high radiotoxicity since it has a biochemical behavior and reactivity in the human body similar to calcium (Lopes et al. 2011). After ingestion, ^{90}Sr it is mainly accumulated in bones, in addition, its radiological effect are of long duration due to its half life (28.8 years). The ^{90}Sr decays by β^- emission ($E_{\beta^-} = 0.546$ MeV) into ^{90}Y , which β^- ($E_{\beta^-} = 2.284$ MeV) decays into stable ^{90}Zr with a half-life of 64.1 h. Secular equilibrium is reached in about 18 days. Thereafter, the activities of the ^{90}Sr and ^{90}Y remain equal.

Two different methods were used for the detection of ^{90}Sr . On the one hand, ion exchange (Bio-Rad AG[®] 50W-X8 Resin) procedure was used for determination of ^{90}Sr in tap water (Aguilar et al. 2007). On the other hand, the determination of ^{90}Sr in mixed diet was based on method developed for soils and sediment using SrCO_3 precipitation (CSN Procedure 1.6, 2005). After preparation, the planchets were stored in desiccators until measurement to avoid contamination and/or alteration of mass thickness. Measurements of $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ were done in the gas-flow proportional counter (Table 1), after secular equilibrium of both isotopes had been achieved. The samples were measured 12 cycles of 200 min (144,000 s). Furthermore, decay and efficient correction were applied together with the removal of the background contribution in all the samples.

3 Results and discussion

3.1 Tap-water

A total of 162 monthly samples of tap water were analyzed over fourteen consecutive years. Table 2 shows frequency, mean, minimum and maximum values of radioactivity levels in tap water of Granada. Gross α and Gross β activities were detected in the 70.4%, 84.6% of the samples, respectively (Table 2).

Table 2. Frequency, mean, minimum and maximum values of radioactivity levels in tap water of Granada from January 2000 to June 2013.

	Gross α (Bq·m ⁻³)	Gross β (Bq·m ⁻³)	⁹⁰ Sr (Bq·m ⁻³)
% cases	70.4	84.6	39.5
Average	14.9	42.9	16.1
Minimum	1.3	1.2	2.4
Maximum	85.1	331.4	160.2

In Spain, the Royal Decree 140/2003 establishes the criteria for the quality of drinking water intended for human consumption. In relation to radioactivity levels, RD140/2003 determines that gross alpha activity and gross beta activity without potassium contribution should not exceed 100 Bq/m³ and 1000 Bq/m³, respectively. Table 2 shows that gross- α ranged between 1.33 Bq/m³ and 85.11 Bq/m³, with a mean of 14.92 Bq/m³. Furthermore, gross- β , with potassium contribution, varied from 1.21 Bq/m³ to 331.42 Bq/m³ with an average of 42.94 Bq/m³ (Table 2). Therefore, gross α and β activities were always below the limits established by R.D.140/2003.

Table 3 shows the Gross α and Gross β activities found in tap water in different places. If the results of the present research are compared with the values of other places (Table 3), similar orders of magnitude are found for gross alpha and beta activities. However, the mean of Gross α and Gross β activities in Granada are lower than the activities measured in other areas.

Table 3. Gross α and Gross β activities measured in tap water in different places.

	Reference	Gross α (Bq·m ⁻³)		Gross β (Bq·m ⁻³)	
		Mean	Ranged	Mean	Ranged
Eastern Turkey	Damla et al. (2006)		0.2 – 15.0		25.2 – 264.4
Turkey	Görür et al. (2011)	51.9	23.5 – 115.6	77.8	40.8 – 190.5
Amam (Jordan)	Al-Amir et al. (2012)	96.0	<50 – 250	251	<188 – 327
Milano (Italy)	Rusconi et al. (2004)	122	70 – 300		
Central Italy	Desideri et al. (2013)		<18.2– 128.2		<41.6 – 258.6
Serbia	Jankovic´ et al. (2012)				56 – 151
Spain	CSN (2013)	26.6	1.6 – 180.0	111.6	15.0 – 750.0

About Spain, Table 4 shows the distribution for Gross α , Gross β and ⁹⁰Sr in tap water, when activities were greater than Minimum Detectable Activity between 2001 and 2011 (CSN, 2013). The average for Gross α and Gross β activities were 26.6 Bq/m³ and 111.6 Bq/m³, respectively (Table 3). The Gross α and Gross β activities of Granada were low compared to other cities, and the highest activities were measured in La Laguna, Canarias (Table 4).

Table 4. Annual average of Gross α , Gross β and ⁹⁰Sr activities in tap water of Spain, from 2001 to 2011.

Gross α (Bq·m ⁻³)		Gross β (Bq·m ⁻³)		⁹⁰ Sr (Bq·m ⁻³)	
Mean	Ranged	Mean	Ranged	Mean	Ranged

Badajoz	16.2	9.5 – 31.0	73.9	44.0 – 110.0	9.5	5.2 – 19.0
Baleares	55.3	23.0 – 180.0	102.5	70.0 – 130.0		
Barcelona	27.8	15.0 – 35.0	382.7	240.0 – 640.0	3.5	2.7 – 4.2
Cáceres	14.9	7.6 – 28.0	105.2	81.0 – 170.0	6.3	3.0 – 8.0
Ferrol	6.3	3.1 – 11.0	32.5	30.0 – 38.0		
Ciudad Real			115.2	69.0 – 150.0	25.7	5.6 – 59.0
Cantabria	33.4	20.0 – 51.0	86.0	63.0 – 120.0	10.6	5.8 – 17.0
León	33.2	14.0 – 79.0	30.4	23.0 – 39.0	10.9	3.9 – 20.0
La Laguna	80.9	18.0 – 150.0	471.8	360.0 – 750.0	7.9	3.1 – 12.0
Madrid	5.2	2.1 – 8.5	42.3	29.0 – 59.0	3.6	3.1 – 4.9
Málaga	17.4	6.7 – 20.0	110.4	52.0 – 170.0	11.3	6.3 – 31.0
Oviedo	15.5	14.0 – 20.0	31.3	22.0 – 49.0	7.9	5.2 – 14.0
Bilbao	5.4	4.0 – 7.7	39.0	33.0 – 60.0	4.8	3.9 – 6.0
Salamanca	6.9	3.0 – 17.0	47.9	34.0 – 64.0	3.9	1.6 – 5.9
Sevilla	60.0	21.0 – 170.0	156.4	15.0 – 300.0	3.6	2.7 – 4.5
Valencia	44.5	25.0 – 67.0	94.9	49.0 – 230.0	3.4	1.6 – 8.7
Zaragoza	3.7	1.6 – 8.1	109.1	74.0 – 150.0	15.7	12.0 – 21.0

Although Gross α and β activities were below limits and according to WHO no further action is required, ^{90}Sr analysis was carried out due to its high radio-toxicity. Table 2 shows that ^{90}Sr activity concentration was randomly detected in the 39.5% of the tap water samples. The activity ranged between 2.4 – 160.2 Bq/m³, with an average of 16.11 Bq/m³. European Commission establishes 60 Bq/m³ as reporting level of this radionuclide.

In this research, in four times, the concentration activity of ^{90}Sr exceeded the reporting level however it was always below the maximum permitted limit for liquid foodstuffs for isotopes of strontium ($1.25 \cdot 10^5$ Bq/m³, Council Regulation, Euratom, n^o 2218/89) and the guidance levels of WHO (2004) for ^{90}Sr in drinking water (10^3 Bq/m³). The activity of ^{90}Sr in Granada was usually higher than Spanish mean 8.6 Bq/m³, although the highest concentrations were found in Ciudad Real, 25.7 Bq/m³ (Table 4).

3.2 Mixed diet

A total of 22 quarterly samples of mixed diet were analysed between 2008 and 2013. Table 5 shows frequency, mean, minimum and maximum values of the detected radionuclides in mixed diet samples. High activity of ^{40}K was always detected, with a mean value of 103.90 Bq/day-person. These results are similar to the typical concentration of ^{40}K reported by European Commission (2009).

Table 5. Frequency, mean, minimum and maximum values of radioactivity levels in mixed diet from January 2008 to June 2013.

	^{40}K (Bq·p ⁻¹ ·day ⁻¹)	^{208}Tl (mBq·p ⁻¹ ·day ⁻¹)	^{214}Bi (mBq·p ⁻¹ ·day ⁻¹)	^{90}Sr (mBq·p ⁻¹ ·day ⁻¹)
% cases	100	31.8	45.5	77.3
Average	103.9	371.8	320.5	39.5
Minimum	7.7	181.1	91.5	8.6
Maximum	231.2	674.4	643.9	154.2

Other natural radionuclides, like ^{208}Tl and ^{214}Bi , were randomly detected, although, their contributions are insignificant. On the other hand, ^{90}Sr was detected in 77.3% of the mixed-diet samples, it varied from 8.6 mBq/day-person to 154.2 mBq/day-person with a mean of 39.5 mBq/day-person (Table 5). Therefore, the concentration activity of ^{90}Sr was always below the reporting level of European Commission (2009), 100 mBq/day-person. Figure 4 shows the Spanish evolution for ^{90}Sr in mixed diet samples between 2008 and 2011 (CSN 2013). The highest mean concentrations for ^{90}Sr in Spain were found in Madrid and La La-

guna (Canarias) with the values of 91.3 and 100.2, respectively. In relation to Granada, the concentration of ^{90}Sr was always lower than the Spanish average activity, 43.9 mBq/day-person.

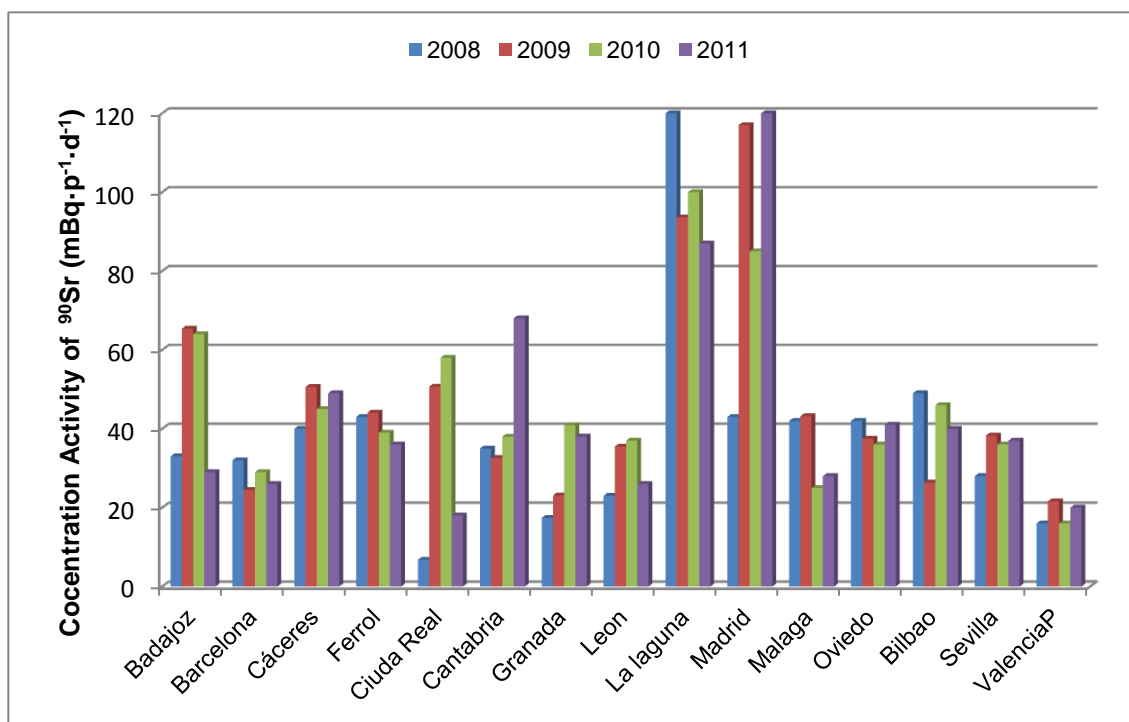


Figure 4. Evolution of annual average concentration of ^{90}Sr in mixed diet of Spain from 2008 to 2011.

3.3 Ingestion doses

Ingestion dose has been calculated for the radionuclides ^{40}K and ^{90}Sr , considering a consumption rate of water and mixed diet of 730 dm³/y and 1.92 Kg/day, respectively. Table 5 shows the results of the calculated ingestion dose.

Table 5. Ingestion dose received from ^{40}K and ^{90}Sr in mixed diet and tap water.

	Effective Dose Coeficiente Sv/Bq	Tap Water ($\mu\text{Sv/y}$)	Mixed diet ($\mu\text{Sv/y}$)
^{40}K	$6.20 \cdot 10^{-9}$		235.2
^{90}Sr	$2.8 \cdot 10^{-8}$	0.329	0.404

The values in mixed diet are similar to the reported ingestion dose in Austria for ^{40}K and ^{90}Sr : 158 $\mu\text{Sv/y}$ and 0.493 $\mu\text{Sv/y}$, respectively (Landstetter et al. 2013). In addition, on April 2011, traces of ^{131}I were detected in chard and goat cheese of Granada as a result of Fukushima nuclear accident (Piñero-García and Ferro-García, 2012). Considering conservative calculation the estimated ingestion dose for ^{131}I was 130 nSv/y (Piñero-García and Ferro-García, 2012), this contribution just increased a 0.06% the total ingestion exposure doses in 2011.

The total average ingestion dose for these samples was 0.236 mSv/y and it was below the annual effective dose limit for members of the public in Spain, 1 mSv/y, Royal Decree 783/2001. Therefore, during the monitoring period, radiation exposure through tap water and mixed diet has not represented any radiological risk to human health.

4 Conclusions

The most important conclusions of this research are:

1. Gross alpha and gross beta activities in tap water in Granada from 2000 to 2013 did not exceed the limits of the Royal Decree 140/2003. Therefore, the water was apt for human consumption from the radiological point of view.
2. Gross alpha and gross beta activity of tap water in Granada is usually low compared with the activities concentrations of other places.
3. The higher concentration of radionuclides detected were mainly natural, like ^{40}K and descent of the ^{232}Th and ^{238}U series.
4. The highest contribution to the ingestion dose is ^{40}K and the contribution of ^{90}Sr via food chain only represents the 0.31% of the total exposure.
5. During the monitoring period, radiation exposure through tap water and mixed diet has not represented any radiological risk to human health.

Acknowledgments

We are grateful to Spanish Nuclear Safety Council (CSN) for the kind support given to the Radiochemistry and Environmental Radiology Laboratory of the University of Granada since 1993. To finish, we wish to thank to all the laboratory personnel that during these years have worked in the acquisition of the experimental data used in this research.

References

- Aguilar R., Pujol L., De Pablo M.A. Puesta a punto de un método para la determinación de la actividad de ^{90}Sr en muestras de agua. *Ingeniería Civil* 148/2007.
- Al-Amir S.M., Al-Hamarneh I.F., Al-Abed T., Awadallah M. Natural radioactivity in tap water and associated age-dependent dose and lifetime risk assessment in Amman, Jordan. *Applied Radiation and Isotopes* 70 (2012) 692–698.
- ATSDR, 2004. Strontium CAS #7440-24-6. Division of Toxicology. U.S. Department of health and human services, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Council Regulation (Euratom) n° 2218/89. Amending Regulation (Euratom) n°3954/87 laying down maximum permitted levels of radioactive contamination of foodstuffs and of feedingstuffs following a nuclear accident or any other case of radiological emergency. 18 July 1989.
- CSN Procedure 1.6, 2005. Procedimiento para la determinación de la concentración de actividad de ^{89}Sr y ^{90}Sr en suelos y sedimentos. Colección Informes Técnicos 11.2005 Serie Vigilancia Radiológica Ambiental.
- CSN Procedure 1.9, 2006. Procedimientos para la determinación del índice de actividad alfa total en muestras de agua. Métodos de coprecipitación y evaporación.
- CSN, 2013. Programas de vigilancia radiológica ambiental. Informe técnico 9, 12, 14, 15, 17, 19, 21, 23, 28, 30, 35. Programas de vigilancia radiológica ambiental. Resultados desde 2001 a 2011.
- Damla N., Çevik U., Karahan G., Kobya A.I. Gross α and Gross β activities in tap waters in Eastern Black Sea region of Turkey. *Chemosphere* 62 (2006) 957–960.

- Desideri D., Roselli C., Feduzi L., Meli M.A.. Radiological characterization of drinking waters in Central Italy. *Microchemical Journal* 87 (2007) 13–19.
- European Commission, 2009. Joint Research Centre Institute for Environment and Sustainability. Nuclear Science and Technology .Radiation protection nº161. Environmental Radioactivity European Community 2004-2006.
- Görür F.K., Keser R., Dizman S., Okumuşoğlu N.T. Annual effective dose and concentration levels of gross α and β in various waters from Samsun, Turkey. *Desalination* 279 (2011) 135–139.
- Janković M.M., Todorović D.J., Todorović N.A., Nikolov J. Natural radionuclides in drinking waters in Serbia. *Applied Radiation and Isotopes* 70 (2012) 2703–2710.
- Landstetter C., Zapletal M., Sinojmeri M., Katzlberger C. Measurements of natural and artificial radionuclides in food samples and water for human consumption in Austria for the calculation of the ingestion dose. *J Radioanal Nucl Chem* (2013) 296:905–908.
- Llácer G.C. Guía del Estudiante Internacional 2013. Vicerrectorado de Relaciones Internacionales y Cooperación al Desarrollo. Universidad de Granada.
- Lopes I, Madruga M. J., Mourato A., Abrantes J., Reis M. Determination of ^{90}Sr in Portuguese foodstuffs. *J Radioanal Nucl Chem* (2010) 286:335–340.
- Piñero-García F., Ferro-García M.A. Traces of fission products in southeast Spain after the Fukushima nuclear accident. *Journal of Environmental Radioactivity* 114 (2012) 146 – 151.
- Royal Decree 140/2003 (Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero). By which health criteria for the quality of water intended for human consumption are established. Published in the Spanish Official State Gazette number 45, of the 21st of February of 2003.
- Royal Decree 783/2001, Spain. Regulation on Sanitary Protection against Ionizing Radiations. Published in the Spanish Official State Gazette number 178, of the 26th of July 2001.
- Rusconi R., Forte M., Badalamenti P., Bellinzona S., Gallini R., Maltese S., Romeo C., Sgorbati G. The monitoring of tap water in Milano: Planning methods and results. *Radiation Protection Dosimetry* (2004), Vol. 111, No. 4, pp. 373–376.
- Turner J.E. 2nd edition. *Atoms, Radiation, and Radiation Protection*. Wiley, Interscience.1995. New York.
- UNE 73311-4, 2003. Determinación del índice de actividad beta total en aguas mediante contador proporcional.
- WHO, 2004. Guidelines for drinking-water quality. World Health Organisation, Geneva, vol. 1, 2004, pp. 197–209.

CO-109 La responsabilidad social del joven investigador: El falsafén histórico, la política investigadora y la libertad

Dr. Juan D. López-Arquillo. LA+a asociados CEC UGr Laa.arquitectos@gmail.com

Resumen

Las actuales posibilidades de investigación en Arquitectura –con los campos que la misma engloban aprovechadas por jóvenes arquitectos para aportar conocimiento en las variantes de la investigación que implica la disciplina, superando las categorías de investigaciones de profesiones medias que ahora reclaman, en el marco del EEES, como protocolos propios. La investigación en Arquitectura –y por ello en edificación, ingeniería, urbanismo, etc...- generada por las múltiples proyecciones de la capacidad intelectual y científica de los arquitectos, es capaz de arrojar sobre una realidad social, paisajística y urbana-bien injusta, bien manifiestamente mejorable- nuevos aportes que redirijan los caminos de transformación de una realidad hacia otra mejor y más justa, en el actual estado de constante cambio de nuestras ciudades y entornos. Un ensayo sobre la multicapacidad de los investigadores libres.

Palabras Clave

Arquitectura, Ciudad, Urbanística, Verdad, Ciencia, Economía, Pensamiento, EEES, Doctor

1 Complejidad de la Arquitectura y trascendencia de su investigación.

La Arquitectura ha sido tratada históricamente -dentro de la clasificatoria del conocimiento que implicó la codificación enciclopédica de *Diderot* y *D'Alambert* a finales del XVIII- en las muy diversas esferas tecnológicas o científicas de la historia, la construcción y la ingeniería, así como en las interpretativas esferas del arte, la filosofía y el derecho. En ella, ciencia y arte vienen de la mano, y es esta esquizofrénica disyuntiva, provocada por los divergentes campos del conocimiento que en ella actúan y es necesario formarse, la que hace necesaria una importantísima carga lectiva para su completo estudio y ejercicio profesional.

Al estar inmersos en una realidad social, tecnológica y políticamente compleja, a cada instante con mayor espesor, cada actuación sobre la misma se densifica al estar obligados a operar simultáneamente en un número creciente de esferas interpretativas. El proyecto de Arquitectura en el XIII era metafísico, ajustando cualquier obra a una representatividad metalingüística previa que la hacía ascender a los cielos. En el XV, el proyecto tomó su significado actual de adaptación de una realidad material a otra cultural, presentándolas simultáneamente en la obra concreta. Del XVI al XIX el proyecto trabajó en su posibilidad plástica y maleable, habiendo descubierto las posibilidades de innovar copiando y modificando vidas anteriores de la arquitectura y aprovechando finalmente el cambio del *ancient regime*. Pero en los primeros lustros del XX la arquitectura está llamada a resolver problemas sociales reales que se presentan en ese siglo por la explosión demográfica sin precedentes en la historia de la humanidad y la destrucción provocada por las dos grandes Guerras Mundiales, que hacen “*tabula rasa*” de numerosas ciudades. Los arquitectos tienen que aportar nuevas soluciones para la construcción de una nueva ciudad, y la celeridad necesaria para la recuperación fuerza la desaparición de cierta atmósfera holística del proyecto de arquitectura *culto*, para dar entrada a otras profesiones menores –como la figura del aparejador, ya regulada desde 1854 en España como profesión auxiliar- o incluso profesionales de la ingeniería civil que asaltan campos externos a su formación ante la incapacidad de las escuelas de formar los arquitectos que se necesitaban.

La historia de la Arquitectura y la intemporalidad del presente histórico nos han narrado cómo el trabajo de los arquitectos durante los 4000 años de profesión -casi tal y como hoy la

conocemos- ha sido el diálogo entre la voluntad de tender a idealizaciones formales y las dificultades y limitaciones técnicas y materiales para hacerlo. En ese trabajo, sólo la infusión de un *sentido cierto de verdad* en la búsqueda personal de la transducción de lo ideal a lo real es el que justifica las dificultades, los sinsabores y los desconsoles que a veces esta profesión implica. Y todo ello, antes sólo de comenzar siquiera a incorporar un perfil investigador al profesional.

Los arquitectos ni tenemos formación ni proyectamos, ya en el ejercicio profesional, solamente para que nuestras obras permanezcan y funcionen bien, sino para deleitarnos en unas inmersiones culturales que determinan lo que vemos y lo que pensamos, codificando así la realidad que percibimos como el *presente histórico* desde el que se fijan las obras en el tiempo; haciendo un especial énfasis creativo desde una fruición personal centrada en pocas obras, debido a la menor producción profesional –en términos cuantitativos de la generalidad de la profesión- que ha llegado a suponer un desplazamiento de los modelos de despacho profesional y la afortunada entrada de los perfiles investigadores en los currículos de muchos arquitectos.

Es la investigación en Arquitectura, con los múltiples campos que ello ofrece, una imponente trayectoria posterior para los que la eligen, pues es evidente y en parte, inmediato, el gozo personal por el enriquecimiento material e inmaterial de la humanidad, al fin y al cabo, el mayor logro al que aspira todo investigador en cualquier otro campo que se precie.

El esfuerzo, pues, de conformar la materia técnica según una necesidad de expresión impulsora social es el gran reto del trabajo del arquitecto, profesional, que trabaja no sobre un material –no es un ingeniero- sino sobre la elaboración de la realidad. Por supuesto, se limita la definición de *arquitecto, profesional*, desafortadamente delimitadora de los profesionales que trabajan sobre la verdadera identidad de la arquitectura, evitando la calificación de este epíteto –en ambos extremos- sobre aquellos que, habiendo cursado la misma formación, tienen su ámbito laboral fijado en la administración pública. Ellos y ellas no pueden ser considerados así.

La Arquitectura es un complejo ente que es, a la par, resultado expresivo de una sociedad –de sus relaciones sociales, económicas, sociales, políticas...- y es fuente de cambio al impulsar, sus profesionales, cambios significativos en la forma concreta relación y autogénesis de los proyectos de Arquitectura: la forma y el fondo de relacionarse con la ciudad, o de vencer a los elementos, o de resolver un problema técnico, o de impulsar una nueva tecnología que nace de una nueva exigencia edilicia. Es un arma de doble filo, por ello, puesto que un mal proyecto no evidencia sólo los fallos que lo permitieron posible, sino también aumenta la masa histórica a superar que los compañeros no doblegados han de superar día a día contra la corriente de la masa social no crítica. Y, dada su entelequia macroeconómica, un volumen importante de afectación económica de cualquier sociedad urbana desarrollada.

2 Investigación y ejercicio profesional en Arquitectura.

La investigación en áreas científicas históricamente consolidadas como tales es enormemente compleja y costosa, pues su instrumentalización y coste son de tal envergadura que no pueden ser acometidos por investigadores aislados, sumando esfuerzos en común en numerosas disciplinas para la consecución de avances con aplicación real y práctica al común de los ciudadanos.

Sin embargo, la investigación en Arquitectura es radicalmente diferente. Aunque, comúnmente a todo campo científico, es la sumatoria de esfuerzos disciplinarios y/o de equipo los que producen resultados significativos, en las muy diferentes disciplinas que componen la Arquitectura, la figura del investigador personal sí es relevante, puesto que posee la misma una facilidad sincrética que pocos otros poseen: Una innovación, resultado de una concreta investigación, a una escala menor, suele ser significativamente aportable a una escala mucho mayor, de lo que toma su relevancia y significancia social y técnica. Además, uno de los parámetros de investigación más significativos de toda investigación es el factor económico, al igual que en esta disciplina en concreto, pues una vez se ha corroborado la validez de alguna innovación, se necesitan unos materiales y sistemas que la industria, en un momento

inicial, no puede proveer, siendo necesarios modelos de implementación que exporten a la gran escala lo verificado en la pequeña. Las innovaciones arquitectónicas han ido progresivamente demandando un procesamiento industrial que no existe en el momento, pero siempre requiere de una prueba de tiempo –especialmente ligada a la durabilidad de materiales, la verificación de funcionamientos urbanísticos y los periodos de reversión en los supuestos de cálculos de las estructuras- que ha de pasar, necesariamente, para su aportación generalizada a sistemas de gran escala.

Y es que cualquier innovación no verá la luz a un sistema general de producción hasta pasados unos cuantos años de exposición a elementos, por lo que la ventaja inicial del bajo coste de la investigación profesional personal se ve contrarrestado por el necesario tiempo de prueba, pero, sobre todo, por la insoportable responsabilidad profesional de aquellos arquitectos profesionales –y volvemos a referirnos a los límites del término- que innovan en sus obras, que, a gran escala, no dejan de ser productos de representación áulica en los que cualquier problema acogerá grados de publicidad y significancia que jamás acontecerían en la pequeña escala, lo que evita en gran parte la necesaria exportabilidad de innovaciones surgidas de la investigación arquitectónica a la gran escala, verdadero campo de uso de la Arquitectura como disciplina.

Esta incorrespondencia entre la necesidad de expresión áulica –cuando se genera una gran obra siempre es por causa metasocial, bien política bien empresarial- y la responsabilidad de lo innovado en esa gran obra –exclusiva responsabilidad del arquitecto- es la consecuencia de la minusvaloración del papel del mismo a la hora de repartir la responsabilidad civil y penal del proyecto de arquitectura, que si bien ha sido forzado a asumir la participación de profesiones medias de la edificación – o incluso externas a la misma- es extremadamente rígido a la hora de reconocer al arquitecto como único responsable del proceso, cuando, en la realidad metajurídica, en pocas ocasiones es así.

Es el único campo de investigación, la Arquitectura, en el que la investigación está limitada por la implicación profesional de su autor más allá de alcanzar objetivos. Si una fórmula química falla, se vuelve a reformular y se contrasta. Pero si falla un nuevo cerramiento –no sólo material, sino también sistema constructivo- cuya única validez se puede comprobar en la realidad material de una obra construida, los grados de responsabilidad harán de dicha investigación algo inseparable de la trayectoria profesional del arquitecto. Ninguna otra profesión media tiene responsabilidad en campos de innovación arquitectónica, refiriéndonos, siempre, a campos con relevancia material. La actual coyuntura de falta de obra viva de edificación a todo nivel ha limitado, con mucho, la investigación de la Arquitectura a campos de la misma que no necesitan ese refrendo de obra material; por lo que esta implicación profesional del arquitecto investigador –y no pretendemos que una mera innovación constituya nunca una investigación- se ve ahora limitada a temas menos comprometidos en los que su rigor científico no necesita de la comprobación material a gran escala, siendo actualmente su papel infinitamente más sencillo.

3 Intrusismo e investigación parcial. Falseamientos metauniversitarios.

La investigación hasta la llegada del EEES, la investigación en Arquitectura –así como en ingeniería- estaba limitada a las Escuelas Técnicas Superiores, pues en ella se impartían licenciaturas en las que, implícitamente, se habían de dominar las materias profesionales al completo. Tras ello, se podía comenzar una carrera investigadora cuyo objetivo último era no el conocimiento de la disciplina, sino la ampliación de la misma, en sus sentidos más amplios. En los periodos de investigación, se liberaba a la Arquitectura de la semántica, y se le ofrecía un contenido que ampliaba los límites de la disciplina hasta entonces.

Y los diferentes ámbitos de la disciplina eran abordados por los diferentes departamentos, siempre desde la lógica de hacer avanzar la disciplina, digamos, en *vertical*, esto es, según la generación de conocimiento sobre los límites últimos alcanzados por investigaciones anteriores. Y la profundidad o grosor de dicho conocimiento era el requerido por las limitaciones del ejercicio de la investigación y su necesaria exportabilidad a campos de trascendencia arquitectónica directa, como la edificación, la urbanística o la legislación.

Sintomática del EEES es la primacía, en las ramas de Arquitectura e Ingeniería, del saber práctico sobre el saber teórico; pues es evidente el enfoque meramente mercantilista de esta reorganización de la enseñanza universitaria. Es por ello que se ha implementado ahora un sistema de valoración y reconducción del fallo juvenil en el acceso a carreras antes denominadas “superiores” al permitir que todas las antes carreras universitarias tengan ahora la posibilidad de ampliar sus conocimientos mediante los posgrados e, incluso, el doctorado. La limitación disciplinaria en la formación de profesiones medias y auxiliares provoca que, una vez acaban los alumnos los nuevos “grados” formativos, la carencia en el dominio disciplinario dirige la investigación en esos posgrados e incluso en el doctorado, a la ampliación de las capacidades técnicas profesionales ligadas a esos grados formativos, y no hacia la ampliación de la propia disciplina. La denominación, e incluso, la adscripción de trabajos de doctorado a métodos rígidamente científicos, evidencia aún más las carencias de la organización de la carrera investigadora en el EEES, pues la realización de tesis doctorales sobre capacidades técnicas profesionales no construyen una ampliación en vertical de sus disciplinas, sino que no dejan de ser un mero engrosamiento –en horizontal- de esas capacidades profesionales no dominadas en los grados formativos menores. Las diferencias entre las líneas de alta investigación doctoral y los posgrados encajados por el EEES en la formación universitaria superior ha sido afortunadamente evidenciado en la reorganización de la formación universitaria en España, debido precisamente a este forzoso ajuste al marco del EEES; puesto que se ha comprendido bien que los arquitectos e ingenieros técnicos, anteriores diplomaturas, ni son ni tienen las mismas atribuciones, luego de unos años más de formación, que los arquitectos e ingenieros superiores.

Por ahora, la investigación superior en disciplinas cuya formación principal y atribuciones profesionales depende de un grado, no deja de ser puntual, especialmente por el nivel de acceso a las mismas, aunque ha sido casi inmediato –reconociendo el largo complejo acumulado durante décadas de reconocimiento social- el cambio de las antiguas “*escuelas universitarias*” de arquitectura o ingeniería técnica, a *escuelas técnicas superiores* de disciplinas que sólo han existido –hasta ahora el marco legislativo lo reconoce así, claro está- para la formación de profesionales medios supeditados a los egresados de las –antes y ahora- “*escuelas técnicas superiores*” de Arquitectura e Ingeniería. El caso más evidente de este intento de superación de su propia entidad formativa, profesional y social seguramente hayan sido las antiguas *escuelas universitarias de arquitectura técnica*, que una vez aprobados los primeros planes de estudio del EEES cambiaron precipitadamente sus nombre a “*escuelas técnicas superiores de ingeniería de edificación*” cuando ese título, el de “*ingeniero de edificación*” ha sido anulado por el propio Tribunal Constitucional, que confirmaba la Sentencia del Tribunal Supremo, el cual invalidaba dicho título en 2010. Ahora, se ha llegado a la sorprendente situación de tener “*escuelas técnicas superiores de ingeniería de edificación*” que, sin embargo, no imparten dicho inexistente título, sino grados y posgrados en edificación. Algo muy similar ocurre con la enfermería, la ingeniería técnica de obras públicas, etc. Se reclaman como títulos superiores –posibilitantes de investigación doctoral- a itinerarios educativos cuyas atribuciones profesionales son auxiliares de otras.

Esta esforzada superación de la transducción ideal entre realidad formativa e investigación, descubre la novedosa investigación en disciplinas menores como fruto de una circunstancial interpretación positivista y mercantil de la Universidad, basada en la anulación de las características propias de cada parte nos descubre la necesidad de abandonar la búsqueda de la trascendencia metasocial de la disciplina, para dejarla en mera categorización profesional, algo que, es evidente, puede llegar a sucederle a toda una disciplina del conocimiento al intentar ser proactiva más allá de sí misma.

4 Enfoques extra profesionales. Docencia e investigación exclusiva.

Nos centramos ahora en una situación generalizada para los nuevos procesos de formación del personal investigador, que reconoce la mayor deficiencia en la formación técnica de arquitectos e ingenieros: La carrera docente se comienza a separar, radicalmente, de la profesional. La situación hasta el momento actual es que profesionales de trayectoria reconocida accedían, luego de unos años de profesión e investigación profesional, a la docencia, con base profesional suficiente para poder formar a futuros técnicos. Luego de comenzar esas

carreras docentes, estructuraban sus logros de investigación profesional y realizaban el doctorado. Por tanto, no existía una mercantilización de la Universidad sino lo contrario, eran los profesionales formados fuera los que ofrecían su formación.

Ahora, el marco de ajuste común del EEES no ha hecho sino segregar radicalmente la formación de profesionales y la formación de personal investigador, pues incluso se limitan los años de trabajo profesional para acceder a determinados programas. Lo que está provocando es, sencillamente, una progresiva desaparición del profesional que accede a la universidad con luengos años de ejercicio profesional, dejando la formación de técnicos en manos de quien eligió la carrera docente incluso ya durante los estudios –o como alternativa a un mercado laboral incierto- y, por tanto, no se ha podido desarrollar como profesional técnico y, de facto, ofrecerá una peor formación práctica a sus alumnos.

Pretendiendo segregar universidad y mercado laboral, el EEES ha provocado el efecto contrario, una total mercantilización de la misma por la necesidad de verdaderos programas profesionales extrauniversitarios –y mucho más onerosos- al ir progresivamente reconociendo la universidad como un campo profesional delimitado sólo para aquellos que no pueden desarrollar una carrera profesional fuera, al igual que ocurre con la política. Y hacia ello vamos, mediante la incorporación de investigadores a las carreras docentes de profesionales. Tres perfiles tan diferentes como el del investigador, el del docente y el del profesional sumados inconscientemente para la depreciación de la formación universitaria, a favor de posgrados de organizaciones privadas que sí elaboran planes docentes sobre la base de profesionales de renombre, como antaño realizaban muchas universidades.

Hoy, un posgrado de una universidad pública tiene un coste de 3 a 5 veces inferior a una universidad privada, y entre 5 y 15 veces por debajo de los másteres de empresa de mayor renombre. La formación de alto grado, la que influye en la toma real de decisiones políticas de trascendencia, ha quedado fuera de la estructura universitaria por esta causa. Y, aunque las universidades norteamericanas han sido las que realmente han creado estos programas formativos de élites nacionales, generando con ello una muy mayor relevancia social, las universidades españolas están operando en un sentido opuesto. Por ello, su relevancia social, profesional y de investigación decae progresiva y continuadamente frente a Institutos privados.

Por tanto, la segregación entre los jóvenes investigadores -que han de enfrentarse continuamente a la inestabilidad laboral de contratos de corta duración y programas dependientes en exceso de políticas de investigación- y la realidad profesional de alto nivel, es ya un hecho. Los perfiles de profesorado y personal investigador se construyen sobre itinerarios absolutamente encontrados con la empresa, lo que impide el adecuado trasvase de un campo a otro. La universidad española sirve ya, en muchos casos, como un mero trámite para acceder a másteres de gestión empresarial privada, impartidos por perfiles de profesorado no investigador. Y sería necesario un replanteamiento de la necesidad impuesta para el profesorado de ser, a la vez, un buen investigador. Ser un reconocido profesional, un buen investigador y un gran docente implica en algunas disciplinas capacidades personales tan encontradas que, encontrarlas todas ellas sintetizadas en una sola persona es, en el caso de la Arquitectura, prácticamente imposible. Aunque, claro está, la pasión en y por la disciplina lo posibilita.

5 Estructura oficial y adscripción oficiosa.

Existe, además, un problema añadido, y es el resultante de la inclusión de los programas de investigación en un marco académico politizado –y, en algunos departamentos, también marco familiar-. Los jóvenes investigadores en las diversas ramas del conocimiento universitario se han de enfrentar, continuamente, con la oposición a ciertos resultados de investigación que contradigan o se opongan claramente a la ideología dominante, establecida por cierto ejercicio abyecto del poder político y metasociológico actual. Así como se evitan temas de investigación o tesis con resonancias políticas, raciales o clasistas, la necesidad de publicación y el riesgo cierto de concluir la investigación con aseveraciones –demostradas- que contradigan la verdad oficial y oficiosa establecida en los más diversos temas, provocan una sobredimensión de los temas de investigación en numerosas escuelas y facultades. Es una

situación similar a las investigaciones de nuevos grados surgidos de antiguas diplomaturas que, a falta del dominio de la disciplina, se centran en capacidades profesionales como tema de investigación o tesis. La falta de criterio propio e independencia del investigador o doctorando, respecto de su programa, su director y su departamento, es, quizás, la más terrible causa de mediocridad de muchos trabajos de investigación.

Por tanto, en las más diversas disciplinas -en especial las de repercusión o representación social- hay numerosas ocasiones en las que el investigador se encuentra en una difícil posición de forzado equilibrio entre lo que convenientemente se ha establecido como realidad demostrada, aceptada socialmente, y lo que resulta de una investigación, tanto en sus conclusiones como en el camino que puede abrir dicha investigación. Ello no representaría mayor problema, si no fuera por la adscripción de muchos doctorandos e investigadores a programas de investigación subvencionados cuyos responsables son capaces, en extremo, de suspender dichos programas ante la amenaza evidente de que la carga crítica que sobre una verdad convenida impone la investigación haga peligrar, incluso, el cargo estamentario que decide sobre dichos programas de investigación.

Contra todo eso, es necesario para los jóvenes investigadores comprendan la importancia social de sus resultados y la necesidad de no ocultarlos parcialmente por agradar a directores de investigación o, lo que es peor, a políticos, comenzando un camino de separación entre los responsables políticos y los programas de investigación, por cuanto se fuerza la *verdad* convencional en dicho condicionamiento.

La verdad "*Universal*" -como exégesis del nómeno promulgado por el Cristianismo- queda fuera del raciocinio humano. Sin embargo, en los más diversos campos, la interpretación secular de la misma ha aplicado cierta verdad parcial como -en clara referencia escolástica- la coherencia plena de enunciado, significado y significante. La verdad de una investigación o tesis proyectiva será el resultado de una construcción universal disciplinaria, plasmada en una estructura concreta de investigación. Una construcción epistémica o científica -u operativa en ambas realidades, como en Arquitectura- que empieza por las conclusiones, que se va erigiendo de arriba hacia abajo y de abajo hacia arriba con procesos simultáneos, reflejando en dicho desdoblamiento la multiplicidad evidente de la realidad y sus interpretaciones. En la medida en la que una investigación haya propuesto un horizonte demostrativo válido y haya llegado a él -bien por la autovía de la demostración, bien por los vericuetos montañosos de la reevaluación- mayor valor semántico le podrá ser asignado y más significativa la afeción que dicha investigación aporte a su disciplina.

6 Conclusiones: El joven investigador como solitario héroe herácleo.

Resulta trágica, y cómica a la par, la adscripción de los perfiles curriculares sobre determinados clichés preestablecidos de cómo se han de realizar los trabajos de investigación, o la docencia, especialmente cuando el discurso político predominante es la independencia y la libertad personal. Esas universidades que promulgan esos valores personales, resultan luego constreñidoras hasta el extremo de la libertad individual, forzando a cualquier investigación realizada por personal formado y cualificado a encuadrarse a programas preestablecidos, como forma tanto de controlar las vías de investigación, como de excluir después a los que no se hubieren encuadrado en su rígido marco departamental.

¿Es menos relevante una investigación realizada *en libertad*, fuera de la estructura "oficial"? La ratio entre investigaciones oficiales e investigaciones libres de doctorandos marcha *in crescendo* por la disminución de trabajo y el aumento desaforado de nuevos profesionales, a la par que los accesos a departamentos y becas se realizan, cuando menos, en vías opacas o de muy sutil transparencia. Las investigaciones son cada vez -tanto en número como en calidad- más libres que oficiales, pero los trabajos redactados como *corpus investigado* son tan *relevantes* como la más oficial de las líneas de investigación. El autoabastecimiento universitario en las categorías más altas de la investigación -no digamos en las medias, ahora autodenominadas superiores- está provocando la generación de todo un universo metauiversitario de egresados que, lejos de aumentar el prestigio de las universidades, ven en ellas un trámite profesional cuya única vía de valoración es el alejamiento. Así lo ha entendido el mercado laboral y la alta dirección. Y, ante esta realidad, los jóvenes investigadores,

apasionados de sus disciplinas, seguiremos investigando, cada uno en su libertad, debiendo acometer las actividades más variadas, pero, eso sí, sin deber nuestros logros a nadie, más que a nosotros mismos.

7 Referencias

1. Baudrillard, J.; El sistema de objetos. Ed. Siglo XXI, 2012. Capt 3, 89-94
2. Jarauta, F.; Pensar el presente. Ed. Círculo de Bellas Artes, 1989. Presente, 11-15
3. Bürger, P.; Crítica de la Estética Idealista. Ed. La Balsa de la Medusa, 1983. Actividad del Genio, 4, 141-156
4. Pérez García, S.; Diagrama, Arquitectura y Política. Ed. Mairia, 2011. Contextualización (III) 49-56
5. Simmel, G.; El Individuo y la Libertad. Ed. Península, 2001. P&P (IV) 45-54
6. Ludevid y Anglada, J.; Alegaciones del CSCAE al consejo de Estado, sobre el Anteproyecto de Ley de Colegios y Servicios Profesionales. Madrid, 2014. R-1, B 8-9
7. Blanchar, C.; Los Colegios profesionales, en alerta ante la desregulación de los grados europeos. El País, Enero 2013.
8. De Prada Poole, J.M.; La Investigación en el Proyecto. Recomendaciones para Doctorado y Tesis. Ed Mairia, 2004. 2.1 Figura del Investigador; 5.2 Metodología. 22-25, 37-52

CO-99 Nanopartículas de Poli (ϵ -caprolactona) portadoras de 5-Fluorouracilo para mejorar el tratamiento del cáncer de colon avanzado

Cabeza Montilla, Laura. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Universidad de Granada, España lautea@correo.ugr.es

Leiva Arrabal, María del Carmen. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Universidad de Granada, España calea88@msn.com

Carrasco Pardo, Esther. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Universidad de Granada, España esthercp@ugr.es

Rodríguez Serrano, Fernando. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España fernrs@ugr.es

Ortiz Quesada, Raúl. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén, España rortiz@ujaen.es

Arias Mediano, Jose Luis. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada, España, jlarias@ugr.es

Ruiz Martínez, Adolfinia. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada, España, adolfinia@ugr.es

Prados Salazar, Jose Carlos. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, España jcprados@ugr.es

Resumen

El fármaco más usado en los tratamientos de quimioterapia actuales contra el cáncer de colon es el 5-Fluorouracilo (5-Fu) en combinación con otros fármacos como el Irinotecán y el Oxiplatino. Este tratamiento no es totalmente efectivo, especialmente en estadios avanzados de la enfermedad, debido a la falta de especificidad del 5-Fu, su rápida metabolización y la existencia de células resistentes a fármacos. La nanotecnología, concretamente el uso de nanopartículas poliméricas como portadoras de fármacos, es una nueva estrategia para mejorar el tratamiento del cáncer. En este estudio mostramos la síntesis y caracterización de nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) portadoras de 5-Fu (PCL-5-Fu) y su aplicación en el tratamiento del cáncer de colon mediante estudios en modelos in vitro e in vivo. Usando nanopartículas de PCL-5-Fu hemos conseguido una mayor inhibición del crecimiento celular respecto al 5-Fu en líneas celulares de cáncer de colon de entre un 27,5% en HT-29 y un 76,2% en MC-38. Los estudios in vivo con ratones, mostraron una mayor reducción del volumen tumoral con PCL-5-Fu vs 5-Fu, de hasta un 64,4%. El tratamiento con PCL-5-Fu mejoró significativamente la probabilidad de supervivencia de los ratones en comparación con el fármaco solo. Por otra parte, la evolución de los pesos de los ratones a lo largo del tiempo reveló una reducción de la pérdida de peso, lo que podría significar una reducción en la toxicidad sistémica del 5-Fu. Los resultados obtenidos en este estudio con nanopartículas de PCL-5-Fu hacen de éstas un prometedor tratamiento del cáncer de colon avanzado.

Palabras Clave

Cáncer de colon, 5-Fluorouracilo, poli(ϵ -caprolactona), nanopartículas, liberación de fármacos.

1 Introduction

En los últimos años se ha fomentado la investigación de la nanotecnología aplicada a la biomedicina debido al inmenso abanico de posibilidades que proporcionan estos nuevos nanomateriales. Una de estas aplicaciones es el desarrollo de polímeros biodegradables y biocompatibles como sistemas de transporte y liberación de fármacos, proteínas, ácidos nucleicos, fluorocromos, etc. para mejorar el tratamiento y diagnóstico de ciertas enfermedades como el cáncer (*American Cancer Society, 2011*). La nanotecnología nos proporciona una nueva herramienta para solventar muchos de los problemas que presentan los tratamientos quimioterápicos actuales, en nuestro caso concretamente el 5-Fluorouracilo (5-Fu) que es el fármaco de elección para tratar el cáncer de colon, uno de los tres tipos de cáncer más frecuentes y que suele administrarse en combinación con otros fármacos como el Irinotecán y el Oxiplatino (*Ferguson and Orlando, 2014*). Cuando se administra este fármaco a un paciente, gran parte es degradado rápidamente, con lo que llega menos cantidad de fármaco a los tejidos tumorales. El 5-Fu restante que consigue alcanzar el tumor debe actuar en células tumorales resistentes a fármacos que o bien expulsan el fármaco de la célula o inhiben su efecto citotóxico (*Guichard et al., 2005*). Además el tratamiento es muy poco efectivo en estadios avanzados de la enfermedad, cuando existe metástasis (*Ma et al., 2013*).

En este trabajo queremos determinar si las nanopartículas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) que vehiculizan 5-Fu (PCL-5-Fu) son una buena estrategia para mejorar y potenciar el efecto del fármaco en el tratamiento del cáncer de colon avanzado y descubrir cuales son los puntos claves de esta mejora.

2 Materials and Methods

En las pruebas *in vitro*, fueron testadas las nanopartículas de PCL sin fármaco, 5-Fu y PCL-5-Fu a concentraciones crecientes de fármaco (desde 0,01 μ M a 20 μ M según la línea celular) durante 72 horas, sobre líneas de cáncer de colon humanas (T84, HT-29, RKO, SW480 y HCT-15), una línea humana de colon no tumoral (CCD-18) (American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)) y una línea de cáncer de colon de ratón (MC38) cedida por Dr. J. Schlom (Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) Las nanopartículas fueron sintetizadas por el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada (España). Los experimentos se realizaron por triplicado sembrando 8000 células por pocillo en placas de 24 pocillos y fueron analizadas mediante el ensayo colorimétrico de la sulforrodamina B, determinando la concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀) de los distintos tratamientos.

Para las pruebas *in vivo* se indujeron tumores subcutáneos inyectando 500.000 células MC38 (200 μ l) en el flanco trasero derecho de 40 ratones C57BL/6. Una vez que los tumores fueron palpables, se dividieron en 4 grupos a los que se les administró un tratamiento diferente de PCL-5-Fu, 5-Fu, PLC cada tres días, hasta un total de cinco dosis. El grupo control no recibió tratamiento. Así mismo, cada tres días, se evaluó el estado general de los ratones, se pesaron y se tomaron medidas de los tumores con un calibre. El volumen del tumor fue calculado con la siguiente fórmula $V = (a \times b^2)\pi/6$, siendo "a" la longitud mayor del tumor y "b" la de menor tamaño. Tras 45 días, todos los ratones fueron sacrificados. Este estudio con ratones, fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Granada y sigue las directrices de la Directiva del Consejo Europeo 86/609/EEC.

La diferencia entre las medias de muestras independiente se realizó mediante el test de T-Student ($\alpha = 0.05$) y las curvas de supervivencia, así como la comparación en cuanto a supervivencia entre los diferentes grupos de tratamientos, se realizó mediante el método de Kaplan Meier y el análisis de log-rank respectivamente ($\alpha = 0.05$). El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el programa "Statistical Package for the Social Sciences" v.15.0 (SPSS).

3 Results

No se observaron diferencias significativas entre las células tratadas con las nanopartículas de PCL sin fármaco y el grupo control en la mayoría de las concentraciones ($p > 0,05$). Además, el tratamiento con las nanopartículas cargadas con fármaco produjo un aumento significativo de la inhibición del crecimiento celular en todas las líneas testadas ($p < 0,05$), de entre un 27,5% en HT-29 a una concentración de 1 μM hasta un 76,2% en MC-38 a una concentración de 0,03 μM . Esto se refleja en una considerable reducción de la IC_{50} del 5-Fu (Tabla 1) que puede llegar hasta 45 veces en la línea T84, y hasta 10,3 veces en la línea HCT-15.

Table 1. Valores de IC_{50} para diferentes líneas celulares tumorales y no tumorales, con tratamientos con 5-Fu y PCL-5-Fu. La última columna representa las veces que el tratamiento con PCL-5-FU consigue disminuir la IC_{50} del fármaco.

Línea celular	IC_{50} 5-Fu	IC_{50} PCL-5-Fu	Veces que NP disminuye IC_{50}
T84	3.6	0.08	45
HT-29	3.58	0.76	4,7
HCT-15	7.59	0.74	10,3
RKO	4,09	0,22	18,6
SW480	3,74	0,09	41,6
CCD-18	11.91	2.7	4,4
MC38	0.068	0.018	3,8

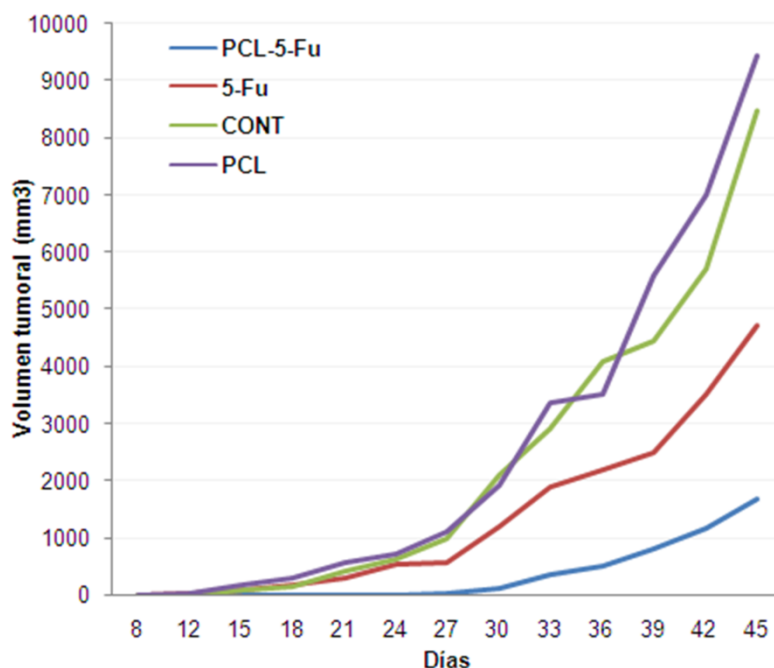


Figure 1. Reducción del volumen de tumores sólidos subcutáneos con el tratamiento con PCL-5-Fu en comparación con 5-Fu solo, PCL y el grupo control.

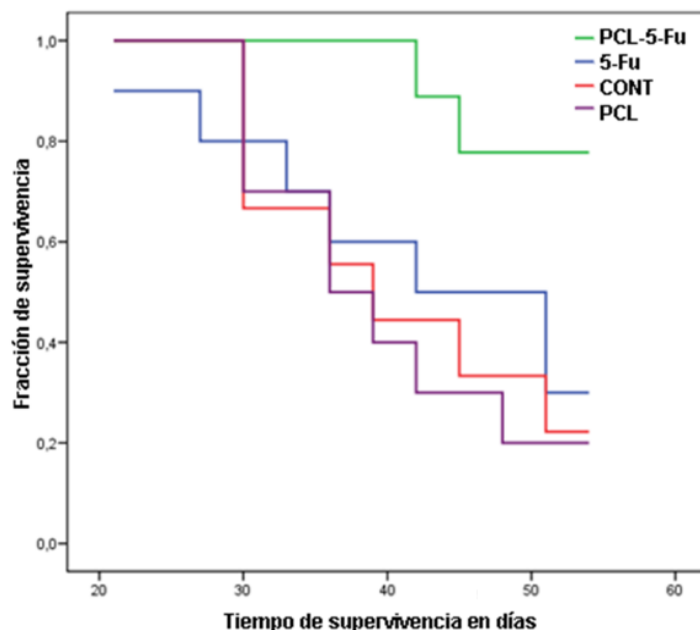


Figure 2. Curva de supervivencia calculada mediante el método de Kaplan Meier de ratones con tumores subcutáneos inducidos y tratados con PCL-5-Fu, 5-Fu y PCL.

En el modelo *in vivo* de tumor sólido subcutáneo el tratamiento con PCL-5-Fu produjo una reducción significativa ($p < 0,05$) del volumen tumoral en comparación con el fármaco sólo desde el día 27, siendo 2,8 veces más pequeño en los ratones tratados con nanopartículas (Figura 1). Estos resultados concuerdan con los obtenidos respecto a la supervivencia, donde como podemos observar en la figura 2, la supervivencia con el tratamiento de PCL-5-Fu fue del 90%, mientras que con el tratamiento de 5-Fu fue del 30%. Además el test de log-rank indicó que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la supervivencia de los ratones con los tratamientos e PCL-5-Fu y 5-Fu.

Los datos de los pesos de los ratones reflejaron la existencia de diferencias significativas entre el tratamiento con 5-Fu y el tratamiento con PCL-5-Fu a lo largo de todo el experimento, excepto en el día 45 ($p > 0,05$). Respecto a la nanopartícula sola, no aparecen diferencias significativas con el control a lo largo de todo el experimento.

4 Discussion

Según los resultados obtenidos, las nanopartículas de PCL no fueron tóxicas en ninguna línea celular testada. Respecto al tratamiento con PCL-5-Fu, la nanopartícula consigue mejorar considerablemente el efecto antitumoral del 5-Fu, incluso en la línea HCT-15 que sobreexpresa p-glicoproteína, uno de los transportadores de membrana implicados en el fenómeno de resistencia a fármacos más importante (Navalakhe and Nandedkar *et al.*, 2007). La importancia de la reducción de la IC_{50} del fármaco radica en la posibilidad de administrar una menor dosis de fármaco a los pacientes, lo que permitiría una reducción de los efectos secundarios producidos por la quimioterapia (Wang *et al.*, 2012).

Respecto a los resultados *in vivo*, se observó una mayor reducción del volumen tumoral con el tratamiento con el fármaco transportado en la nanopartícula de PCL. Esto puede deberse a las propias propiedades físico-químicas y a la estructura anormal de los vasos sanguíneos de los tejidos tumorales que favorecen una mayor acumulación y extravasación de macromoléculas en el sitio del tumor, lo que se conoce como el efecto de permeabilidad y retención aumentadas o "EPR effect" (Owens and Peppas *et al.*, 2006; Singh and Lillard *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2012). Este hecho hace que la nanopartícula se concentre más en el sitio

del tumor, liberando así mayor cantidad de fármaco en el sitio diana y evitando que el fármaco actúe en otros tejidos, lo que podría explicar la mayor probabilidad de supervivencia que presentan los ratones tratados con PLC-5-Fu, respecto al 5-Fu. Por otra parte un recubrimiento de la nanopartícula con polietilenglicol (PEG), hace que ésta no sea detectada como un elemento extraño por el sistema inmune y permite un aumento del tiempo que puede permanecer en el torrente sanguíneo (*Van Cutsem et al., 2009*). Asimismo, se observó una mayor supervivencia en ratones tratados con PCL-5-Fu, además de una diferencia respecto al 5-Fu en la evolución de los pesos de los ratones a lo largo del tiempo, que la nanopartícula tampoco presenta toxicidad *in vivo*.

5 Conclusions

Las nanopartículas de PCL-5-Fu pueden ser una herramienta útil y segura para mejorar el tratamiento de cáncer de colon avanzado debido a su baja toxicidad y a su alto poder antitumoral, que podría permitir una reducción de la dosis de fármaco administrado, haciendo más leves los efectos secundarios de la quimioterapia y mejorando así la calidad de vida del paciente.

6 References

1. American Cancer Society. Colorectal cancer facts & figures 2011-2013. Atlanta: American Cancer Society. 2011.
2. Ferguson, J.E., and Orlando, R.A. Curcumin reduces cytotoxicity of 5-Fluorouracil treatment in human breast cancer cells. *Journal of Medicinal Food*. 2014; doi:10.1089/jmf.2013.0086.
3. Guichard, S.M.; Macpherson, J.S.; Thurston, D.E., and Jodrell, D.I. Influence of P-glycoprotein expression on in vitro cytotoxicity and in vivo antitumour activity of the novel pyrrolobenzodiazepine dimer SJG-136. *European Journal of Cancer*. 2005; 41(12):1811-1818.
4. Ma, N.; Ma, C.; Li, C.; Wang, T.; Tang, Y.; Wang, H.; Moul, X.; Chen, Z., and Hel, N. Influence of nanoparticle shape, size, and surface functionalization on cellular uptake. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2013; 13(10):6485-6498.
5. Navalakhe, R.M., and Nandedkar, T.D. Application of nanotechnology in biomedicine. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2007; 45(2):160-165.
6. Owens, D.E., and Peppas, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006; 307(1):93-102.
7. Singh, R., and Lillard, J.W.Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*. 2009; 86(3):215-223.
8. Song, M.; Zang, W.; Zhang, B.; Cao, J., and Yang, G. GCS overexpression is associated with multidrug resistance of human HCT-8 colon cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2012; 31.
9. Van Cutsem, E.; Köhne, C.H.; Hitre, E.; Zaluski, J.; Chang Chien, C.R.; Makhson, A.; D'Haens, G.; Pintér, T.; Lim, R.; Bodoky, G.; Roh, J.K.; Folprecht, G.; Ruff, P.; Stroh, C.; Tejpar, S.; Schlichting, M.; Nippgen, J., and Rougier, P. Cetuximab and

chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2009; 360(14):1408-1417.

10. Wang, Y.; Wang, C.; Gong, C.; Wang, Y.; Guo, G.; Luo, F., and Qian, Z. Polysorbate 80 coated poly (ϵ -caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly (ϵ -caprolactone) micelles for paclitaxel delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012; 434(1-2):1-8.

CO-104 EVALUATION OF WATER QUALITY OF TAFNA RIVER

S.Benmostefa(1)* , N.Dali-youcef(2) , M .Hadjel(1) , M.Kouidri(2)

(1) Laboratory of Science, Technology and Process Engineering - LSTGP.

University of Science and Technology of Oran - Algeria USTO-MB.

(2) Laboratory valuation of human actions for environmental protection and application in public health.

Dysfunction of marine and brackish areas

University Aboubekr Belkaid - Tlemcen Algeria.

benmostafa.soumia@gmail.com

Abstract

Under pressure from significant needs due to population growth and living standards, there has been the use of spring water and ground water to use more water pressure of surface.

Surface waters are subject to many fluctuations and therefore managers are often faced with problems of pollution peaks. To this end, we present in this study the results of an exploration of the analysis of the quality of surface water in the Tafna river series (Remchi to the estuary of Rachgoune) .

This study concerns the analysis of physico- chemical parameters (T° air temp of water, pH, electrical conductivity, salinity, TDS, nitrate) and chemical parameters (copper, manganese, iron, nickel, zinc, chromium VI) along the downstream Tafna to highlight the influence of physicochemical parameters on the metal contamination of the river. Thus, water samples were conducted at five research stations during the winter and the water flow was important following major floods.

The results show that certain parameters exceed accepted standards for water for irrigation.

Keywords

heavy metals, TAFNA river, physicochemical parameter, winter.

1 INTRODUCTION

Renewable freshwater is an essential resource for life. It deserves special attention, since it is very weathered and seriously threatened by human activities. Indeed, population growth accompanied by rapid urbanization causes many disturbances to the natural environment [3], industrialization, inefficient use of fertilizers and pesticides and lack of awareness towards protecting the environment, especially lead to an imbalance of the ecosystem and generate pollutants that can affect the physicochemical and biological quality of receiving water bodies [4]

River Tafna is considered the water tower across the Northwest region of Algeria. Several dams have been made, but the quality of the surface water continues to deteriorate in recent decades it crosses Tlemcen and Ain Témouchent before emptying into the Mediterranean [1]

2 MATERIALS AND METHODS

A. Study Area

Regions of Tlemcen and Ain Témouchent are under the influence of the Mediterranean climate which depends on air currents powered by the movement of the Azores, which creates a cold and wet short period in winter and early spring and a hot, dry long period , summer and fall [5]

Tafna is one of the major rivers in northwestern Algeria, having a length of 170 km and a basin of about 7245 km² surface [6], it has its source in Jebel Merchiche in the Mountains Tlemcen near Sebdou at 1600 meters altitude. Its course stretches in Tlemcen, and after crossing the winding gorges, enters of Ain Témouchent, through the ancient city of Siga, and

flows into the Mediterranean, opposite the island of Rachgoun [7] the course of the river can be divided into three parts: the upper Tafna the average Tafna and low Tafna.

Five stations were selected on the TAFNA.

These sampling points are downstream in the winter period:

S1: ISSER located.

S2: located in Stone Chat (Fatmi larbi).

S3: upstream of the city Amir Abdelkader.

S4: Siga located.

S5: located Rachegoune (estuary)

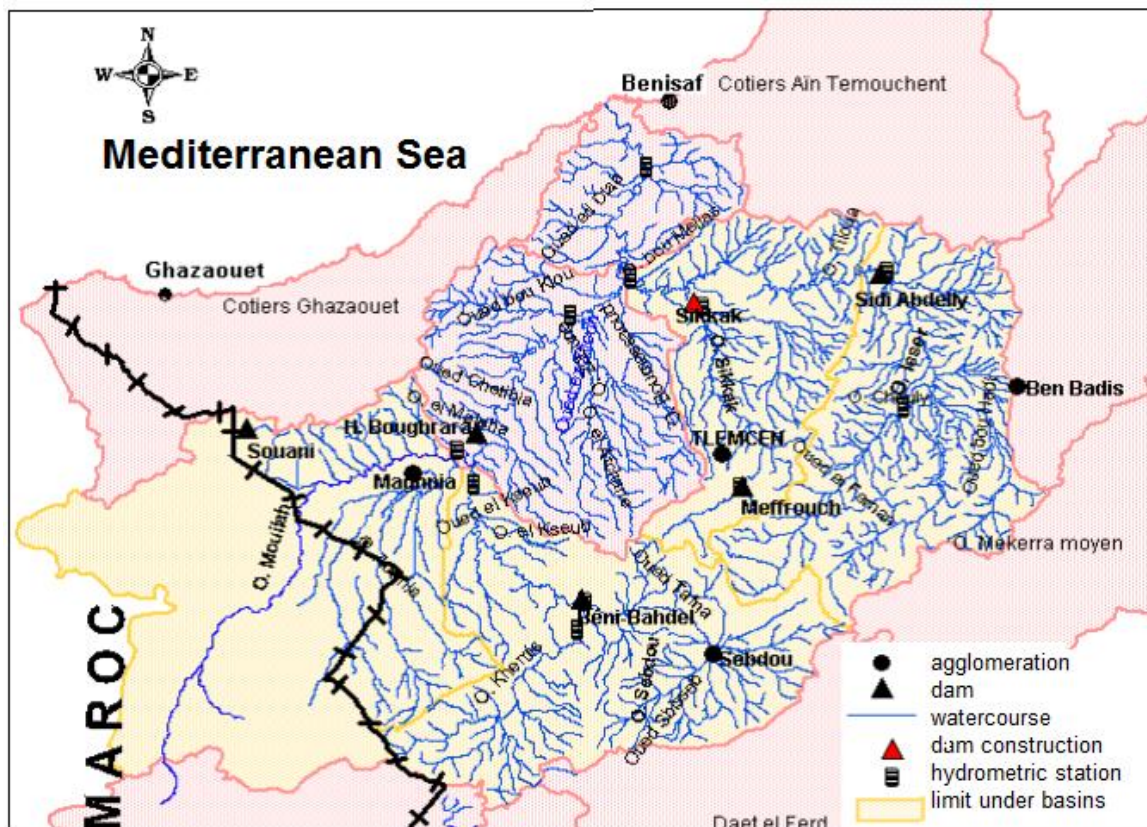


Fig1: Hydrographic Network Tafna

B. Sampling and Analysis

Monthly sampling was conducted during the period "in December 2012 - February 2013." For physicochemical analysis, the water extraction is carried out in 1.5 L bottles, from the most used in irrigation research stations. The study focused on the in situ measurement of the temperature of the water and the area (with a thermometer), pH, conductivity, salinity and salinity (a multi cell parameter) and measurement of heavy metals (iron, manganese, chromium VI, Zinc, Copper and Nickel) by a spectrophotometer.

3 RESULTS AND DISCUSSION

A-Water and air temperature

The water temperature is an environmental factor that causes significant ecological repercussions. [8] It acts on the density, the viscosity, the solubility of gases in water, the sep-

aration of dissolved salts , as well as chemical and biochemical reactions , the development and growth of organisms in the water and particularly the microorganisms [9] .

The air temperature has values between 12 ° C and 19 ° C, with an average of 15.5 for the month of December, 14.75 for the month of January and February. There is not much difference between the temperature and water area , it has values between 12.5 ° C and 14.5 ° C , average 13.5 ° C for three months.

The analysis of the average values of the temperature of the water at the river showed no significant differences between the study sites.

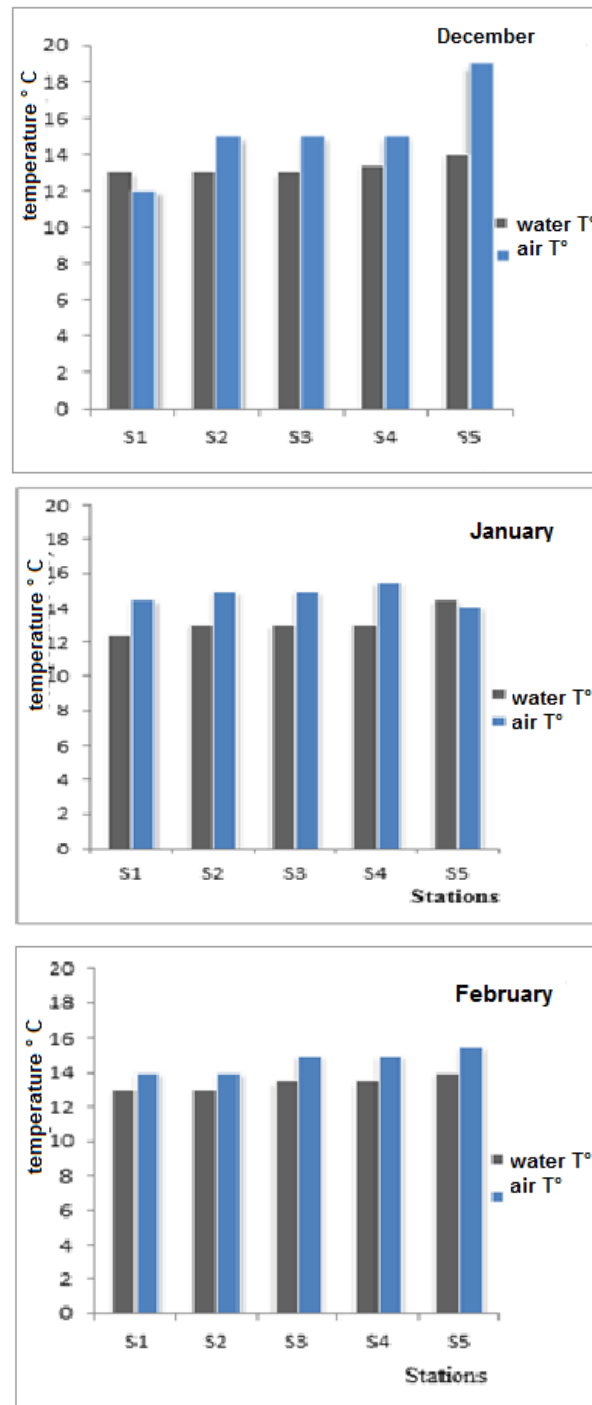


Fig2: Spatial Variation of temperature

B- Potential hydrogen or pH

The pH is important chemical parameters when determining the quality of water, the pH measurement of the water concentration of the protons H^+ in the water. It summarizes the stability of the balance between different forms carbonic acid and is linked to the buffer system developed by carbonates and bicarbonates. Significant changes in pH are almost always the result of industrial discharges. [10]

The pH ranges from 7.5 in the S5 station (February 2013) and 9.2 in the S3 station (January 2013) The change in pH between two stations do not generally exceed one unit of pH and the curves is variable and does not follow a regular law.

pH tends to decrease from upstream (S1) to the estuary to reach its minimum value in the S5 station (Rachgoune) for the winter period.

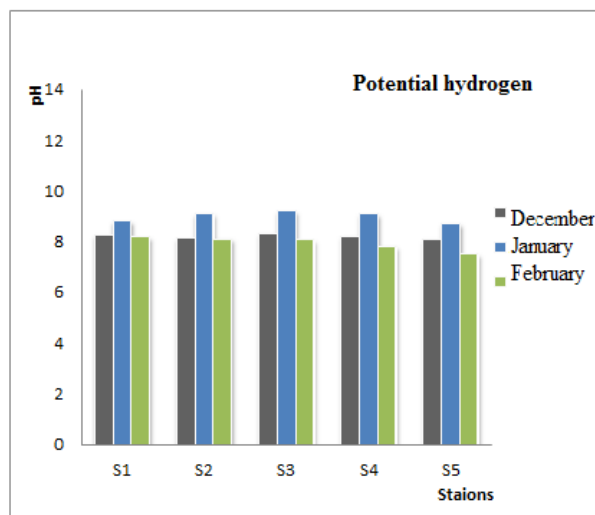


Fig3: Spatiotemporal Variation of pH values (winter)

C-Electrical Conductivity

Conductivity is the ability of water to conduct electricity. It depends on the ion concentration (atoms or groups of atoms with a non-zero electrical charge) and temperature.

The average values show variations helpless. They fluctuate between 1317 μ s/cm to station S4 in January and 2,720 microseconds / cm at S5 station in December. The spatial evolution of the conductivity reveals highest concentrations in the S5 station (Rachgoune) of the river.

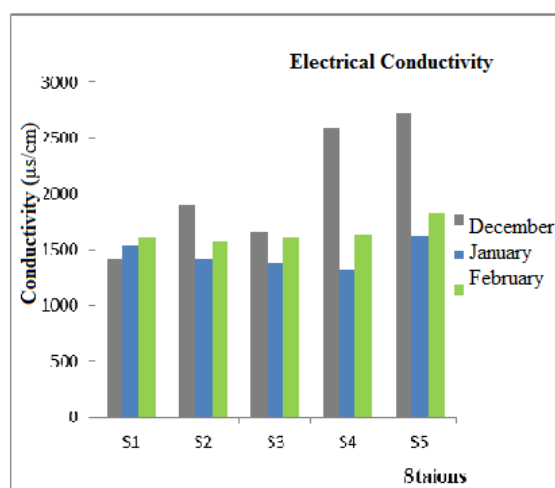


Fig 4: Spatiotemporal Variation of electrical conductivity values (winter).

D-Salinity

Salinity is the amount of dissolved salts in a liquid, especially water, which is a strong solvent for many minerals.

The main salts responsible for water salinity are salts of calcium (Ca^{2+}), magnesium (Mg^{2+}), sodium (Na^+), chloride (Cl^-), sulfate (SO_4^{2-}) and bicarbonate (HCO_3^-).

The salinity of the studied section of the river varies between 701 ppm and 1350 ppm as extreme monthly values (minimum and maximum) recorded respectively in S1 and S5 in December. The shape of the spatial and monthly changes in the salinity of waters analyzed reminiscent of conductivity, it reveals its maximum value at the station S5 (Rachgoune) of the river.

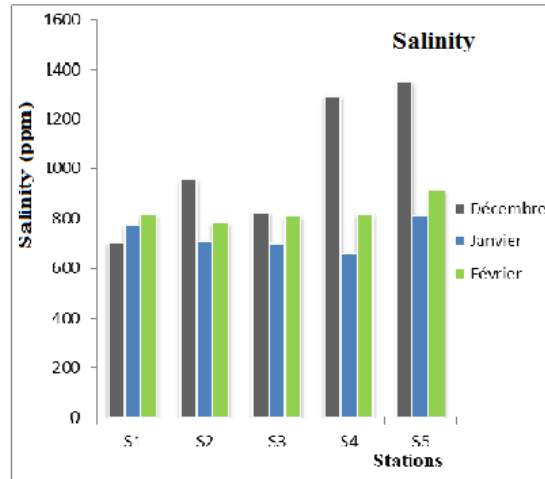


Fig 4: spatio-temporal variation of salinity (winter).

E. Heavy Metals

Unlike most organic contaminants, heavy metals are natural constituents in rocks and mineral deposits. Thus, these elements are normally present at low levels (to trace, less than 0.1%) in soils, sediments, surface waters and organisms. These low concentrations of heavy metals represent the geochemical background of a certain environment.

parameter	units	limits
Iron	mg/l	0,3
Manganese	µg /l	50
Total chromium	µg /l	50
copper	mg/l	2
Nickel	µg /l	70
Zinc	mg/l	5

Table 1: Parameters with quality limit values of water for human consumption

• Iron

Iron is a chemical element with the symbol Fe and atomic number 26. The core of the iron atom 56 is the most stable of all chemical elements isotope, because it has the binding energy per nucleon highest.

Iron is a nutrient found in foods, because this element is essential to humans (and other organisms), particularly in the composition of blood hemoglobin that allows red blood cell attachment and transport oxygen in the human body. However, the World Health Organization recommends not to exceed 0.3 g / l, because it is not good for the digestive system.

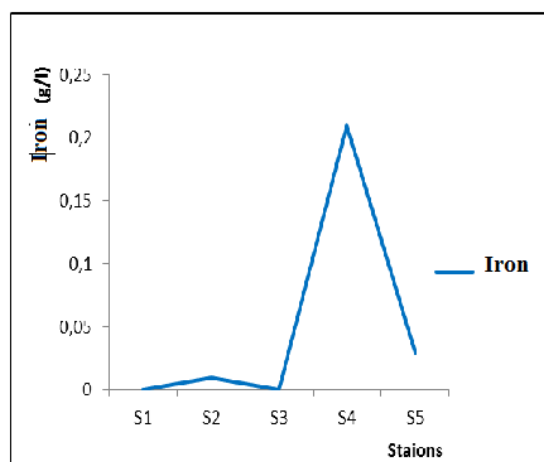


Fig5: Spatio-temporal Variation of iron content

Based on the values recorded, a lack of iron in the station S1 and S3 and a maximum value of 0.2 mg / l are marked.

In the station S4. Any time these values remain below the limit described in the Algerian official journal (0.3 mg / l).

• Manganese

Manganese is a chemical element with the symbol Mn and atomic number 25. Manganese is a metal gray-white transition which resembles iron. It is a hard and brittle metal, it melts easily, but it is easily oxidized. Manganese is not ferromagnetic, after a specific treatment.

Excess Mn in water can cause cirrhosis of the liver in humans. However inhalation is much more dangerous because it generates pneumonia, and if exposure is chronic it can cause neurological problems.

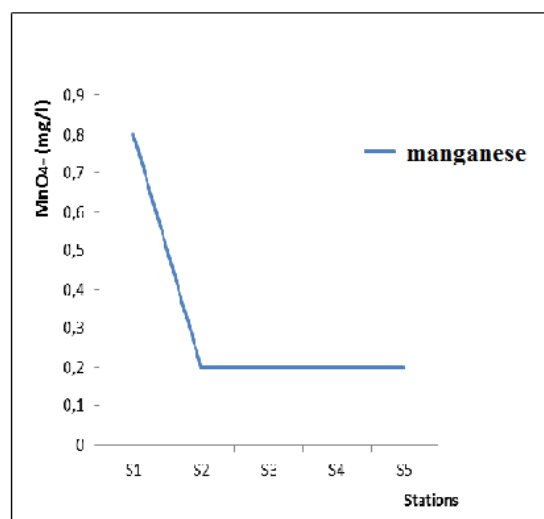


Fig 6: Spatio-temporal Variation of Manganese contents

A maximum value of 0.8 mg / l is marked. This value is slightly greater than the recommended in the official national newspaper (0.05 mg / l) limit.

• Copper

Copper is a chemical element with the symbol Cu and atomic number 29. Metal reddish color, it has a high thermal and electrical conductivity at room temperature, the only pure metal having a better electrical conductivity is money.

Copper is one of the few metals that are in the native state. The occurrence of native copper, however, is quite low.

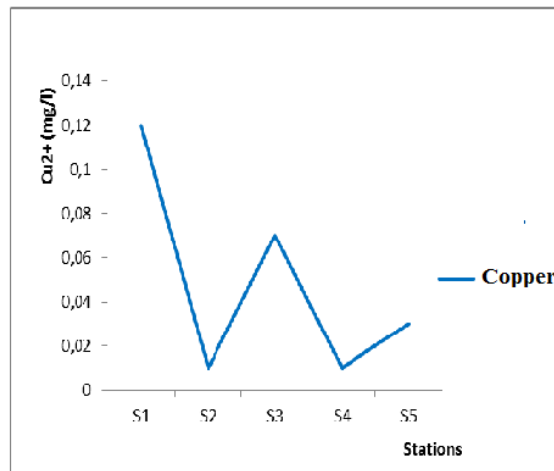


Fig7: spatio-temporal variation of copper content

The recorded values ranged from 0.01 mg / l (S2 and S4) to 0.12 mg / l (S1). These values are below the limit described in the Algerian official gazette (2 mg / l).

• Nickel

Nickel is a chemical element with the symbol Ni and atomic number 28.

The etymology of the word comes from the Swedish koppernickel, which means "false copper" and German kupfernickel for "copper of the devil."

These names come from the inability to extract copper from what was believed at the time of copper ore, it was believed that the "copper ore" suffered a spell of demons. In fact, the error was that people confused the copper ore with that of nickel element is a clean, distinct copper.

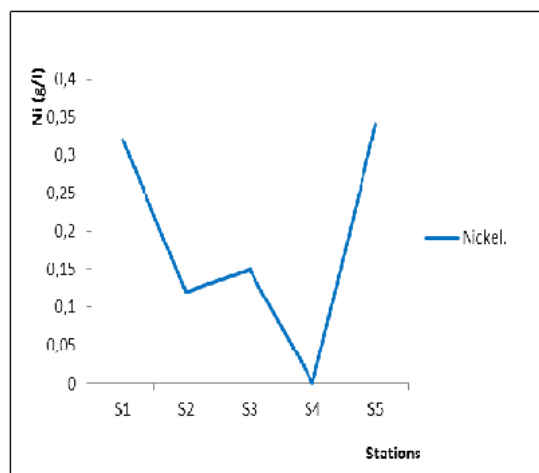


Fig 8: spatio-temporal variation of the chromium

The recorded values are between 0.1 mg/l (S2) and 0.35 mg / l (S5). These values are slightly higher than the limit described in the Algerian official journal (0.07 mg / l). In addition, a total absence of nickel in S4 is marked.

• Zinc

Zinc is a chemical element with the symbol Zn and atomic number 30. Zinc is a metal reagent medium, which combines with the oxygen and other non-metals, and which reacts with dilute acid to produce hydrogen. Natural sources of zinc into the environment is altered the rocks (56%), the volcanism (22%) and vegetation [12].

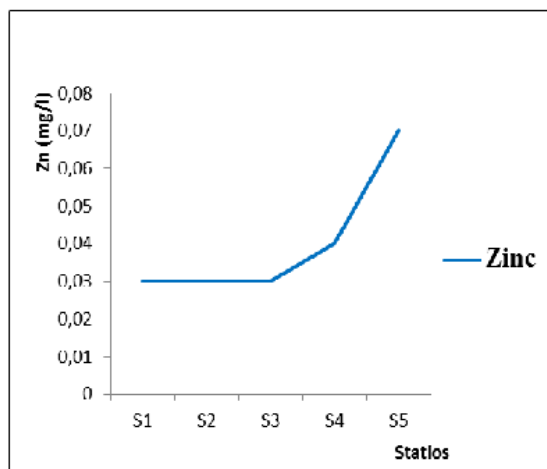


Fig9: spatio-temporal variation of zinc content

The recorded values are well below the limit recommended by the Algerian official journal (5 mg / l).

• Chrome

Chromium is one of the transition metal series. It is a hard metal, a steel-silver gray color. It resists corrosion and tarnishing.

The most common oxidation states of chromium are +2, +3, +6, +3 being the most stable. 4 and 5 are relatively rare. The compounds of chromium +6 oxidation state (hexavalent chromium) such as pyridinium chlorochromate are potent oxidants. Chromium in its +2 oxidation state is a reducer.

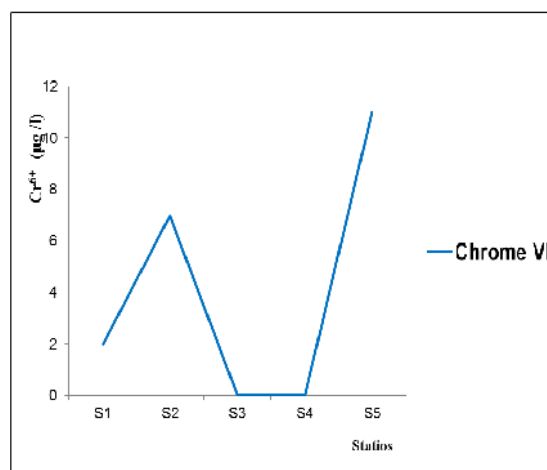


Fig 10: spatio-temporal variation of the chromium

The recorded values range from a minimum of 0.002 mg / l (S1) and a maximum of 0.012 mg / l (S5), with a lack for the stations S3 and S4.

Note that the maximum value exceeds the limit recommended by the Algerian official journal (0.05 mg / l).

4 CONCLUSION

The present study provides evidence for the characterization of river waters Tafna.

The results show that the waters of the river are fairly degraded quality with some heterogeneity in their metal concentration. Metal pollution is generated by various industrial and agricultural activities developed in the region and have an impact on the sustainability and health of the natural environment. Furthermore, in the downstream, there was a fluctuation of Ni and Mg respectively recorded in the station S1 and S5. The river in question is influenced by discharges of the town.

5 REFERENCES

- [1] A.E.B. Tidjani , D.Yebdri1, J.C. Roth , Z. Derriche.
Exploration of time-series analysis of the quality of surface waters in the basin TAFNA (ALGÉRIE),
December 2005 Journal of Water Sciences 19(4) (2006) 315-324.
- [2] M. Makhoukh, M. Sbaa, A. Berrahou , M. VAN. Clooster.
Contribution to the physico-chemical study of superficial waters of Moulouya (maroc oriental) Larhyss Journal, ISSN 1112-3680, n° 09, Décembre 2011, pp. 149-169
- [3] Mc Kinney M.L. (2002).
Urbaization, biodiversity and conservation. Biosci., 52, 883-890.)
- [4] Mulliss R.M, Revitt D.M., Shutes R.B.E. (1997).
The impacts of discharges from two combined sewer overflows on the water quality of an urban watercourse.
Water Sci. Technol., 36, 195-199
- [5] N. Dali-youcef
Contribution to the study of metal contaminants in sediments of Tafna (ALGERIE) 2010
- [6] N. Dali-youcef, B. Ouddane, Z. Derriche,
Evaluation of metal contamination of surficial sediments Tafna (ALGERIE), J. Rech. Oc´eanogr. 27 (2002) 275–279.
- [7] Benamar Dahmani, Fatiha Hadji, Farouk Allal,
Water Treatment Watershed Tafna Acte du Congrès EuroMed 2002, Sharm El Sheikh, Sinai, Égypte (04/05/2002) 2003, vol. 152, no 1-3 (394 p.), éditeur Elsevier Amsterdam
- [8] Leynaud G. (1968).
Thermal pollution, influence of temperature on aquatic life.
B.T.I. Ministry of Agriculture, 224-881.).
- [9] (W.H.O. (1987).
Global pollution and health results of related environmental monitoring. Global Environment Monitoring system, WHO, UNEP.).
- [10] El Bliidi S., Fekhaoui M. (2003). Hydrology and tidal dynamics
- [11] Ela, Wendell P
Introduction to Environmental Engineering and Science, Prentice Hall, 3rd ed. 2007. ISBN 0-13-148193-2
- [12] (Lantzy et Mc Kenzie, 1979 ; Phelan *et al.*, 1982 ; Horowitz, 1985).

CO-115 Zinc Oxide-layered hydroxide used as delivery machine for phenoxyherbicides-based nanocomposites; nano mixed phases from 4-chloro- and 2,4-Dichloro phenoxy acetates).

Abbas Matrood .Bashi

College of applied medical sciences, University of Kerbala-Iraq

Abstract

The ZnO layered hydroxide play a major role in the drug release control. This role is not well understood. This paper investigates the physical properties of the nano composite (ZCDN) resulted from the intercalation of the mixed solution (4-Chloro- and 2, 4,-Dichlorophenoxyacetates-ZnO) via the sol-gel method. The mixed solution produced a Bi phase that coexists with ZnO layer hydroxide. Our results were supported by the X-RAY diffraction (XRD) and Scanning Electronic Microscopy (SEM). The in vitro release shows that the 4-Chloro Phenoxy Acetate (4CPA) has much longer release duration than the 2,4-DiChloro phenoxy acetates (24D). The total amount of phenoxy herbicides released from the nano composite interlayer into the sodium phosphate aqueous solution were 98 % (24D) and 76 % (4CPA). Release behavior of the phenoxy herbicides into the aqueous solution was conducted using pseudo-second order rate expression. This study suggests that Zinc Oxide layered hydroxide can be used as a carrier for a mixed active agents. The chemical structure of the intercalated moiety can be applied to tune the desired release profile of the beneficial agent.

Keywords:

Controlled release, Chloro phenoxy acetates, Zinc Oxide layered hydroxide, organic-inorganic hybrid nano composites

1 Introduction

The increasing use of the agrochemicals in agricultural practices is one of the main sources of water pollution. Pesticides are generally combined to other materials to produce formulated compounds. The latter must be optimized to reduce pesticide levels in the environment and provide precise delivery to the target [1-4]. It has been documented that some properties of ZnO greatly depend on their structural and morphological characters [5]. Thus, rationally controlling the morphology and architecture of (ZCDN) is expected to be effective in modifying their physical properties [6]. For this reason, controlled release formulations which allow much less pesticide to be used are developed. These formulations are generally obtained by encapsulation of the active compounds in a matrix [7]. Several natural and synthetic materials have been proposed as matrices to achieve controlled release formulation of pesticides, particularly clay minerals [8], layered double hydroxides [9] and layered metal hydroxides (LMH). The two latter materials were used as a hosts for anionic type pesticides. Organic-inorganic nano hybrids can be obtained when anionic pesticide species are introduced in the interlayer space of the LDH or LMH host structures this can be achieved directly during synthesis by co precipitation or by other well known methods, such as anionic exchange [10, 11]. In this particular case, the counter anions in the ZLHs are H₂O, nitrate, carbonate, etc. will be replaced by other guest anions resulting in a new hybrid host-guest type of materials. The release property of the guest anion can be tailor made depends to the synthesis methods, release agents, concentration and the affinity of the sacrificial anion towards the ZLH inorganic inter layers. This is useful in designing a controlled release formulation with a specific target property. Workers has been exploited for the preparation of various controlled release formulations of beneficial agents like Zinc-galleate [12], effect of polymer on Zinc layered [13]. other work have been exploited for the preparation of various controlled release formulations by using layered double hydroxide with a specific target property. Plant growth

regulators [14], biological materials [15], pharmaceutical products [16-18] due to higher stability of the biological materials in the LDH interlamellae compared to their counterparts.

Zinc Oxide Layered Hydroxides (ZLH) are 2D materials similar to that of Layered Double Hydroxides (LDH). Therefore, the intercalation of anions for both composites are of similar nature. In the ZLH, hydroxyl groups are replaced by other ions. Hence, ZLH becomes exchangeable due to the Zinc [1-4].

This paper addresses the synthesis and characterization of ZCDN nano composites with the emphasis on the controlled release. The chemical structure of 4CPA and 24D is very similar, but with slightly different functional group/s, 24D has two chlorine atoms attached to the position 2 and 4 of the benzene ring. but in the case of 4CPA one chlorine atom attached at position 4 of ring. The effect of substitution of chlorine atom at the different positions of the benzene ring resulting physicochemical properties of the nano composites, such as the rate and the maximum accumulated release.

2 Materials and Methods

ZnO commercial from ACrose, 2,4-chlorophenoxy acetic acid (24D) and 4-chlorophenoxy acetic acid (4CPA) from Merck, used without farther purification. (0.05 M (0.47gm) of CPA+ 0.1 M (1.1gm) of 24D, was dissolved in 50ml of 90% ethanol the previous solution added to 0.5 gm ZnO in a conical flask, under N₂ gas, stirring for two hours, aging at 70°C for 18 hours, cooling, centrifuged and washed four times with de ionized water, dry in oven at 70°C, grinding and send for further analyses

3 Characterizations

X-Ray powder diffraction patterns (PXRD) were obtained with a Shimadzu XRD-6000 powder diffractometer using ($\lambda=1.540562 \text{ \AA}$) at 40 kW and 30 mA, scan rate = 1 degrees/min.

Fourier transform infrared (FTIR) spectra were recorded by using spectrophotometer thermo Nicolet Ft-IR Nexus self supporting sample in the range of 4000-400 cm⁻¹. The CHNS analyzer, model CHNS-932(LECO) was used to determine the percentage of and 4CPA, and the TG/DTG were carried out with a Setaram TG-DSC-11 apparatus with fully programmable heating and cooling sequence sweep gas valve switching and data analysis. The surface morphology and bulk structure of the sample were observed by scanning electron microscope (SEM) model JOEL (JSM-6400).and TEM (Hitachi H-7100). The BET surface area of the solids was determined by a Micromeritics surface area and pore size analyzer (ASAP2000) using nitrogen gas adsorption-desorption technique at 77 K together with the BET equation.

3.1 Results and Discussion

3.1.1 X-Ray Diffractions

PXRD patterns of ZnO was highly crystalline and formed the characters 100, 002 and 101 reflections in the 2 θ range 30-43. Different PXRD patterns were observed for the ZCDN nano hybrids bi phases. Also well order well ordered layered structure of organic-inorganic hybrid nano composites of ZCDN could have been obtained, as was accomplished as shown by PXRD patterns in Fig.[1]. The diffraction patterns of (ZLH) show a new xrd diffractions at 25.6 and 19.2 \AA that can be attributed to the intercalation of mixed anions 24D and 4CPA with ZLH to form ZCDN nano composites. It is known that the expansion is attributed to spatial orientation of the guest anions into the interlayer spaces of the ZLH together with two dif-

ferent arrangements, their size are bigger than nitrate and/or H₂O molecules by the counter anions (24D and 4CPA). Resulted a bi phases, the diffractions of (d003), (d006), (d009) and (d0012) for the phase attributed to 24D are at 25.6, 12.9, 6.5 and 3.2 Å respectively. The second phase contributed to the existence of 4CPA anion. Their harmony of (d 003), (d 006), (d009), (d0012) are at 19.14, 9.7, 4.7 and 3.2 Å respectively. The existence of inter layer domains containing 24D and 4CPA. the presence of the two phases simultaneously may be attributed to the thermodynamic stability of a mixture constitute resulted from the mixing of two anions which is more stable than the mono phase of each anions.

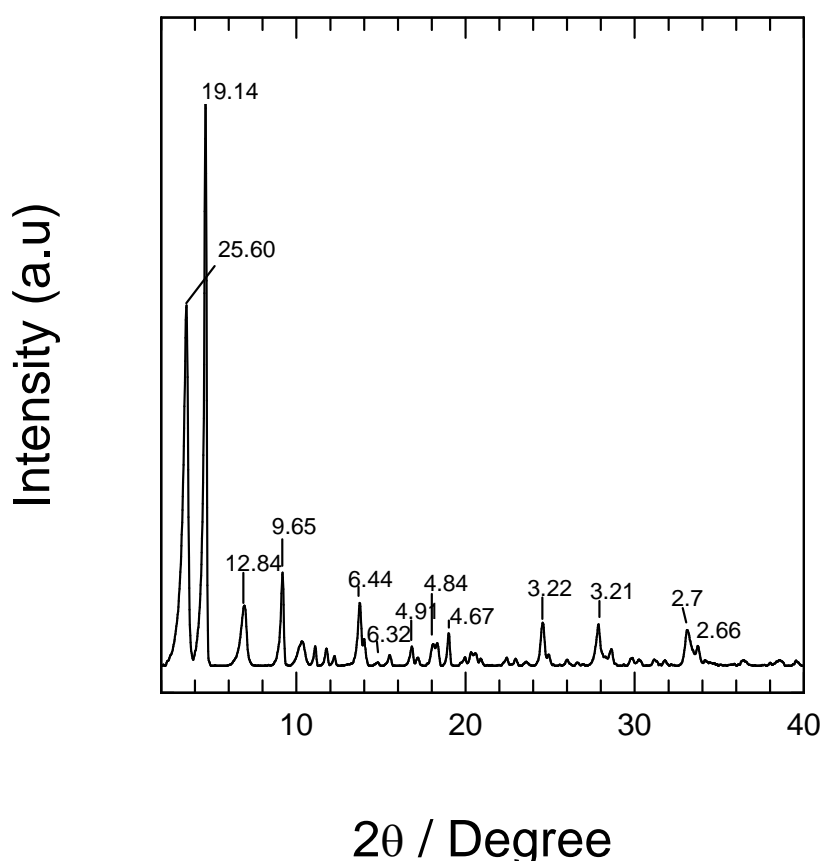
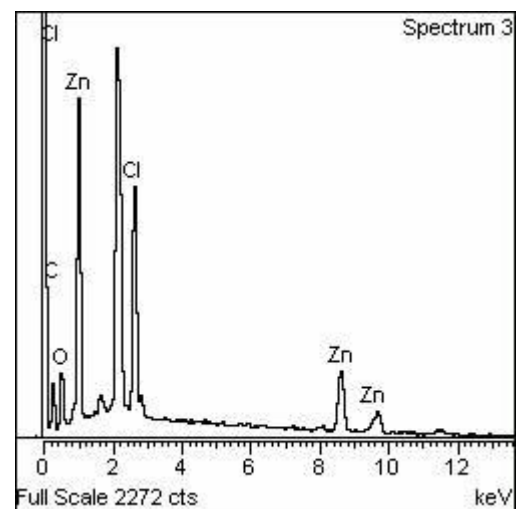
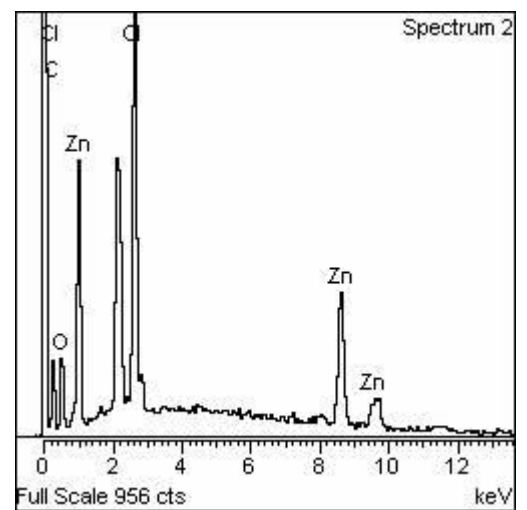
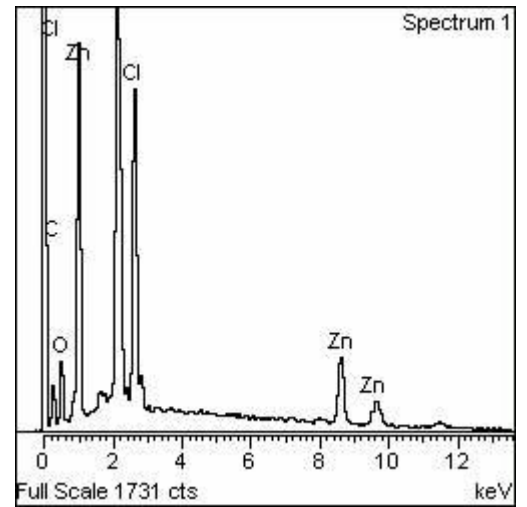
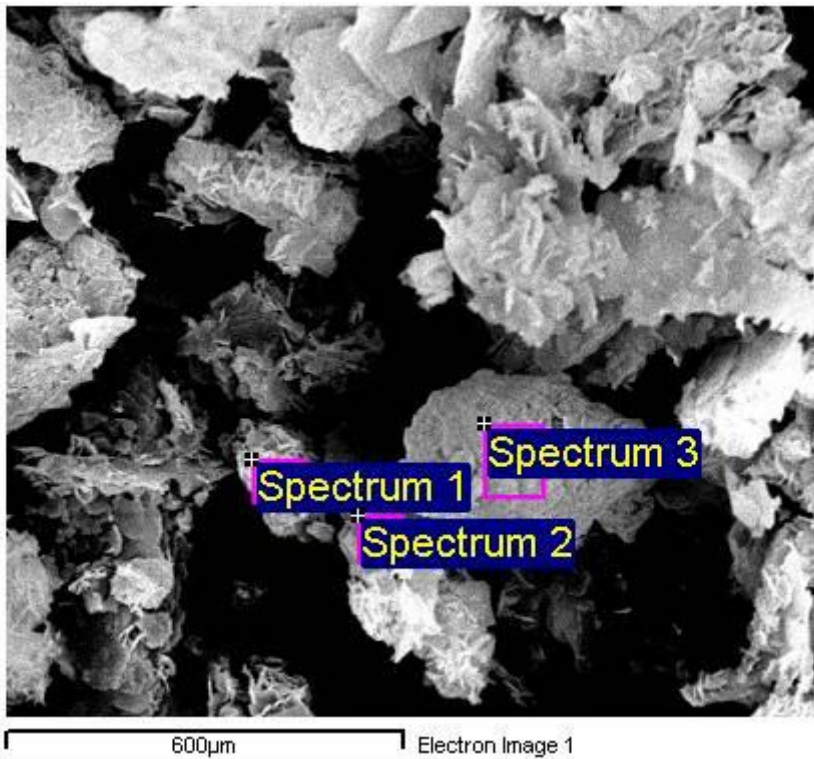


Fig.[1]. The diffraction patterns of zinc-layered hydroxide (ZLH) intercalated with mixed anions(24D and 4CPA) forming ZCDN, shows the 003,006,009 and 012 harmonies for bi phases.

3.1.2 SEM and TEM techniques.

The features of previous bi phases are shown on SEM images Fig [2a] with its EDX positions .This was done at three different positions, reflecting the identical mains constituents of the resulted different bi phases. in Fig[2b] SEM image shows a bulb like structures of the intercalated anions distributed on the layered surface of ZnO. Fig[2c] shows the (Transmission microscopy TEM) image of ZCDN hybrid nanostructures. As can be seen, numerous organic nano crystals of (24D and 4CPA) are homogenously deposited on the

Fig [2a] with its EDX, was done at three different positions, reflecting the identical main constituents of the resulted different bi phases.



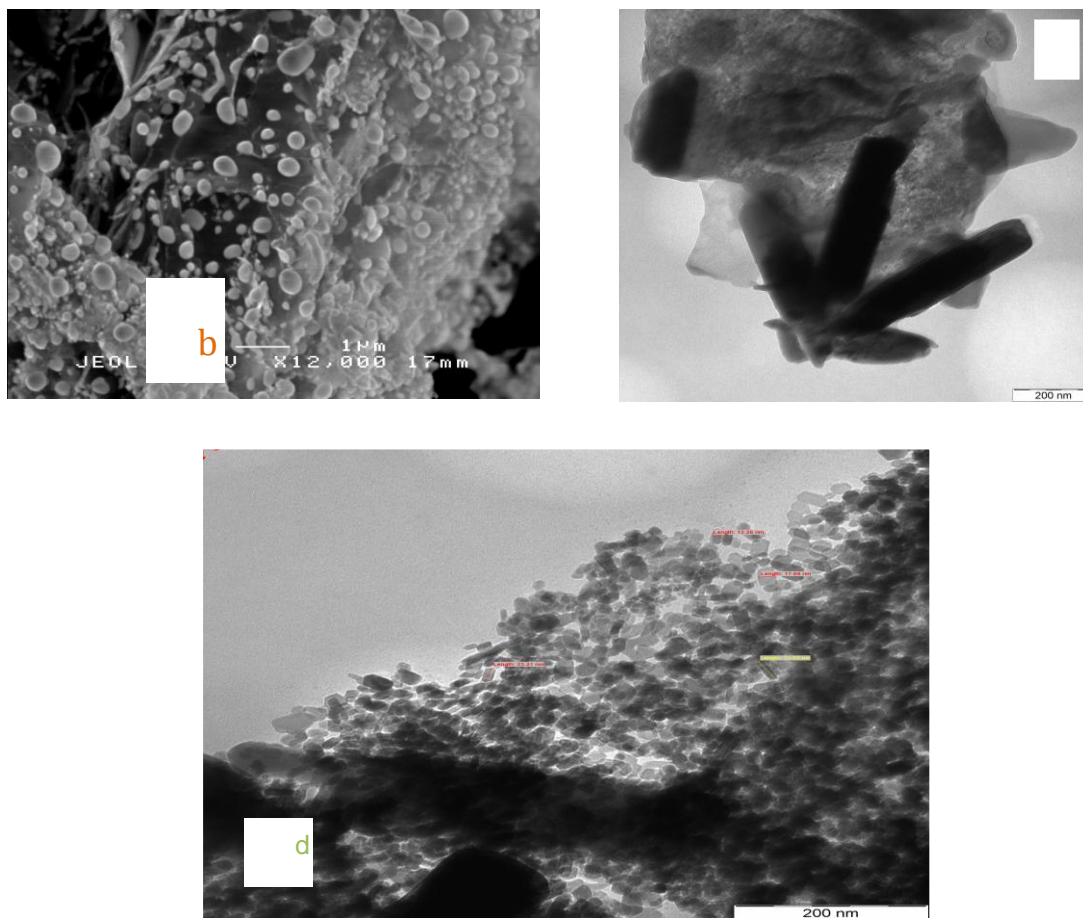


Fig.2 shows the SEM images(b) of ZCDN (bulb structure), TEM shows (c- nanorods like structure and d- nanocrystals have an average size between 23-33nm).

3.1.3 Infrared Study

The FTIR spectrum of ZCDN, ZLH Fig.[3] shows the characteristic absorption bands of zinc-layer hydroxide (ZLH) particularly abroad band at 3100 cm^{-1} (due to the interlayer water molecules) [16,17,18]. The peak at 1378 cm^{-1} assigned to three vibration modes of (NO_3^-) with D_{3h} symmetry. A weak peak at 828 cm^{-1} was also found which reflects the two modes of the same anion. The band at 1640 cm^{-1} is due to H–O–H bending vibration. The weak peak at 1018 cm^{-1} shows the mode nitrate group. The band at 7 to the mode of the O–H groups [19]. Two bands at 470 and 410 cm^{-1} are attributed to the Zn–OH and Zn–O lattice vibrations, respectively.

The ZCDN spectrum pattern was found to be dominated by a broad absorption band at 3474 cm^{-1} (due to the interlayer water molecules stretching). A shoulder band near 3347 cm^{-1} (due to the hydrogen bonding stretching vibrations) was seen. The peak 1608 cm^{-1} can be assigned to the

$\nu_{\text{H-O-H}}$ bending vibration of interlayer water. The two peaks 642 cm^{-1} and 470 cm^{-1} are attributed to the M-OH and bending vibration, respectively [20].

The postulated of the phenoxy acetates intercalated in zinc-layer confirmed by the infra red spectra in Fig.[3]. The presence of the two mixed herbicides anions in the sample was evident by the C-H vibrations band at 1493 cm^{-1} . The bands were corresponding to the C=C vibrations of the aromatic ring at around 1435 cm^{-1} , and the Bands at 1100 , 1058 and 1010 cm^{-1} are due to the symmetric vibration of C-O-C. Strong bands corresponding to the carboxylic group; $\nu_{\text{C=O}}$ at 1608 cm^{-1} and C-O stretching vibrations For 4CPA and 24D, $\nu_{\text{C=O}}$ stretching vi-

bration are shown at 1659 cm^{-1} and 1237 for 4CPA. Similar bands can be observed at 1744 and 1234 cm^{-1} for 24D [21].

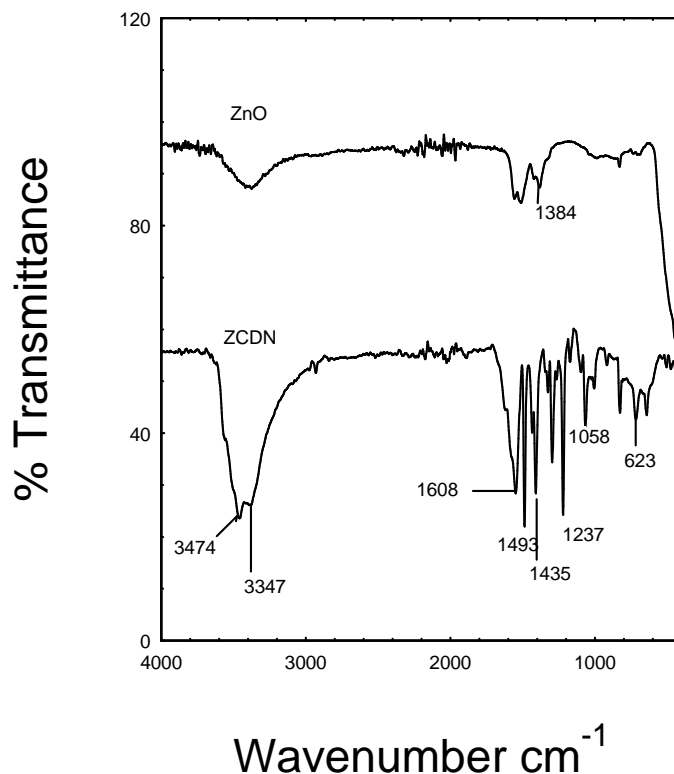


Fig. 3. Absorption bands of zinc-layer hydroxide (ZLH) and for the nano composite ZCDN

The absence of the absorption band at 1384 cm^{-1} on the spectrum of ZCDN which was previously present in ZnO spectrum pattern indicates replacement of nitrate ion by the phenoxy acetate ions in the resulted ZCDN. This shows that all phenoxy acetates have higher affinity than nitrate towards the inorganic interlamellae, thus filling the interlamellae space between the inorganic and prevent further co-intercalation of nitrate anion. This is further supported by the CHNS result, which shows the absence of nitrogen in the nano composites. The most important feature in the FTIR spectra of the nano composites was the disappearance of bands at around 1744 cm^{-1} and 1234 cm^{-1} (which is due to the carboxylic group) for all nano composite and the presence of new bands at around 1608 cm^{-1} and 1346 cm^{-1} . These new bands are due to the C=O carboxylate anion, which support the presence of 4CPA and 24D in the anionic form in the interlayer of the ZCDN [22].

3.1.4 Thermal properties

Fig.[4] shows DTA-DTG thermo grams of ZLH and its ZCDN nano composites study in this paper. The results of the analysis are summarized in table[1]. The stability is due to the new electrostatic forces formed between the anions and the ZLH[23]. The hydrogen bonding formed between H_2O and Cl attached to the benzene ring may also contribute to the thermal stability of the ZCDN nano materials.

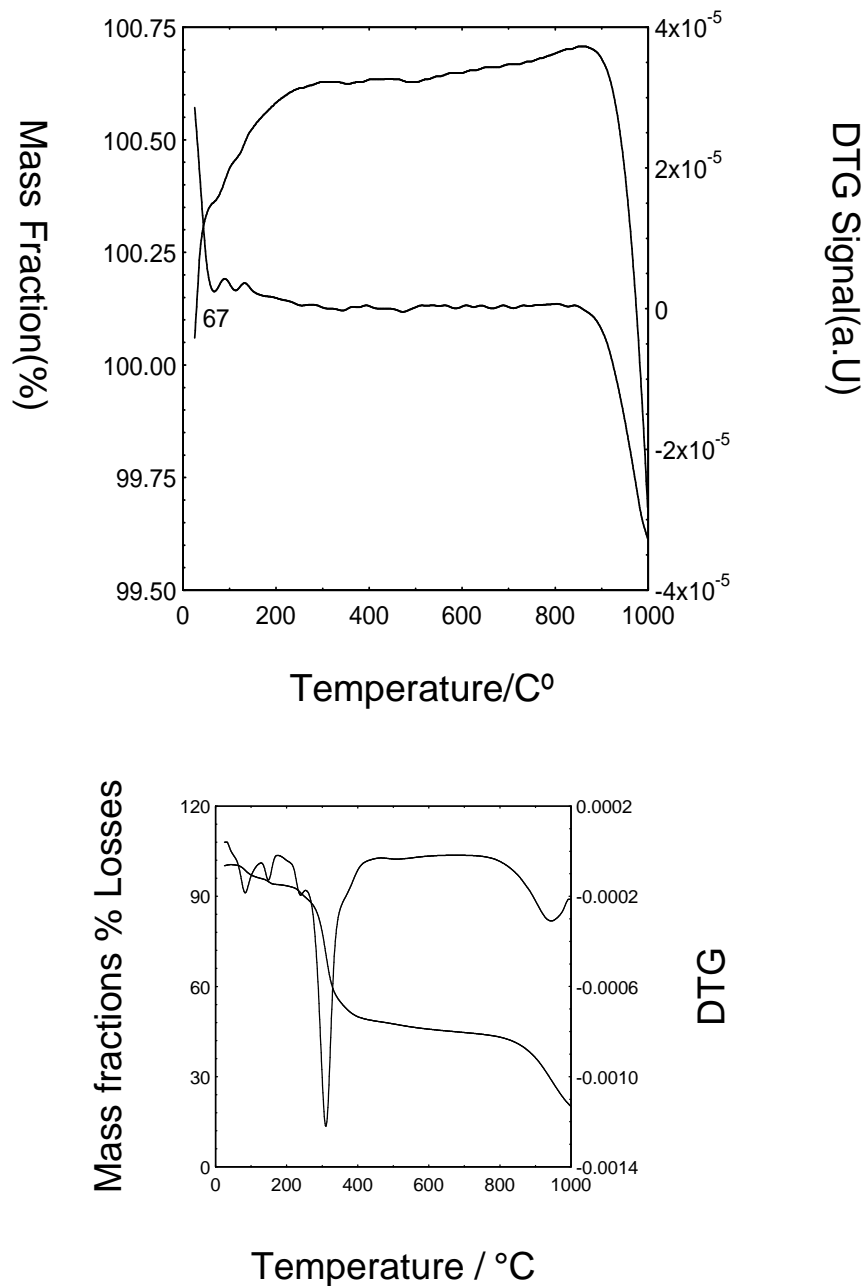


Fig.4 TGA/DTG thermo grams for ZNO(top) and ZCDN(bottom) shows the different weight losses in function with temperatures.

four major weight reductions at temperatures maxima of 98, 144, 293 and 901 °C including weight loss of 5.3, 3, 46.2 mg respectively. The first two weight reduction processes are due to the loss of water physically absorbed on the external surface of the ZLH, while the third weight loss is due to the decomposition of the anions(4CPA and 24D) intercalated into the interlayer spaces. The last stage of reduction at 901 °C is due to the removal of last traces of organic materials.

3.1.4. Surface properties

Fig[5a] show the isotherm of adsorption-desorption's of N_2 gas at 77 °K and the JBH method for pores distribution. The effect of surface property of the resulting nano composites upon

successful intercalation of (4CPA and 24D) into the ZnO resulting a well-ordered ZCDN nano layered structure is given in Table 1. The BET surface area of ZCDN synthesized in this work is $2.27 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$.

The adsorption-desorption isotherms for the ZCDN nano composites are of Type IV [24] with adsorption increased slowly at low relative pressure, followed by a slow uptake and finally rapid near to the saturated relative pressure, > 0.9 , which shows typical pure Type IV (Fig.4a). The BJH desorption pore size distribution for ZCDN nano composites is shown in (fig. 4b). The summaries of pore volume and pore diameter are given in (Table 1.) associated two different pores size at around 200 and 600 Å respectively.

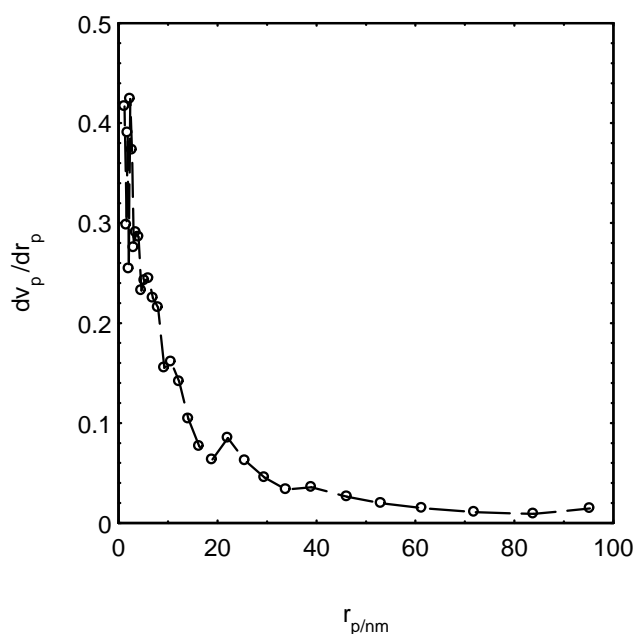


Fig.5a shows the distributions of pores size two different peaks appear at 10 and 20 nm pore diameter.

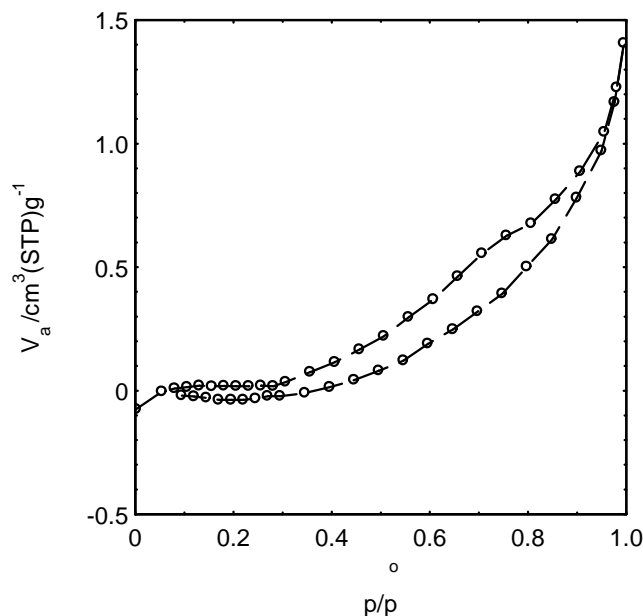


Fig.5b. show the adsorptions- desorption isotherm the loop of hysteresis indicate microspores .

3.1.5. Controlled release of phenoxy herbicides into aqueous solutions

3.1.5 Kinetic Study

We studied the simultaneous release of 4CPA and 24D in to sodium phosphate media of (0.005 M). kinetic Release study of the organic moieties has been evaluated with various models such as zero order [18], first order [19], Bashkar et al [20] and Pseudo second order equation [21].

Plotting the quantity (C_t) in ppm unit versus time (t) in min. at constant temperature gives the % of release. Usually, the release process may be better described with pseudo-second-order kinetic equation or pseudo-second-order equation can be obtained from the slope of the linear plot Fig [6] and represented in the linear form:

$t / C_t = 1/k_2 C_e^2 + 1/C_e \cdot t \dots$ (1), where C_t and C_e = the concentration in solution at time t , and at equilibrium, K_2 = rate constant of pseudo- second order.

Pseudo-first-order kinetic equation may be represented in the linear form:

$-\log(1 - C_t) = \log C_e - k_1 t \dots$ (2) where k_1 is the first order rate constant.

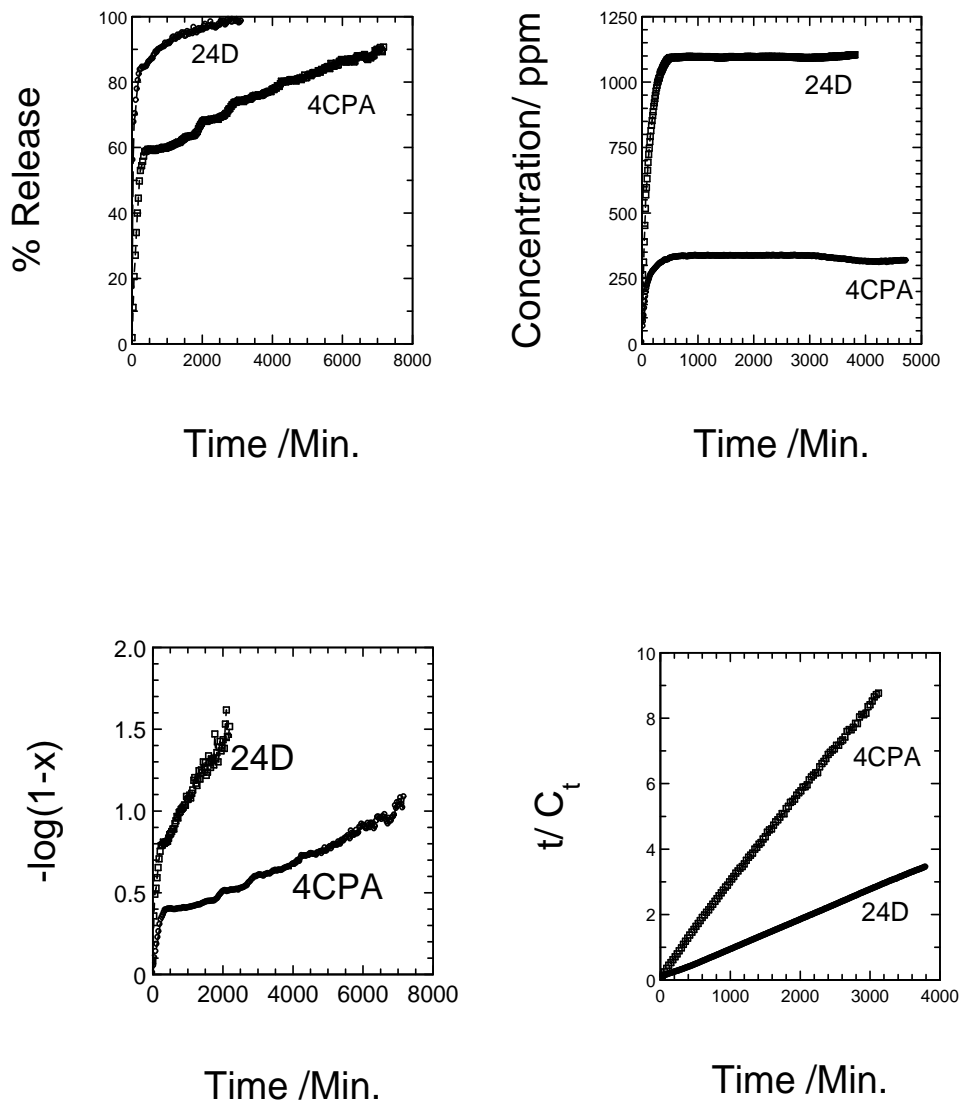


Fig.6- kinetic study of controlled release(top left),fitted with zero order model (top right), with 1st order model(bottom left) and with 2nd order form equation(bottom right).

It was found that the pseudo-second-order model was in consistent with the release kinetic processes of 24D and 4CPA from the ZCDN nano hybrids. The correlation coefficient (r^2) values obtained from straight lines are listed in Table [1]. The r^2 values of release data fitting with pseudo-second order model are 0.99-1 (see Table 1), while those with pseudo-first-

order model are in the range of 0.90–0.94. The application of parabolic diffusion using Bashker equation is poorly fitted. The accumulated release of 24D and 4CPA were 98 and 75 % respectively.

Table 1. shows micro analysis, thermal properties and kinetic studies.

CHNS analysis					
r_p nm	V_p cm ³ /g	area m ² g ⁻¹	% C	% H	% N
2.1	5	0.002	25.9	2.91	0.87
Thermal analysis					
° C	first stage	second stage	Third stage	Fourth stage	
	36-	119-	207-	746-	
T_1-T_2	121	170	402	949	
T_{max} %	98	144	293	901	
Δm	5.3	3	5	21	
Kinetic study					
anion	zero ord.	first ord.	2nd ord.	parabolic	% release
	r2	r2	r2	r2	r2
24D	0.5	0.99	1	0.65	98
4CPA					
A	0.68	0.99	1	0.89	76

4 Conclusion

Phenoxy herbicides-intercalated ZnO ZLH for the formation of organic-inorganic hybrid ZCDN nano layered materials, can be obtained by using mixed phenoxy herbicide anions as guests into ZnO ZLH as an inorganic host and subsequently used as controlled release formulations. The release of the guests from the inter layer host was found to be sacrificial ion-dependent, as well as the nature of the organic moieties that to be released. The release of 4CPA and 24D is best described by pseudo-second-order rate expression. This study suggests that ZLH can be used as a carrier for the mixed active agents.

5 Acknowledgement

Funding for this research was provided by the UPM_ITMA research fellowship 1.9.1 thanks upm-Itma for study leave and scholarship.

6 References

- [1] A. M. Bashi, M. Z. Hussien, Z. Zulkarnain, D. Tichi, J. Sol. Stat. Chem. 203(2013)19-24.
- [2] M. Meyn, K. Beneke, G. Lagaly, Inorg. Chem. 32 (1993) 1209.
- [3] S.P. Newmann, W. Jones, J. Solid State Chem. 148 (1999) 26.
- [4] H. Tagaya, N. Sasaki, H. Morioka, J. Kadokawa, Mol. Cryst. Liq. Cryst. 341 (2000) 413.
- [5] J.G. Zhou, F.Y. Zhao, Y.L. Wang, Y. Zhang, L. Yang, J. Lumin. 122–123 (2007) 195.

- [6] S.W. Liu, J.G. Yu, X.F. Zhao, B. Cheng, *J. Alloys Compd.* 433 (2007) 73.
- [7] M. Inoue, Y. Kondo, T. Inui, *Inorg. Chem.* 27 (1988) 215.
- [8] M. Rajamathi, P.V. Kamath, R. Seshadri, *Mater. Res. Bull.* 35 (2000) 271.
- [9] M. Z. Hussein, M. Y. Ghotbi, A. H. Yahaya, M. Z. Abd Rahman, *Mater. Chem. Phys.* 113 (2009) 491–496
- [10] M. Z. Hussein, M. Y. Ghotbi, A. H. Yahaya, M. Z. Abd Rahman, *Solid State Sci.*(2008), doi:10.1016
- [11] M. Z. Hussein, , Z. Zainal, and A. Yahaya, *J. Control Release.*, , 82,(2002) 417-427.
- [12] M. Z. Hussein, Z. Zainal, A. Yahaya and H.K. Loo, *Sci. Technolog. Adv. mater.* 6, (2005) 956.
- [13] Choy, J. H., Kwak, S. Y., Jeong, Y. J. and Park, J. S, *Angew. Chem.*, (2000), 39, 4041-4045.
- [14] A. Ambrogi, G. Fardella, G. Grandolini and L. Perioli, *Int. J. Pharma.*, 2001, 220, 23-3.
- [15] K. M. Tyner, S. R. Schiffman, and E. P. Giannelis, *J. Control Rel.* 95, 501 (2004)
- [16] Z. Wang, E. Wang, L. Gao, and L. Xu, *J. Solid State Chem.* 178, (2005)736
- [17] K. R. Close, and L. Ludeman, *Plant Science*, 52, (1987) 81-89
- [18] F. Cavani, F. Trifiro, A. Vaccari, *Catal. Today*, 11 (1991) 173.
- [19] S.P. Newman, W. Jones, *J. Solid State Chem.*, 148 (1999) 26.
- [20] W. Stahlin, H.R. Oswald, *J. Solid State Chem.*, 3 (1971) 252.
- [21] H.C. Zeng, Z.P. Xu, M. Qian, *Chem. Mater.*, 10 (1998) 2277.
- [22] J. Cornejo, , R. Celis, , I. Pavlovic, , Ulibarri, , and Hermosin, M. C., 35, (2000) 771
- [23] I. Pavlovic, C. Barriga, M. A. Hermosin, J. Cornejo and M. A. Ulibarri, *Appl. Clay Scie.*, 2005, (in press).
- [24] M. C. Hermosin, and J. Cornejo, *Environ. Qual.*, 22, (1993) 325-331.
- [25] A. Legrouri, A. Barroug, J. P. De Roy and J. Besse, *J. Mater. Chem.*, 10, (2000)1007
- [26] K. S. W. Sing, D. H. Everett, Haul, R. A. W. Moscou, R. A. J. Pierotti, J. Rouquerol and Siemeniewska, *J. Pure and Appl. Chem.*, 57(4) (1985)603-619.

CO-121 Aplicación de Técnicas Analíticas Avanzadas en el Desarrollo de Nuevas Formulaciones para la Limpieza de Barnices en Obras de Arte

Pérez-Villares, N. Dpto. Pintura. Facultad de Bellas Artes.
Universidad de Granada. nuriapv@correo.ugr.es
Romero-Noguera, J. Dpto. Pintura. Facultad de Bellas Artes.
Universidad de Sevilla

Bailón -Moreno, R. Dpto. Ingeniería Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada
Ramos-López J.M., Centro de Instrumentación Científica.

Universidad de Granada
Bolívar-Galiano F. Dpto. Pintura. Facultad de Bellas Artes.
Universidad de Granada

Resumen

Cuando se lleva a cabo la limpieza de suciedad y de barniz en obras de arte con disolventes o emulsiones en medio acuoso es necesario considerar los efectos que pueden ocasionar sobre la policromía original. Este trabajo recoge los resultados de un estudio experimental sobre la eficacia de diferentes emulsiones a base de limoneno para la limpieza de barnices en obras de arte, analizando su grado de eficacia, la permanencia de residuos en superficie y las posibles interacciones con las capas de policromía. La eficacia del tratamiento se ha comprobado mediante iluminación con luz ultravioleta, microscopía óptica polarizada, espectroscopía micro-Raman y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Palabras Clave

Limpieza, Barniz, Pintura, Emulsiones, Luz UV, Raman, GC-MS.

1 Introducción

El término limpieza, dentro del campo de la restauración, se refiere a toda acción dirigida a eliminar aquellas capas superficiales externas (suciedad superficial o recubrimientos) que no pertenecen a la composición original de la obra, dificultan la observación de la superficie original, desvirtúan su lectura o afectan a su integridad. Dicho esto, es obvio que el tratamiento que se debe seguir para limpiar una obra de arte pictórica protegida con un barniz, dependerá del tipo de suciedad, las características de la superficie pictórica y el estado del barniz que la recubre.

1.1 Evolución histórica de los métodos de limpieza de obras de arte

Desde la antigüedad clásica y hasta el Renacimiento, las sustancias utilizadas en los procesos de limpieza de las obras de arte eran productos sumamente agresivos para las superficies policromadas, lo que desgraciadamente daba lugar a la pérdida total o parcial de la policromía. Durante los s. XVII y primera mitad del XVIII se toma conciencia de la potencial agresividad de este tipo de productos y se empieza a racionalizar el mecanismo por el que actúan y su forma de aplicación. Pero es en el siglo XX cuando se da el mayor impulso a la limpieza de bienes culturales, debido a lo aprendido de las alteraciones producidas por los diversos tratamientos a lo largo del tiempo y del riesgo relacionado con el empleo de disolventes. El mayor estímulo se debió a los avances científicos alcanzados tras la Primera Guerra Mundial, los cuales suministrarían una gran variedad de productos con propiedades físicas y químicas que permitirían resolver problemas y desarrollar nuevas técnicas. Las investigaciones realizadas en la segunda mitad de siglo por Hildebrand y Scott, seguido de

los estudios de Hansen y Teas, sentaron las bases para una intervención restauradora más científica. Sus aportaciones se completaron con los estudios de Feller y Torraca. Pero la mayor aportación a la visión organizada de la limpieza en restauración sería dada por Masschelein Kleiner, para quien la determinación del tipo de sustrato sería el principal objetivo para conseguir su más exacta disolución (*Masschelein Kleiner, L., 1981*). Más tarde, Horie analizaría mediante símbolos las propiedades solubilizadoras de los disolventes (*Horie, C.V., 1987*).

A finales de los 80 se proponen otros sistemas de limpieza alternativos, con el objetivo de mejorar el resultado de la limpieza y eliminar los riesgos del uso de disolventes orgánicos. Es entonces cuando Wolbers revoluciona el mundo de la limpieza de barnices, al diseñar una serie de sistemas acuosos, en cuyas formulaciones combina disolventes, tensioactivos, agentes quelantes, enzimas, tampones y gelificantes buscando la mejor interacción con la materia no deseada en la obra, con una metodología basada en el análisis y la identificación química precisa de los componentes pictóricos.

1.2 Nuevas tecnologías

Considerando todo lo anterior y las últimas investigaciones publicadas en este campo, es obvio que el estudio científico y técnico de una obra es imprescindible para su adecuada restauración (*Wolbers, R., 1990, 2000; Burnstock, A. and T. Learner, 1992; Cremonesi, P. e Bellucci, R., 1995; Sutherland, 2000; Khandekar, N., 2004*). Concretamente, para eliminar un sustrato como la capa de barniz de una superficie pictórica, será necesario conocer la relación entre la naturaleza de la capa que eliminar y el tipo de disolvente más apropiado para ello. Este avance experimentado en el conocimiento de los materiales, de los mecanismos fisicoquímicos responsables de su envejecimiento y de la respuesta a los tratamientos de limpieza, habría sido imposible sin el desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas analíticas necesarias.

Nuestro equipo de investigación ha propuesto formulaciones para la limpieza de policromías mediante mezclas de agua y limoneno, estabilizadas mediante un tensioactivo no iónico en medio acuoso (*Pérez-Villares et al., 2011*) que precisan de la aplicación de métodos de análisis concretos que permitan obtener resultados óptimos sobre su control y eficacia. El objeto de este estudio es la aplicación de técnicas analíticas avanzadas para analizar la limpieza de barnices recientes y envejecidos, realizada con las formulaciones citadas, constatando la eficacia del tratamiento, el grado de limpieza y la homogeneidad del resultado en la superficie pictórica.

2 Material y Métodos

2.1 Preparación de las muestras patrón

Se han preparado muestras patrón de pintura al óleo sobre lienzo barnizadas. Para ello, se aplicó, sobre tela de lino, una preparación compuesta por cola animal, sulfato cálcico y óxido de zinc. Sobre lo anterior, se extendió una pintura al óleo blanca a base de aceite de linaza y pigmento blanco de cinc. Finalmente, se protegió la pintura con un barniz terpénico natural compuesto de resina de almáciga y esencia de trementina (*Figura 1*). Una parte de dichas muestras fueron sometidas a envejecimiento artificial acelerado mediante exposición a luz ultravioleta durante 672 horas para imitar el deterioro de la capa de barniz de una pintura antigua.

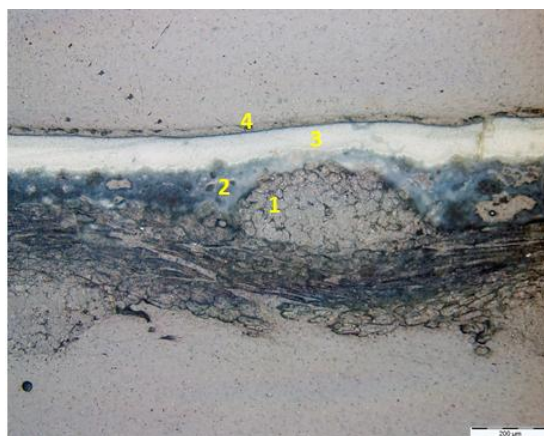


Figura 1. Estratigrafía de la muestra patrón: (1) tela, (2) capa de preparación, (3) capa de óleo, (4) capa de barniz.

2.2 Emulsiones de limpieza

Para los ensayos de limpieza de barniz terpénico se utilizaron varias emulsiones constituidas por diferentes mezclas de tensioactivo Findet^(R) 1214/N23, limoneno y agua destilada (Tabla 1). Findet^(R) 1214/N23 es una marca registrada por Kao Corporation y consiste en un alcohol graso etoxilado de origen vegetal con una cadena grasa C12-C14 y 11 moles de óxido de etileno.

Tabla 1. Formulaciones de las emulsiones de limpieza (% en peso)

Formulas	Limoneno	FINDET 1214/N23	Agua destilada
LP01	0	8	92
LP02	14	7	79
LP03	25	6	69
LP04	0	12	88
LP05	33	8	59
LP06	50	6	44
LP07	0	20	70
LP08	67	10	23
LP09	80	6	14

2.3 Ensayos de limpieza

El procedimiento empleado consiste en impregnar con cada una de las emulsiones fragmentos de 1 cm² de papel de filtro que se depositan sobre las muestras patrón, envejecidas y sin envejecer. Tras dejar actuar durante 15 minutos se retiraron los papeles y se procedió al aclarado de la superficie utilizando primero agua destilada y posteriormente white spirit. Tras la limpieza, se sometieron de nuevo todas las muestras, las envejecidas anteriormente y las no envejecidas, a un envejecimiento acelerado mediante radiación ultravioleta durante 672 horas, con el objeto de estudiar el comportamiento a largo plazo de los posibles cambios en la superficie pictórica tras la aplicación y aclarado de cada una de las emulsiones limpiadoras. En la Tabla 2 se muestran los ID de las muestras.

Tabla 2. Identificación de las muestras

ID muestra	Muestra
M	Muestra inicial
ML	Muestra inicial limpia
MLE	Muestra inicial limpia, envejecida tras la limpieza
Me	Muestra envejecida
MeL	Muestra envejecida limpia
MeLE	Muestra envejecida limpia, re-envejecida tras la limpieza

2.4 Técnicas analíticas

2.4.1 Examen con luz visible y con luz ultravioleta

Para poder comprobar el estado de conservación de la superficie de las muestras, localizar alteraciones por oxidación de la capa de barniz y comprobar el grado de limpieza alcanzado (distribución irregular, grosor o ausencia de barniz) se ha recurrido al examen de la imagen con luz visible y la fluorescencia inducida por luz ultravioleta. Esta técnica no exige toma de muestra y es muy utilizada en restauración por su facilidad de uso. El envejecimiento químico de un material desencadena procesos de oxidación y polimerización que realzan su fluorescencia, de ahí que la capa de barniz destaque por su aspecto lechoso cuando está envejecida. La intensidad de la fluorescencia será mayor cuanto mayor sea el espesor del estrato. Además, los compuestos orgánicos tienen una fluorescencia muy superior a los compuestos inorgánicos, por ello la fluorescencia del barniz (resina de almáciga) será mayor que la de la capa de color (pigmento blanco de cinc aglutinado con óleo) y como consecuencia ambos estratos podrán distinguirse mejor al ser iluminados con luz ultravioleta (*Alba Carcelén, L. et al, 2006*)

El instrumental de medida que se suele utilizar para el analizar pintura de caballete emplea regiones espectrales que van de 400nm a 780nm, en el caso de la luz visible, y de 200nm a 400nm, para la luz ultravioleta. Para este estudio se ha utilizado lámpara de Wood con tubos fluorescentes, MODELO, VL-215M de 60W (15 W de iluminación UV en un rango de 270-380 nm llegando a superficie iluminada 8mW/cm²) La respuesta visible se ha registrado con una cámara fotográfica Canon digital IXUS 8015 con objetivo 6,2-18,6 mm.

2.4.2. Estudio estratigráfico mediante microscopía óptica de luz polarizada

Con el fin de observar las capas más superficiales de la muestra (barniz y capa de color subyacente, especialmente) se ha utilizado la técnica de microscopía óptica con luz transmitida y reflejada, con o sin analizador, debido a su validez para estudiar la sucesión de capas de policromía de una obra de arte, su color, transparencia, espesor y estado de conservación (*Arcos Von Haartman, E. et al., 1992*).

2.4.2.1 Preparación de muestras delgadas pulidas

Se realizaron estratigrafías preparadas como láminas delgado-pulidas. Para ello, el trozo de muestra se englobó en una resina, y una vez polimerizada, se realizó un micro corte transversal a las capas. Las secciones obtenidas se pegaron con la misma resina a un porta-objetos de vidrio. Después se realizó un segundo corte que permitió un grosor inicial de un milímetro, el cual se fue rebajando con sucesivos pulimentos con carburo de silicio de distinto grano hasta reducirlo a un grosor de 30µm. Finalmente se pulió con pasta de diamante de distinto grano hasta conseguir una superficie especular óptima para su observación con luz reflejada.

2.4.2.2 Análisis de las muestras

Se ha empleado un microscopio Olympus, modelo BX-60, con el que se ha obtenido documentación micro fotográfica de las muestras patrón que incluye imágenes en luz reflejada y luz transmitida con y sin polarizadores cruzados.

Para citar las imágenes se ha seguido el criterio de identificación siguiente:

Sigla de la muestra entre paréntesis (ID de la muestra), seguida de la letra L (luz), de la letra T (transmitida) o R (reflejada), S (sin) o C (con), A (analizador). Se describen de la zona más interna de la obra de arte (tela) a la más externa, correspondiente a la superficie del cuadro (barniz).

2.4.3. Espectroscopía Micro-Raman (MRS)

Para poder analizar la mayor o menor presencia superficial de la resina mástic en las muestras en relación al pigmento blanco de la capa pictórica y así evaluar la eficacia de los tratamientos de limpieza realizados con las formulaciones propuestas, se ha utilizado espectroscopía micro-Raman.

La espectroscopía Raman es una técnica analítica que proporciona información química y estructural de un compuesto o material (orgánico o inorgánico) permitiendo su identificación. Se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Solo una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que serán característicos del material analizado con independencia de la frecuencia de la luz incidente. Esta técnica se ha consolidado en los últimos años como una técnica especialmente adecuada para la caracterización de pigmentos porque es una técnica no destructiva que permite la observación de micromuestras sin tratamiento previo y con una elevada resolución espacial (del orden de una micra) (*Agulló Rueda, F., 2008*).

Los espectros Raman de las muestras se han obtenido con un espectrómetro micro-Raman cofocal Jasco NRS-5100, equipado con detector CCD con refrigeración Peltier y lentes objetivo Olympus.

La fuente de excitación utilizada ha sido un láser de estado sólido de 785´11nm, operando a una potencia variable entre 0.6 y 5.9 mW (según la composición de la muestra) y con una red de difracción de 600 líneas/mm. La lente objetivo utilizada ha sido de 5x, 20x y 100x con una resolución por debajo de 1µm. Los espectros, con una resolución espectral de 1,62 cm⁻¹, se han registrado en varios rangos desde 200 a 1800 cm⁻¹. Los tiempos de integración han sido de 15 segundos y 15 acumulaciones.

2.4.4. Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

Con el fin de evaluar de forma cuantitativa la eficacia de las emulsiones limpiadoras, se ha determinado analíticamente la cantidad de barniz que queda en el lienzo después de los tratamientos de limpieza. Dentro de las técnicas cromatográficas, la cromatografía gas-líquido (GC) se ha considerado la más conveniente para este estudio, al tratarse de una técnica que permite realizar separaciones de muestras orgánicas complejas (como las resinas naturales) de forma rápida y sencilla, a la vez que proporciona información de carácter cualitativo y cuantitativo. Se han identificado y evaluado cuantitativamente los componentes más característicos –o marcadores– del barniz (*Figura 2*) para comprobar el grado de eliminación del aceite secante para estudiar si hay una posible degradación de la capa pictórica, y de los componentes del limpiador, por si quedaran restos no eliminados durante el proceso de aclarado.

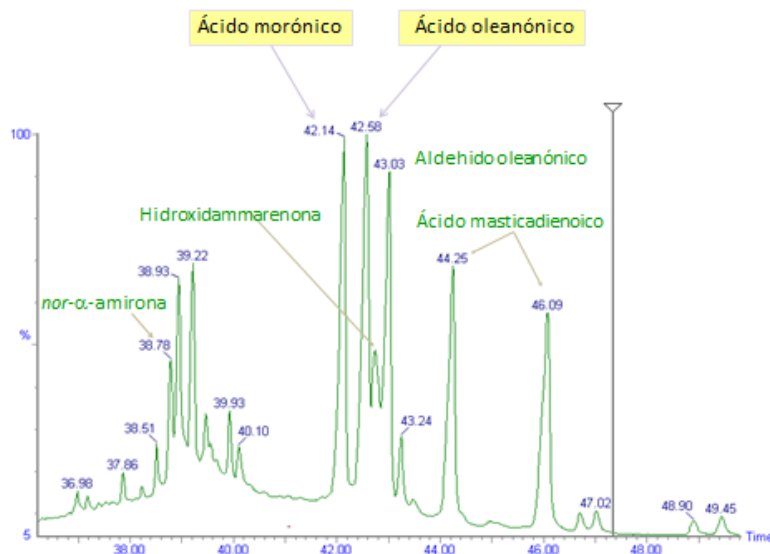


Figura 2. Cromatograma de resina de almáciga no envejecida. El ácido morónico y el ácido oleanónico se utilizan como marcadores principales de la resina.

2.4.4.1. Extracción y metilación

Se cortaron las muestras patrón mencionadas arriba en cuatro fragmentos de 25 mm² y se introdujeron en tubos de ensayo a los que se añadieron 500 µl de cloroformo. Tras permanecer en cloroformo durante 5 minutos y extraer así los componentes orgánicos, los sobrenadantes, una vez filtrados, se sometieron a vacío, para evaporar el disolvente, en viales de 2 ml. El residuo seco obtenido fue procesado añadiendo a cada vial 20 µl de estándar interno consistente en ácido oleanónico, 30 µl de benceno y 30 µl de reactivo METH-PREP IITM de ALTECH. METH-PREP IITM.

2.4.4.2. Procedimiento cromatográfico

A continuación, 2 µl de cada solución se inyectaron en un cromatógrafo de gases AGILENT 7890A (AGILENT TECHNOLOGIES, USA) con muestreador automático Combi-xt PAL, acoplado a un espectrómetro de masas WATERS, Quattro micro GC (WATERS, USA). Una vez inyectada la muestra en la columna cromatográfica se produce la elución empleando helio, con un flujo de 1 ml/s.

La columna cromatográfica usada ha sido una columna capilar recubierta (WCOT: Wall Coating Open Tubular) ZB-5MS, con una longitud de 30 metros, un diámetro interno de 0,25 mm y un espesor de película de 0.25 µm. La temperatura del inyector ha sido de 250°C, la temperatura de línea de transferencia 250° C. El programa de temperatura: 140°C (2 min) y rampa de 4° C/min hasta 300° C (5 min).

2.4.4.3. Consideraciones para la interpretación de los cromatogramas

Cuando se analizan aceites secantes, se identifican sus ácidos grasos. Los ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) no se alteran durante el proceso de secado, pero sin embargo los ácidos grasos insaturados (por ejemplo, ácido oléico, linoléico y linolénico) sufren grandes transformaciones por oxidación y polimerización que cambian sus estructuras químicas. Uno de estos productos de degradación es el ácido acelaico. Mediante las áreas de pico de estos ácidos se pueden calcular las relaciones acelaico/palmítico (A/P) y palmítico/esteárico (P/S). Por ejemplo, para el aceite de linaza estas relaciones son de entre 0.7 a 1.3 para A/P y de entre 1 y 1.4 para P/S.

Para reconocer el tipo de barniz se necesita también caracterizar la resina que lo compone. Todas las resinas triterpénicas se alteran con el paso del tiempo oscureciéndose y cambiando sustancialmente su composición y sus propiedades. Todo ello obliga a que en el análisis cromatográfico se haga uso de marcadores que sean característicos de la resina considerada. En el caso de la resina de almáciga, los compuestos usados como marcadores característicos son el ácido morónico y el ácido oleanónico (*Figura 2*).

Para llevar a cabo la cuantificación de la eficacia de la emulsión de limoneno en la limpieza de barniz de almáciga, se ha introducido como estándar interno (IS) ácido oleanólico. Este compuesto, muy parecido en estructura química a los característicos de la resina de almáciga, es añadido en igual concentración a todas las muestras, consiguiendo de este modo, la cuantificación absoluta de los marcadores de la resina. La concentración (en partes por millón/ppm) de los ácidos morónico y oleanónico se ha calculado en base a la concentración conocida del estándar interno (ácido oleanólico), obteniendo de este modo las cantidades exactas de barniz presentes antes de la limpieza (muestras iniciales de los que partía este experimento en donde el valor en ppm de esos ácidos terpénicos era el máximo) y las obtenidas después de la limpieza y tras envejecer las muestras limpias.

2.4.4.4. Evaluación de la eficacia en la limpieza

Si denominamos C_0 a la concentración de los ácidos morónico y oleanónico en la muestra antes de ser limpiada y C a la concentración de los ácidos morónico y oleanónico en la muestra tras la limpieza, el grado de limpieza, C_L , alcanzado se determina mediante la siguiente ecuación, que representa el porcentaje de barniz retirado en el proceso de limpieza respecto de la cantidad de barniz inicial que había en la muestra:

$$C_L = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100$$

3 Resultados

3.1 Examen con luz visible y con luz ultravioleta

La eficacia limpiadora se evaluó en una primera aproximación mediante observación con luz visible y con luz ultravioleta (*Figura 3* y *Figura 4*). En las imágenes se observan distintos grados de fluorescencia de la capa de barniz en la muestra patrón envejecida, tras aplicar el tratamiento de limpieza con cada una de las emulsiones.

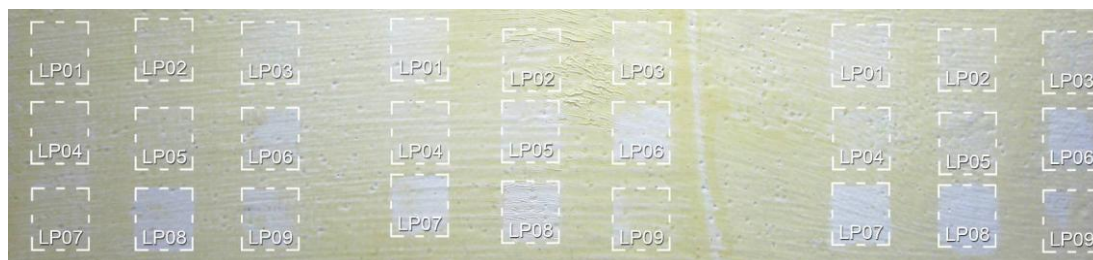


Figura 3. Ensayos de limpieza con las diferentes emulsiones sobre barniz envejecido. Para cada formulación se han realizado tres ensayos. Imagen con luz visible.

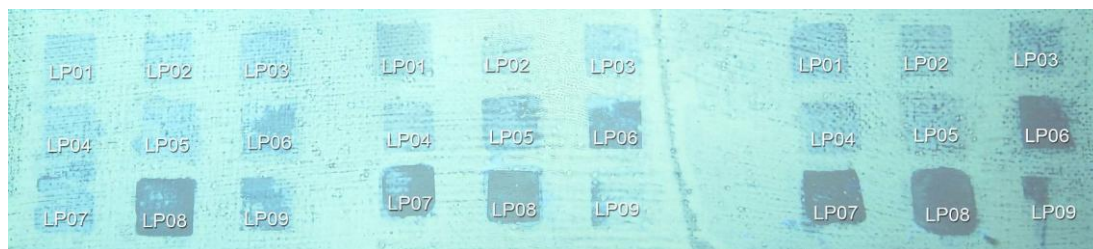


Figura 4. Ensayos de limpieza de barniz envejecido observados con luz ultravioleta observados con luz ultravioleta.

La intensidad de fluorescencia es muy notable en la muestra envejecida respecto de la muestra inicial, apreciándose también con luz visible. Por otro lado, se observa claramente una fluorescencia diferente entre la capa de barniz y la capa de óleo, la cual se transparenta o aparece claramente en algunos de los casos.

3.2 Estudio estratigráfico mediante microscopía óptica polarizada

La *Figura 5* muestra imágenes de microscopía óptica en luz transmitida correspondientes a las estratigrafías estudiadas. La materia pictórica de las muestras patrón consta de tres partes características: dos capas de preparación de color blanco (como se observa con luz reflejada con analizador); dos capas coloreadas por pigmento blanco (óxido de Zn) donde los granos están soportados en el aglutinante (cola animal) y una capa de protección.

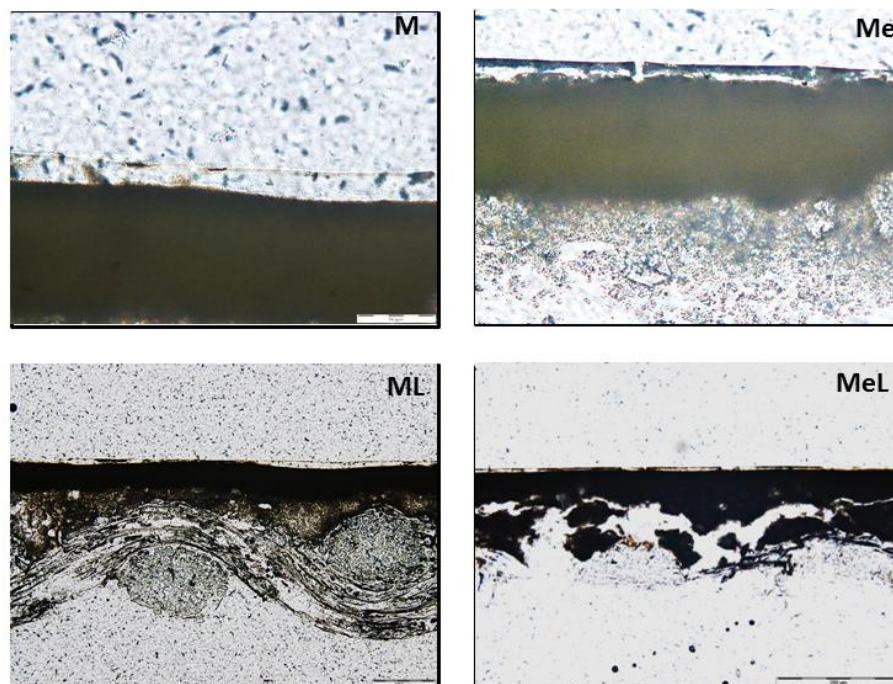


Figura 5. Estratigrafías: muestra inicial (M)LTSA, muestra envejecida (Me)LTSA, muestra inicial limpia (ML)LTSA y muestra envejecida limpia (MeL)LTSA

La capa de protección o de barniz en la muestra inicial (M)LTSA es isotrópica y por tanto se muestra transparente en luz transmitida y con baja reflectividad en luz reflejada. La superficie aparece lisa, sin fracturas. La capa de barniz de la muestra envejecida (Me)LTSA, es menos transparente y está ennegrecida hacia su parte más externa, debido a los procesos de oxida-

ción y polimerización sufridos por envejecimiento acelerado. Se observan también irregularidades y grietas perpendiculares a la superficie.

En la muestra envejecida limpia (MeL)LTSA se observa un barniz de menor grosor y en determinadas zonas aparecen algunas faltas. En la muestra inicial limpia (ML)LTSA se aprecia un mayor grosor y continuidad en la capa de barniz. Las muestras envejecidas tras su limpieza, presentan el barniz oscuro y craquelado, especialmente la muestra envejecida limpia re-envejecida (MeLE)LTSA, no apreciándose en superficie ninguna nueva sustancia o cambios en los sustratos inferiores.

3.3 Espectroscopía Micro-Raman (MRS)

En la *Figura 6* se exponen los espectros Raman de la resina que compone la capa de barniz y del pigmento blanco de la capa de óleo. Asimismo se presentan superpuestos los espectros de la muestra inicial y envejecida, antes y después de la limpieza, en los que se observa la disminución de las bandas correspondientes al barniz tras su eliminación parcial con los procesos de limpieza propuestos.

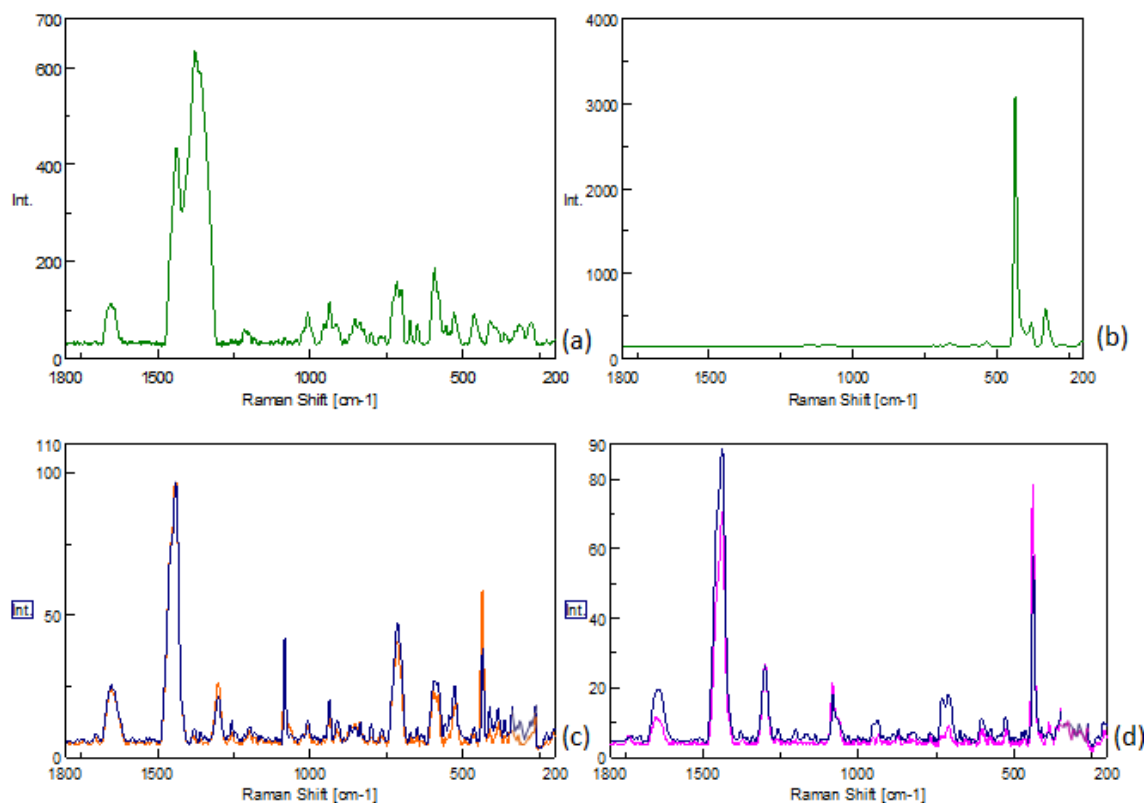


Figura 6. Espectros Raman de los componentes de las muestras patrón en la región de longitud de onda 200 a 1800 cm^{-1} . (a) Resina Mástic (más soporte de vidrio), (b) pigmento blanco de cinc, (c) muestra inicial (azul) y muestra inicial tras la limpieza (naranja), (d) muestra envejecida (azul) y muestra envejecida tras la limpieza (rosa)

3.4 Cromatografía de gases-GC

En la Tabla 3 se muestran los triterpenos identificados en la resina de almáciga por GC-MS y en la Tabla 4, Tabla 5 y Figura 7, los resultados obtenidos con las muestras estudiadas para el limpiador LP06, a título de ejemplo representativo. La concentración de los componentes se ha calculado respecto a la del estándar interno ácido oleanólico y los resultados muestran la eficacia de la limpieza propuesta con valores de $C_L\%$ elevados en el tratamiento realizado en muestra no envejecida (57,6%), aunque también muy satisfactorios en la muestra envejecida (35,9%). En la Tabla 5 se muestra el porcentaje de barniz retirado de la superficie pictórica tras la limpieza.

Tabla 3. Triterpenos identificados en la resina de almáciga por GC-MS (t_R =tiempo de retención; IS=estándar interno, Mw=Peso molecular; ID=Identificación: L, Wiley Mass Spectra Library; R, References)

N_o	Componentes	Tr	Resina	Mw	ID*
			Mastic		
1	Ácido morónico, metil ester	26.26	√	468	L
2	Ácido oleanónico, metil ester	26.65	√	468	L
3	Ácido oleanólico, metil éster	27.30	√	472	IS

Tabla 4. Concentración (ppm) de los triterpenos identificados en el barniz en cada muestra, en relación con el estándar interno (IS)

ID Muestra	(IS) Ácido Oleanólico	Ácido morónico	Ácido oleanónico
M	375	437	515
ML		206	198
MLE		59	73
Me		140	140
MeL		88	92
MeLE		56	85

Tabla 5. Concentración (ppm) de los componentes del barniz de almáciga y valores de limpieza (en negrita, $C_L\%$).

Concentración (ppm)					
ID Muestra	(IS) Ácido oleanólico	(1) Ácido Morónico	(2) Ácido oleanónico	(1) + (2)	$C_L\%$
M	375	437	515	952	-
ML		206	198	404	57,6
Me		140	140	281	-
MeL		88	92	180	35,9

M

ML

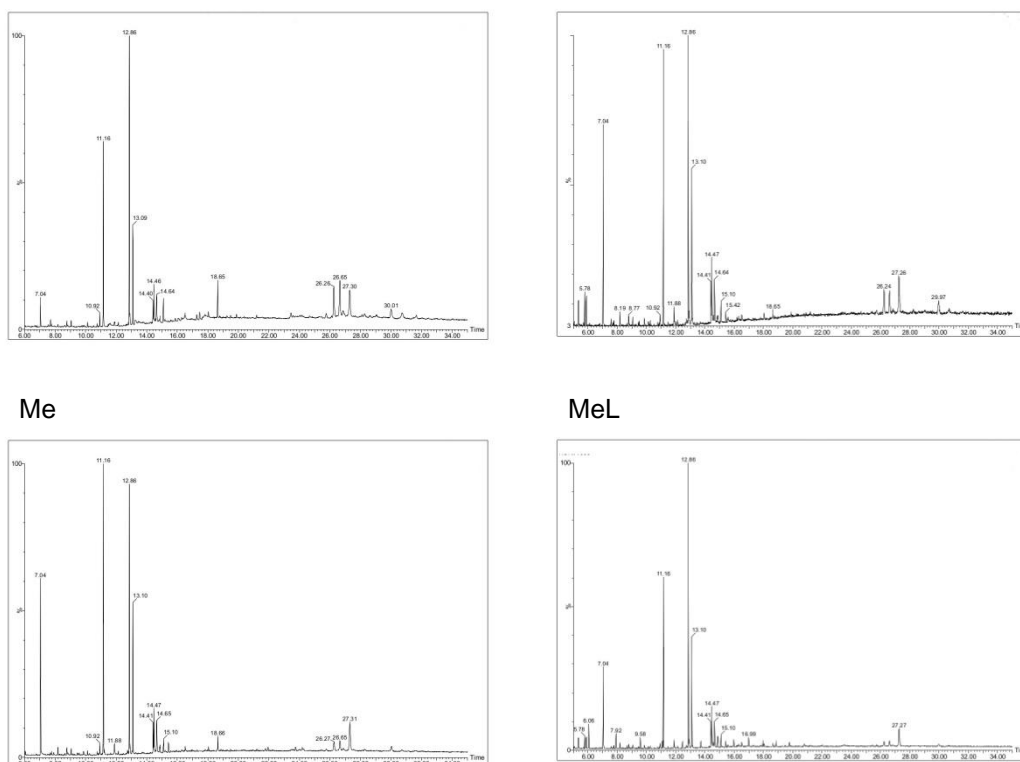


Figura 7. Cromatogramas completos en los que aparecen los aceites secantes y los componentes de la resina mástic antes y después de la limpieza de las muestras.

4 Discusión

Se considera que un procedimiento de limpieza es óptimo cuando se observa que el barniz puede eliminarse en el grado deseado sin provocar ninguna alteración sobre las capas subyacentes. Ello justifica que el restaurador debe de disponer de un producto de limpieza no excesivamente agresivo, que sea controlable y que no cause daños presentes y futuros sobre las capas de policromía originales de la obra de arte. El método propuesto consistente en utilizar diversas técnicas analíticas combinadas, tales como iluminación con luz ultravioleta, microscopía óptica polarizada, espectroscopía micro-Raman y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, permiten evaluar la eficacia de los limpiadores y su impacto sobre la superficie pictórica.

Como es sabido, la respuesta del barniz ante la luz ultravioleta evidencia el envejecimiento de una superficie. Además, se observa claramente una menor fluorescencia en la superficie cuando se aligera o elimina el barniz que la protege, debido a que la capa de protección va perdiendo grosor al tiempo que va emergiendo la capa de color, de baja fluorescencia. La intensidad más baja de la fluorescencia de la superficie se da en los casos de mayor eficacia limpiadora de las emulsiones (limpiadores LP06 y LP08) lo que nos permite constatar la limpieza efectiva y selectiva del barniz

Los resultados del estudio de estratigrafías con microscopía óptica polarizada (*Figura 5*) nos permiten comprobar las perfectas condiciones que presenta el barniz de la muestra inicial (M) y el peor estado de conservación de éste en la muestra envejecida (Me), donde destacan craqueladuras, fisuras y oscurecimiento del barniz (debido a los procesos de oxidación y polimerización sufridos por el envejecimiento acelerado, causado por la radiación ultravioleta). Es evidente un empeoramiento del estado de conservación en la muestra limpia re-envejecida (MeLE). Todo ello nos confirma que el envejecimiento acelerado de las muestras que simulaba el deterioro producido por el paso del tiempo, es efectivo. Además, constata la eficacia limpiadora, observándose que el limpiador LP03 es más efectivo en la muestra envejecida que en la muestra inicial, como evidencian el menor grosor de la capa de barniz y la

falta de éste en algunas zonas de la superficie de la muestra envejecida una vez limpia (MeL). Al no apreciarse depósitos en superficie, podemos interpretar que no parece haber indicios de residuos del producto de la limpieza en las muestras.

Mediante análisis con microscopía Raman se ha observado que el espectro realizado de la muestra envejecida, tiene menor intensidad en el caso de la resina mástic y mayor intensidad en el caso del pigmento blanco de cinc, respecto del espectro de la muestra antes del envejecimiento (*Figura 6*), lo cual corrobora el envejecimiento. Además, el espectro que nos permite identificar la resina disminuye de intensidad después de la limpieza de la muestra inicial (de color naranja) y de la limpieza de la muestra envejecida (de color rosa). Esto nos indica una menor presencia superficial de resina tras la limpieza, lo cual confirma la eficacia de la limpieza.

Las distintas cromatografías GC-MS realizadas antes y después de los procesos de limpieza han puesto de manifiesto la eficacia de los tratamientos propuestos mediante el cálculo de $C_L\%$ (Tabla 5). Así, se puede observar que el limpiador que se ha tomado como ejemplo para ilustrar esta metodología, limpia más intensamente barnices sin envejecer (un 57,6%) que barnices envejecidos (35,9%). Los valores encontrados son concordantes con la apreciación visual ya analizada en trabajos anteriores (*Pérez-Villares et al., 2011*) usando tanto luz visible como luz ultravioleta. Asimismo, se ha verificado que no quedan residuos de las emulsiones limpiadoras sobre las superficies tratadas (*Figura 7*)

5 Conclusión

Se concluye así que el examen con luz visible y con luz ultravioleta, así como las técnicas de microscopía óptica polarizada y la espectroscopía Raman pueden estudiar el grado de eficacia del tratamiento de limpieza con las formulaciones propuestas. Además, la cromatografía de gases combinada con la espectrometría de masas (GC-MS) puede valorar con exactitud la limpieza de barnices envejecidos y sin envejecer, cuantificando la concentración de barniz restante en una superficie policromada tras su limpieza.

4 Referencias

1. Arcos Von Haartman, E.; Rodríguez Gordillo, J. y Sánchez Navas, A. Estudio composicional y estructural de las estratigrafías pictóricas. Metodología y Técnicas en la Restauración de Obras Pictóricas del Siglo de oro Español de la Catedral de Almería. Granada: Servicio de Publicaciones de la Universidad. 1992. p. 79-82,
2. Alba Carcelén, L. y González Mozo, A. Uso de la luz ultravioleta para el estudio del estado de conservación de la pintura de caballete. Actas del II Congreso del GEIIC. Investigación en Conservación y Restauración, CD. 2005 noviembre 9-11. Barcelona (España). Universidad de Barcelona. 2006.
3. Agulló Rueda, F. Espectroscopía Raman. La Ciencia y el Arte: Ciencias Experimentales y conservación del patrimonio Histórico. IPCE, Ministerio de Cultura. 2008. p.17-25.
4. Burnstock, A., and T. Learner. Changes in the surface characteristics of artificially aged mastic varnishes after cleaning using alkaline reagents. *Studies in Conservation*, 1992; 37 (3); 165-184.
5. Cremonesi, P.; Bellucci R. L'uso dei tensioattivi nella conservazione en el restauro dei dipinti. *Kermes*; 1995; 24: 55-74.
6. Horie, C. V. (1987). Solvents properties. *Materials for Conservation: Organic Consolidants, Adhesives and Coatings*. London: Butterworths. 1987. p.186-191.

7. Khandekar, N. A survey of the conservation literature relating to the development of aqueous gel cleaning on painting and varnished surfaces. *Reviews in Conservation, IIC*; 2000; 10-20.
8. Masschelein-Kleiner, L. *Les solvants*. Bruxelles: Institut Royal du Patrimoine Artistique. 1983.
9. Mills J.S. White R. *The Organic Chemistry of Museum Objects*. 2nd ed. Oxford: Butterworths. 1994.
10. Pérez-Villares, N.; Bailón Moreno, R; Romero Noguera, J.; Bolívar Galiano, F. y Jurado Alameda, E. Model of cleaning aged varnishes by terpenoid-based aqueous emulsions. CNR, Inst. of Chemical Methodologies Ed. *Proceedings from the 5th International Congress on Science and Technology for the Safeguard of Cultural Heritage in the Mediterranean Basin: Diagnostics and Restoration*; Roma: Valmar. 2011. p.138-142.
11. Sutherland, K. Solvent leaching effects on aged oil paints. Mecklenburg, M.F., Charola, A.E and Koestler, R.J. (Eds.), *New Insights into the Cleaning of Paintings*. Proceedings from the Cleaning. International Conference. Universidad Politécnica de Valencia and Museum Conservation Institute, Washington: Smithsonian Institution Scholarly Press. 2013. p.45-50.
12. Wolbers, R. *Emulsions*. Henry Ling Ltd (Eds). *Cleaning painted surfaces. Aqueous Methods*. 2^a Ed.; London: Archetype Publications. 2000. p.85-108.

CO-124 Sistemática del orden Physarales: Revisión morfológica y primeros avances moleculares

Garciamartín, J.M.; Claudio Moyano S/N, 28014, Madrid; Real Jardín Botánico CSIC; kina@rjb.csic.es
 Aguilar, M.; Edmonton, Alberta (Canadá) T6G 2H7; University of Alberta; aguilarg@ualberta.ca
 Lado, C.; Claudio Moyano S/N, 28014, Madrid; Real Jardín Botánico CSIC; lado@rjb.csic.es

Resumen

El objetivo principal de nuestro trabajo es realizar el primer estudio sistemático del orden Physarales (Amoebozoa, Myxomycetes), que combine datos morfológicos y moleculares.

La identificación inicial de las muestras recolectadas se ha hecho atendiendo a caracteres morfológicos, para lo cual se ha revisado toda la información del grupo publicada hasta el momento con la que, además, se ha generado una matriz de datos cuyo análisis estadístico permitirá conocer las especies conflictivas que no pueden ser clasificadas de este modo.

Pese a ser un buen punto de partida, esta aproximación unilateral ha puesto de manifiesto la artificialidad de la sistemática actual del orden dado que hay especies con rasgos intermedios que no pueden ser asignadas a ningún grupo existente.

De ahí que sea necesario aplicar técnicas moleculares para conocer la identidad de estas especies de forma más precisa. Sin embargo, los análisis moleculares se complican con este tipo de muestras pues es difícil extraer el ADN y, además, suele haber una baja concentración. Por su parte, la amplificación de distintos marcadores (por ejemplo, SSU ADNr) también implica cierto grado de dificultad pues habitualmente están interrumpidos por intrones.

Hasta el momento, este grupo ha conseguido optimizar el procedimiento de extracción de ADN para nuestras muestras, así como la amplificación de determinadas regiones.

El análisis global de la información resultante del perfeccionamiento de la técnica molecular, junto a la taxonomía clásica basada en caracteres morfológicos y la ecología de las especies, podrá ayudarnos a establecer una nueva sistemática filogenética del grupo.

Palabras Clave

Myxomycetes, Physarales, morfología, análisis moleculares, SSU-ADNr, filogenia

1 Introducción

Los Myxomycetes, también conocidos como hongos mucilaginosos, son un conjunto de organismos eucariotas desprovistos de clorofila, caracterizados por su complejo ciclo de vida en el que alterna la fase trófica o asimiladora, el plasmodio (masa de protoplasma acelular, multinucleado, móvil, de vida libre) y la reproductora (cuerpos fructíferos a modo de seta, también denominados esporocarpos).

Estos organismos se han estudiado desde hace siglos, sin embargo, debido al pequeño tamaño de los esporocarpos, así como a la imposibilidad de observarlos durante el resto de fases de su ciclo vital, el conocimiento que se tiene es bastante escaso. No obstante, se cree que se alimentan de bacterias y hongos descomponedores de tejidos vegetales, controlando y regulando sus poblaciones (Feest, 1987).

La dificultad de su estudio ha dado como resultado la aparición de múltiples clasificaciones erróneas a lo largo de la historia (Schaeffer, 1926; Jahn & Bovee, 1965; Jahn *et al*, 1974). De hecho, pese a que la forma en que se alimentan (fagotrofia) es totalmente diferente y presentan crestas mitocondriales tubulares, tradicionalmente han sido considerados hongos, simplemente por el hecho de reproducirse mediante esporas.

Sin embargo, gracias a la aparición de las técnicas moleculares, se ha constatado que los integrantes de la clase Myxomycetes no pertenecen a dicho Reino, sino al Phylum Amebozoa (Cavalier-Smith, 1998), organismos eucariotas caracterizados por la presencia de formas ameboides en algún momento de su ciclo de vida. Dentro de esta clase destaca el orden Physarales, por ser el más diverso y rico en especies, el cual se caracteriza por la presencia de carbonato cálcico en alguna de las estructuras presentes en el cuerpo fructífero.

La clasificación de las especies dentro de este orden se ha hecho exclusivamente sobre la base de rasgos morfológicos, lo que originado el establecimiento de diferentes entidades (morfoespecies), que realmente no debería considerarse “especies reales”, pues el criterio para definir las es absolutamente subjetivo. Esta característica, además, conlleva la imposibilidad de ubicar algunas especies que presentan rasgos morfológicos intermedios en los géneros establecidos de este modo.

Por este motivo, se hace necesario el uso de técnicas moleculares para poder conocer con mayor precisión la identidad de estas especies conflictivas, así como las relaciones que guardan las distintas especies entre sí dentro de este grupo taxonómico.

El objetivo principal de nuestro trabajo es realizar el primer estudio sistemático del orden Physarales que combine datos morfológicos y moleculares, con el que se pueda corregir la artificialidad de la sistemática actual del orden.

2 Materiales y métodos

2.1 Área de estudio y recolección de muestras

Este estudio se enmarca dentro del proyecto Myxotropic, cuya 4^o fase (2012-2014) en concreto, pretende abordar el estudio de los Myxomycetes presentes en las zonas áridas de Perú (viz. desierto costero, los valles áridos interandinos y la vertiente occidental de la Cordillera Andina, los cuales constituyen la zona árida Neotropical más próxima al Ecuador). Se muestreó un total de 128 localidades situadas en las zona centro-sur del país, abarcando un amplio gradiente altitudinal (desde el nivel del mar hasta los 5.000 metros)

El muestreo consistió en la búsqueda de Myxomycetes fructificados directamente sobre material vegetal en descomposición, usando para su observación un cuentahilos y seleccionando los tipos de material vegetal dominantes en ambientes áridos (e.g. cortezas del género *Polylepis* sp, restos de cactáceas (e.g. *Melocactus* sp., *Haageocereus* sp.), gramíneas (e.g. *Stipa* sp., *Poa* sp.) y restos de bromeliáceas endémicas (viz. *Puya raimondii*).

Se tomaron pequeños fragmentos de los tejidos vegetales en los que se detectó la presencia de Myxomycetes fructificados, usando tijeras de podar (tejidos más duros), navaja o pinzas finas. Se desechó todo aquel material deteriorado, inmaduro, viejo o atacado por hongos u otros organismos.

Para evitar el deterioro de las muestras, cada fragmento vegetal recolectado se pegó en una tira de cartulina, que posteriormente fue fijada en una caja de cartón (habitualmente usada para conservar el material en el herbario). Una vez en el laboratorio, se asignó un código numérico a cada caja y se identificó cada caja con una etiqueta en la que aparecen datos correspondientes a localidad, altura, coordenadas geográficas, fecha de recolección, sustrato, nombre del recolector y datos ecológicos.

Por otro lado, también se tomaron muestras de sustrato en las que no se observaron fructificaciones, para su posterior cultivo en laboratorio.

2.2 Identificación morfológica

Para realizar una identificación inicial de las muestras fructificadas, se observaron las características morfológicas de cada una de ellas al microscopio óptico, así como el electrónico de barrido (fundamentalmente en el caso de la ornamentación de las esporas y el tipo de capilicio). Como referencia se tomaron distintas obras bibliográficas especializadas (Macbride & Martin, 1934; Martin & Alexopoulos, 1969; Nannenga-Bremekamp, 1991).

Por otro lado, las muestras de sustratos fueron colocadas en cámaras húmedas para su cultivo, recibiendo luz indirecta. El monitoreo de los cultivos se inició a las 24 horas usando un estereomicroscopio, y controlando el grado de humedad periódicamente. Una vez que los cultivos fructificaron se procedió como en el caso anterior.

2.3. Base de datos morfológicos y estudio estadístico

Se ha recopilado toda la información bibliográfica (incluyendo los artículos científicos más recientes) de todas las especies descritas hasta el momento a nivel mundial, para construir una base de datos morfológicos. Para facilitar el tratamiento de esta información, se ha revisado la nomenclatura y estandarizado la terminología usada en las descripciones de especies, habiendo considerado la existencia de sinónimos homo y heterotípicos con la finalidad de no considerar una misma morfoespecie varias veces. Para ello hicimos uso de *Nomen.Eumycetozoa*, un sistema de información nomenclatural desarrollado por miembros de este grupo (Lado, C. 2005-2014), disponible en <http://eumycetozoa.com/data/index.php>.

Dicha base está siendo transformada en una matriz de datos mediante un sistema de codificación numérico (1= presencia de un carácter determinado/1= ausencia). Esta matriz será analizada estadísticamente mediante un análisis clúster con el que se pretende clasificar las distintas especies en grupos homogéneos. Las “especies conflictivas” que no puedan ser ubicadas en ninguno de los grupos establecidos, así como aquellas que sean clasificadas en un grupo al que según bibliografía no pertenecen, serán sometidas a estudios moleculares.

NOTA: en estos momentos estamos finalizando el proceso de codificación de la base de datos, con lo cual aún no hemos podido realizar el análisis estadístico de la matriz resultante, que nos permitirá detectar las anteriormente denominadas “especies conflictivas”. Sin embargo, y debido a causas externas, hemos tenido que comenzar los estudios moleculares. Para ello, se ha hecho una selección de varias especies pertenecientes a los géneros *Fuligo* sp. y *Didymium* sp., que por conocimiento previo, sabemos que se comportan como tal.

2.4. Estudios moleculares

2.4.1. Extracción de ADN y amplificación de los marcadores moleculares

El ADN contenido en las esporas ha sido extraído a partir de un número variable de cuerpos fructíferos (dependiendo de su abundancia en cada una de las muestras seleccionadas) usando el kit comercial DNeasy Plant minikit (Qiagen, Estados Unidos). Las muestras fueron incubadas en tampón AP1, a 65°C durante 24 horas, tras lo cual fueron congeladas y finalmente trituradas con un martillo eléctrico (Fiore-Donno et al., 2010). Tras añadir un volumen adicional de AP1, el resto de pasos del proceso de extracción se hicieron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Como marcador molecular se ha seleccionado el gen que codifica la subunidad pequeña del ribosoma (SSU-ADNr, en adelante SSU), entre otros motivos por ser de copia múltiple. Para ajustar los parámetros necesarios para que la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sea efectiva, se han probado los siguientes métodos y reactivos:

- a) “PCR-Touchdown” (Korbie & Mattick, 2008)

- b) PCR con gradiente de temperatura
- c) Adición de la polimerasa tras el primer ciclo de hibridación
- d) Variación en la duración de cada paso y el número de ciclos.
- e) Utilización de distintos tipos de polimerasa:
 - TaqMan Universal PCR Master mix (Applied Biosystems)
 - PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare)
 - MyTaq Red Mix (Bioline)
- f) Volumen de ADN añadido en cada reacción: 1 μ L, 3 μ L, 5 μ L y 10 μ L.

El éxito de la amplificación del fragmento SSU fue comprobado corriendo los productos de cada reacción PCR en un gel de agarosa al 1%. Todas aquellas reacciones positivas fueron enviadas a secuenciar a los servicios de MACROGEN (Corea del Sur), con los mismos primers usados para en la amplificación.

2.4.2. Análisis filogenéticos

Las secuencias que se han obtenido hasta el momento han sido editadas manualmente en Bioedit versión 7.0.5.3. (Hall, 1999), tras lo cual se alinearon automáticamente usando la versión en línea de MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>). El conjunto de secuencias generadas en este estudio serán incorporadas en la base de datos de Genbank con un número de acceso correspondiente.

Seleccionaremos el mejor modelo de sustitución de nucleótidos, teniendo en cuenta el criterio de Akaike, usando el programa jModeltest (Darriba et al., 2012). Tras ello, se correrá el análisis de Maximum likelihood con el programa PhyML (Guindon & Gascuel, 2003).

En cuanto a la aproximación bayesiana, usaremos el programa MrBayes v3.2 (Ronquist et al., 2012). Se pretende programar 4 corridas simultáneas con 10000000 de generaciones usando el método de Montecarlo basado en 4 cadenas de Markov (MCMC). La convergencia de las MCMC será examinada en Tracer v. 1.5 (Rambaut & Drummond, 2009). Usaremos la combinación de los valores de bootstrap y las probabilidades posteriores para comprobar el soporte de cada rama obtenida en el árbol de genes (Lutzoni et al., 2004), que será visualizado y editado en FigTree v1.3.1. (disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

3 Resultados preliminares

3.1 Recolección de muestras

En la fase actual del proyecto, se ha llevado a cabo un amplio e intensivo muestreo de la mayoría de zonas áridas de Perú, habiéndose recolectado más de 1500 muestras de Myxomycetes directamente fructificados en campo, y cerca de 350 muestras de sustratos (restos de cactáceas, plantas suculentas, especies endémicas, especies de ambientes extremos, etc.) para su posterior cultivo en laboratorio.

Además, en fases anteriores, se han catalogado un total de 100 especies, citado 26 registros nuevos en la región Neotropical y se han descrito 8 especies nuevas para la ciencia.

3.2 Base de datos

Hemos obtenido una base de datos en la que hemos condensado toda la información morfológica relativa a todas las especies del orden Physarales descritas hasta el momento, en total 398 morfoespecies. Por su lado, el número de variables consideradas asciende a 117 (entre ellas, tipo de fructificación, presencia de estípites, tipo de capilicio, tamaño y ornamentación de las esporas, presencia de columella, etc.).

3.3 Estudio molecular

Se ha diseñado un conjunto de cebadores específicos para nuestro grupo de estudio que consta, hasta el momento, de 10 parejas de primers.

Tras numerosas pruebas se ha logrado la optimización de la PCR para nuestras muestras. Concretamente, se ha observado que las "Touchdown-PCR" no siempre permiten la amplificación del marcador SSU, teniendo mayor éxito cuanto mayor es la temperatura de *annealing* seleccionada.

De igual modo, se ha comprobado que las muestras sometidas a mayores temperaturas (en nuestro caso 58°C y 60°C) en una reacción PCR con gradiente, eran positivas con mayor frecuencia que aquellas llevadas a cabo a temperaturas más bajas.

Por su parte, la adición de las distintas polimerasas tras el primer ciclo de hibridación reportó resultados positivos en casi todas las reacciones. En cuanto a los tipos de polimerasa usadas en nuestro estudio, aquella que resultó en un mayor número de reacciones positivas fue la que contiene el MyTaq Red Mix, seguida de la existente en el complejo PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads y finalmente la del kit TaqMan Universal PCR Master mix.

Finalmente, parece evidente que cuanto mayor es el volumen de ADN molde que se añade a la reacción, mayor es su éxito: las reacciones en las que sólo añadimos 1 µL de ADN fueron negativas en todos los casos, mientras que con un volumen de 3 µL, casi la mitad de las muestras amplificaron. Con volúmenes mayores a 3 µL, la intensidad de la banda es mayor, aunque aún existían muestras que no amplificaron.

El cómputo general de todas las reacciones positivas que hemos conseguido generar tras las diversas pruebas mencionadas asciende a 72 secuencias de SSU pertenecientes a los dos géneros estudiados hasta el momento.

4 Discusión

A lo largo de muchos años de estudio, este grupo de investigación ha detectado la existencia de un gran número de especies (tradicionalmente consideradas como integrantes del orden Physarales) con características intermedias y que, por tanto, no pueden ubicarse de forma inequívoca en ninguno de los géneros actualmente aceptados dentro del orden.

Tomando esto en consideración y teniendo en cuenta además las limitaciones a las que nos enfrentamos (escasez de estudios previos sobre el orden Physarales, dificultad para extraer ADN y baja concentración en las muestras, imposibilidad de usar cebadores universales, etc.), pretendemos establecer las bases para el estudio de estos organismos a nivel molecular, lo cual nos permitirá hacer estudios filogenéticos con los que podremos identificar las distintas especies de este orden, así como las relaciones que éstas guardan entre sí.

Por ello, pese a que nuestro estudio se encuentra en una fase muy inicial y únicamente podemos hablar de resultados preliminares, creemos conveniente resaltar lo siguiente:

El marcador SSU, una macromolécula ampliamente utilizada en estudios de filogenias por estar altamente conservada en eucariotas, presenta la ventaja de ser un gen multicopia, un factor importante en este tipo de organismos en los que la cantidad de ADN no es elevada, por lo que parece adecuado usarlo como primera aproximación. Sin embargo, en la mayoría de los Physarales que ya han sido caracterizados molecularmente, se ha observado que este gen presenta múltiples intrones (por ejemplo, en *Diderma niveum* está interrumpido por 22 intrones, mientras que en *Lepidoderma tigrinum* un asombroso 70% de su secuencia se corresponde con ADN no codificante (Fiore-Donno et al., 2008, 2010).

Esta circunstancia unida al hecho de que las filogenias basadas en un solo marcador molecular no son fiables, puesto que cada gen ha sido moldeado por distintos factores a lo largo de la evolución de forma independiente (Rokas et al., 2012), hace necesaria la búsqueda de otros marcadores que puedan ser usados simultáneamente obteniendo filogenias basadas en varios genes sin incongruencias entre sí.

Por otro lado, en cuanto a la técnica usada hemos constatado que la adición de cualquiera de las polimerasas probadas en este estudio tras el primer ciclo de hibridación, en lugar de hacerlo al principio de la reacción como es habitual, parece favorecer la acción de dicha enzima, y con ello, la amplificación de SSU. Sin embargo, este proceso es inviable cuando el número de muestras es elevado, como es el caso, dado que implica el cese momentáneo de la reacción PCR para añadir la polimerasa y reiniciar el proceso.

Tras comprobar que la amplificación de las mayoría de muestras estudiadas se ve favorecida por las temperaturas más elevadas (tanto en las « Touchdown-PCR », como en las PCR convencionales simples), proponemos un rango de entre 58°C y 60°C como temperaturas óptimas para la amplificación de SSU en nuestras muestras. De igual modo, se ha visto que sería conveniente usar un volumen de ADN mayor al habitual (1 µL).

En cuanto a los tipos de polimerasa usadas en nuestro estudio, como se ha mencionado en la sección anterior, aquella con la que conseguimos un mayor número de reacciones positivas fue la que contiene el MyTaq Red Mix, seguida de la existente en el complejo PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads y finalmente, TaqMan Universal PCR Master mix. No podemos dar una explicación a esta notable diferencia, aunque probablemente se deba a que cada una de ellas es más eficiente en un determinado intervalo de temperatura, en el cual las otras pueden perder su funcionalidad.

Pese a que estimamos que nuestros resultados preliminares son válidos y van a permitirnos hacer un estudio filogenético piloto con el que esperamos poder vislumbrar la clasificación general lo más natural posible de nuestro grupo, la cantidad de secuencias de ADN obtenidas no es demasiado alentadora. Por este motivo, es prioritario para este grupo de investigación encontrar otros marcadores moleculares con la variabilidad adecuada a nivel de orden, así como refinar otros parámetros de PCR que nos conduzcan a un mayor número de reacciones positivas.

Por otro lado, no sería raro obtener incongruencias entre nuestros resultados moleculares y la clasificación taxonómica actual, motivo por el cual estimamos necesario estudiar estos datos en un contexto ecológico, ya que esta información podría explicar posibles patrones morfológicos diferentes dentro de una misma especie.

5 Conclusiones

Los datos preliminares apuntan a que la taxonomía basada en caracteres morfológicos, aun siendo un buen punto de partida, no puede resolver la sistemática del orden Physarales por sí sola. Además, no podemos obviar que tradicionalmente se han estudiado las características de los cuerpos fructíferos sin atender a otras fases del ciclo como pueden ser los plasmodios, amebas o las formas de resistencia. En cualquier caso, dado que la taxonomía clásica basada en caracteres morfológicos no es una ciencia objetiva, ésta se antoja insuficiente para conocer la identidad real de las especies de este orden, así como para establecer las relaciones que existen entre ellas. Esta circunstancia hace necesario el uso y perfeccionamiento de la técnica molecular, con la identificación de otros marcadores moleculares con la variabilidad apropiada para nuestro nivel estudio como próximo objetivo y el tratamiento de todos los datos generados en un contexto ecológico.

6 Referencias

1. Cavalier-Smith, T. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Phil. Soc.* 1998; 73, 203–266.
2. Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 2012; 9:772.
3. Feest, A. The quantitative ecology of soil Mycetoza. *Progress in Protistology* 1987; 2:331–

361.

4. Fiore-Donno, A.M, Meyer, M., Baldauf, S.L., Pawlowski, J. Evolution of dark-spored Myxomycetes (slime molds): Molecules versus morphology. *Mol Phylogen Evol* 2008; 46:878–889.
5. Fiore-Donno, A.M. *et al.* Deep Phylogeny and Evolution of Slime Moulds (Mycetozoa). *Protist*, 2010; 161: 55–70.
6. Guindon, S., Gascuel, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003; 52:696-704.
7. Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41:95-98.
8. Jahn, T.L., Bovee, E.C. Mechanisms of movement in taxonomy of Sarcodina. I. As a basis for a new major dichotomy into two classes, Autotractea and Hydraulea. *American Midland Naturalist*. 1965; 73(30): 30-40.
9. Jahn, T.L. *et al.* Taxonomy and evolution of the Sarcodina: a reclassification. *Taxon* 1974; 23: 483-496.
10. Korbie, D.J; Mattick, J.S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protocols* 2008; 3(9):1452-145.
11. Lado, C. An on line nomenclatural information system of Eumycetozoa. 2005-2014. <http://www.nomen.eumycetozoa.com>.
12. Lutzoni, F. *et al.* Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *Amer J Bot* 2004; 91:1446-1480.
13. Macbride, T.H., Martin, G.W. *The Myxomycetes*. New York: Macmillan Co. 1934. 339 p.
14. Martin, G.W., Alexopoulos, C.J. *The myxomycetes*. University of Iowa Press, 1969. Iowa City. 477 p.
15. Nannenga-Bremekamp, N. E. A Guide to Temperate Myxomycetes. *Nordic Journal of Botany*, 1991; 12: 500.
16. Rambaut, A., Drummond, A.J. Tracer Version 1.5. 2009. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
17. Rokas, A., Williams, B.L., King, N., Carroll, S.B. 2012 . Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. Ronquist, F. *et al.* Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol.*, 61:539-542.
18. Schaeffer, A.A. Taxonomy of the Amebas. Publ. No. 345, Dept. Mar. Biol., Carnegie Institution of Washington 1926; 24: 3–112.

CO-126 Securitization, credit and house prices: Spanish evidence

Cuadros-Solas, Pedro Jesús,

Facultad de CC.Económicas y Empresariales Campus Cartuja s/n, 18071 – Granada (España) Despacho D-06, Universidad de Granada, pjuadros@ugr.es

Abstract

The current financial crisis has provided us the chance to observe some recent trends in securitization, the credit channel and house prices that allow us note a possible relationship among these variables as crisis causes. After a literature review we analyze the evolution of these trends in Spain, in which these trends happened with intensity. Our paper helps understanding the three way relationship pointing out Spanish distinctive features. Thanks to a macroeconomic data analysis we suggest that securitization growth was linked to a credit expansion especially directed towards households and real estate activities that caused a house price bubble. One purpose of this paper is to highlight econometric approaches performed in the literature to relate the abovementioned variables and mainly propose the use of ARDL (Autoregressive Distributed Lag) to study a long-run relationship between mortgage loans and house prices in Spain. We have made the choice based on the method advantages and successful applications in other fields.

Keywords

Securitization; credit channel; house price; mortgage loans; risk; ARDL.

1 Introduction

The current global crisis started in the summer of 2007 as the so-called “subprime mortgage crisis” in United States. Thenceforward, the mortgage crisis turned firstly into a financial crisis and then into a global crisis. There have been a range of causes in the origin of this situation. Notwithstanding, some factors have been blamed repeatedly for causing this economic situation.

Securitization, credit expansion and house price growth have been particularly identified among the main determinant factors of the current state of economic difficulties. The crisis has generated a concern on the relationship that exists among securitization, credit expansion and housing prices. Most of the studies have been focused on United States as being the origin of the subprime mortgage crisis as well as being the greatest world economy. However Europe was also highly affected by these relationships, especially some countries like Spain. The Spanish case is peculiar in several aspects, so that this is the reason that encourages us to analyze the Spanish experience in detail.

Our paper helps understanding what happened in Spain before the crisis proposing a possible econometric approach to study empirically the observed relationships. The paper is structured in four sections following this introduction. Section 2 surveys the main literature on securitization, credit channel and house prices dynamics. In Section 3, the Spanish case is discussed. A review of empirical approaches used before linked to a methodology proposal completes Section 4. The paper ends up in Section 5 with some concluding remarks.

2 Literature review

Securitization is the activity that consists on transforming illiquid and non tradable assets into liquid and tradable ones. So basically securitization transforms assets. The range of assets that can be securitized has evolved over time. Traditionally securitization was referred to traditional banks' loans but as the financial innovation wave was taking place other assets like

mortgages, commercial loans, credit cards receivables, auto loans or student loans were also securitized. The process of securitize an illiquid assets results in an newly created liquid asset, named Asset Backed Security (ABS), that is created packaging together part of the bank balance sheets' assets considered illiquid. Securitization has been studied using different approaches however there are some concrete issues that have received a preferential attention. The vast majority of topics studied have connected the increase experienced in the number of assets securitized by financial intermediaries with the financial crisis. The diversity of approaches makes recommendable to distinguish among different discourses when a literature review of is expected to be fulfilled..

2.1 What drives securitization?

First of all, the literature has focalized on what reasons drive financial firms to securitize assets. Following a theoretical perspective some academic studies have proposed economic models able to present an explanation of this matter. Securitization is driven by short and long run forces naming some factors that affect securitization –increased competition, institutionalization of savings, growing investor sophistication, volatility in financial asset prices – and arguing that these factors have changed the traditional financial intermediation (Cumming, 1987).

Analyzing the predicted benefits from a theoretical perspective emerge a number of securitization triggers mainly classified into four drivers' forces: search of new funds or liquidity, reduction in capital requirements, transfer of credit risk and improvements in profitability.

According to the liquidity hypothesis, the financial economic theory argues that due to securitization funds can be obtained because a transformation is carried on. Securitization allows the originator bank to obtain liquidity transferring assets to a Special Purpose Vehicle (SPV) that then will issue the security. By means of this transfer, banks remove these assets from their balance sheets. In return they obtain funds that can be lent again or can be used to reinforce their solvency.

The hypothesis based on using securitization to reduce the capital requirements hold by banks hypothesize that banks that securitize assets improve their capital to assets ratio therefore regulators will require them less capital to be kept in the balance sheet. Nevertheless, changes in regulation like improvements in the risk capture achieved in Basel II and Basel III have made more difficult to support a securitization decision based on this hypothesis.

Table 1. What drives securitization?

Hypothesis	Paper	Time period	State
Liquidity	Martín-Oliver & Saurina (2007)	99 - 06	Spain
	Bannier & Hänsel (2008)	97- 04	Europe
	Cardone – Riportella et al. (2010)	00 - 07	Spain
	Panetta & Pozzolo (2010)	91 – 07	World
	Agostino & Mazucca (2011)	00 – 06	Italy
	Casu et. al (2011)	01 – 04	U.S
	Sagarra et. al (2012)	99 - 07	Spain
Regulatory capital requirements	Calomiris & Mason (2004)	97 – 04	Europe
	Ambrose et al. (2005)	95 – 97	U.S
	Uzun & Webb (2007)	01 - 05	U.S
Risk Transfer	Minton et al. (2004)	93 - 02	U.S
	Bannier & Hänsel (2008)	97 - 04	Europe
	Panneta & Pozzolo (2010)	91 - 07	World

	Sagarra et al. (2012)	99 - 07	Spain
Performance	Cardone – Riportella et al. (2010)	00 –07	Spain
	Panetta & Pozzolo (2010)	91 - 07	World

The essence of the securitization activity allows financial firms to transfer part of their risks to investors and so for the financial system. The idea of using new financial instruments – including securitized assets– as a new method of managing and transferring risk is considered one of the benefits that securitization provided.

Lastly, the relationship between securitization driving forces and profitability opportunities has not been as studied in the literature as others forces. This hypothesis is based on some models. Financial institutions that seek improvements in their performance via increasing their return on capital will be more inclined to securitize assets (Wolfe, 2000).

The empirical papers that have tested these hypotheses arrive to different conclusions as can be observed in Table 1.

2.2 Securitization, monitoring incentives and risk

Another important prolific strand of the literature has paid attention to the ex-post effects that securitization has had into screening incentives and the risk transferred to the financial system. The ultimate aim of this branch is to be able to answer to these two questions: Does securitization alter the screening incentives for the originators? And is the financial system riskier due to securitization?

With regard to the monitoring issue, the delegated monitoring models, assets are illiquid because if there are not and there is a loan sale, the screening is also transferred (Diamond, 1984). If they were not transferred the costs associated with monitoring would be duplicated. In this sense, the securitization activity is supposed to change the monitoring function of financial intermediaries. In order to prevent the moral hazard problem to appear there must be proper incentives to screen a lender (Holmstrom & Tirole, 1997). More recent papers have linked tightly securitization with screening incentives.

Before the outbreak of the financial crisis and while the financial sector was living in the peak of the financial innovation wave Rajan et al. (2010) pointed out that was arising a misalignment in the taking risk incentives. This misalignment according to him was affecting the screening function.

Keys et al. (2010) study empirically subprime mortgage loans' contracts in the United States. According to their results they come to the conclusion that securitization had a negative effect in the monitoring activity taken by borrowers underlying that securitization increases default rates. Having as reference the Originate-to-Distribute (OTD) model in the United States the massive assets securitization generated lax screening incentives for banks (Purnanandam, 2010). The implications that securitization has in the soft information hold about the borrowers is also addressed in the literature from a microeconomic approach [6]. Their theoretical model suggests that as securitization increases, the soft information held about their borrowers is reduced. This claim is consistent with the idea that as time goes by loans were granted to worse borrowers. However, the proposition that securitization leads to a lax screening is contravened in Malamud et al. (2013). They argue that optimally designed contracts provide screening incentives for intermediaries.

The theorists have been generally consistent with the thought that securitization has a negative effect in the risk taken. The existence of a range of derivatives provided by the financial innovation, offers a chance to acquire more risks because they are feasible to the transferred (Instefjord, 2005). But since not all of the incremental risks taken are transferred, the risk exposure of banks also increases.

Some other authors have paid attention to the systematic bank risk (Franke & Krahen, 2006; Haensel & Krahen, 2007 and Uhde & Michalak, 2010) while others have done to the systemic risk of the financial sector (Brunnermeier & Sannikov, 2012 and Nijskens & Wagner, 2011).

2.3 Securitization and House Prices

As has happened in the past with other financial crisis there is always a bridge that connects the financial sector of the economy with the real sector. In the case of the financial crisis of 2007 this connection appears to have taken place with the relationship between the sub-prime mortgage market and house prices.

When the apparent threats for the financial stability became real the contagion effect rapidly affected the housing sector, which by that moment was living in a bubble. The creation of this kind of bubbles in assets prices has preceded a financial crisis in so many cases. In the past there have been many examples of bubbles on assets prices: Japan (1980's and 1990's), Scandinavian countries (1980's) – Finland, Norway and Sweden – or Mexico (1990's). Many papers have studied the relationship between bubbles and subsequent crisis.

The recent literature, appeared in the aftermath of the crisis, has paid more attention to this topic trying to discover in what extent exists a relationship between the credit expansion and house prices. The transmission channel that seems to have taken place apparently starts with the securitization growth. Banks' seek of new assets to securitize lead them to increase their credit supply, providing funds to a larger amount of borrowers. Most of these credits were granted to people that were looking forward to buy a house, taking the legal form of a mortgage loan. The excessive amount of funds given to people generated a demand excess in the housing sector provoking an increase in house prices. Real estate prices continued their rise until the bubble burst. The process described above appears to be the one that took place in United States and also in some European countries –Spain and Ireland. Down the literature there have been many models based on the study of housing prices dynamics.

Different models have related the mortgage credit and the house prices, mainly individual country studies, but it has not been extended to securitization. The relationship between mortgage and house prices is addressed in (Goodhart, 1995; De Greef & De Haas, 2000; Collyns & Sanhadji, 2002; Hofmann, 2004; Gerlach & Peng, 2005; Fitzpatrick & McQuinn, 2007; Coleman et al. 2008; Oikarinen, 2009 and Gimeno&Martínez-Carrascal,2010; Carbó-Valverde & Rodríguez-Fernández, 2010).

3 The Spanish Experience: Is Spain Different?

3.1 Spain in the context of a global securitization trend

The securitization boom experienced in Spain cannot be explained as an isolated phenomenon that merely affected this Southern European country. An appropriate analysis of the Spanish case should be contextualized with the facts that happened in Europe and also in the United States.

The securitization upsurge registered from 2000 to 2007 had its origin in the United States. There are many reasons able to explain why United States was converted into the breeding ground for its growth. Some features of the American economy can be named as determinants. The upsurge in the securitization activity can be shown through the observation of the securities issuance between 2000 and 2006. During this period, the highest level of issuance took place. In 2000, the total value of Asset Backed Securities (ABS) issued in the United States was close to 281.050,90 millions of United States dollars (USD) while in 2006 the issuance reached the 753.875,90 millions of USD. The growth rates undoubtedly show that the spectacular increases in ABS issuances in the United States were much more elevated than in Europe in absolute terms.

Table 2. Total ABS issued in USD millions

	2000	2006	Annual Growth Rate
United States	281.050,90	753.875,90	17,87%
Europe	12.905,48	80.626,40	35,71%

Sources: AFME & SIFMA Members, Bloomberg, Thomson Reuters, prospectus filings, Fitch Ratings, Moody's, S&P, AFME & SIFMA

The securitization phenomenon was not homogeneous in the whole Europe. It is undoubted that this trend arrived to almost all of the European countries but not all of them were affected in the same magnitude. So, while some European countries were not fully seduced by this new financial innovation in others the boom was remarkable. The peak of the securitization boom in Europe took place in 2008, when the record issuance values were registered. Comparing the securities issuances in 2008 with the ones issued in 2000 and 2006 the increase is significant in all of the countries but the highest values are registered in the United Kingdom and Spain. The spectacular growth in securitization activity was also remarkable in Germany and Italy. However, significant is the case of France, an important European economy that did not experience this boom.

Table 3. Total securities issued in USD millions

	2000	2008	Annual Growth Rate
United Kingdom	35.532,95	397.228,43	35,22%
Spain	7.319,19	148.412,84	45,67%

Sources: AFME & SIFMA Members, Bloomberg, Thomson Reuters, prospectus filings, Fitch Ratings, Moody's, S&P, AFME & SIFMA

As abovementioned, Spain was the second European country by private bonds issuance. Before 1998 Spanish Laws allowed just mortgage loans' securitizations. So before this year there were just two kinds of Special Purpose Vehicles (SPVs) in Spain: Mortgage Loans Securitization Funds (FTH) - to securitize mortgage loans - and Nuclear Moratorium Assets Securitization Funds (FTMN) - to securitize compensation rights for the nuclear moratorium. The Royal Decree 926/1998 opened securitization to non mortgages loans. The continuous growth occurred at the same time as the fixed income markets gained ground. The favorable atmosphere that prevailed during this period – monetary integration, reduction of the crowding out effect, increasing demand of mortgage loans, economic prosperity – contributed positively to the securitization trend.

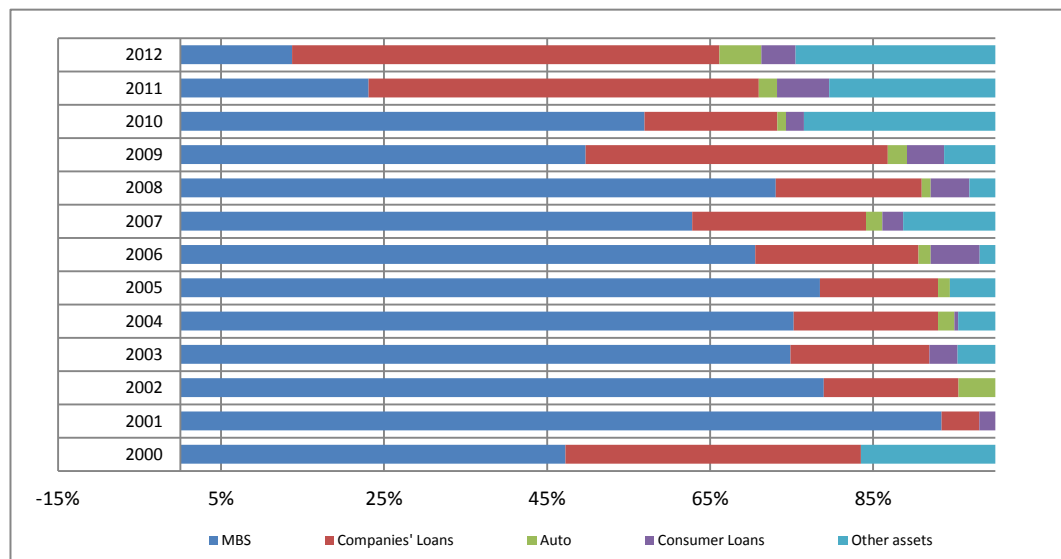


Figure 1. Proportion of issuances by the kind of assets securitized in Spain. Nominal issuances' values (2000 - 2012). Percentage
Sources: CMNV and own elaboration.

Analyzing the characteristics of securitization in Spain, an interesting aspect is the kind of assets securitized. As have been discussed, until 1998 mortgage loans were the only assets allowed to be securitized. Therefore, the private bonds market was dominated by MBS's issuance. About 70% of the total Spanish issuances corresponded to bonds that securitized mortgage loans. This tendency was observable from 2001 to 2008. During this period of time it seems to emerge a process that feeds back on itself. The search of liquidity led Spanish fi-

nancial firms to opt for securitization. With the funds collected they expanded the credit supply, especially banks granted loans for home purchase. These mortgage loans were again ready to be securitized. Therefore, banks obtained funds to finance their credit supply so the circle was created.

The MBS' protagonist role underwent a reduction since the crisis burst in 2008 as can be seen in Figure 1. The MBS's share of 70% gave way to the 50% or even less in 2011 and 2012. At the same time the proportion of companies' loans occupied the place left by MBS. Hence, in Spain while the mortgage credit was experiencing its peak, the issued bonds were mainly composed by mortgage loans. But when the approval rate of mortgage loans declined, companies' loans gained importance as securitized.

Another aspect worthy to be studied is who was behind the origination of assets. The Spanish banking system has been characterized by the key role played by savings banks and credit cooperatives. Especially savings banks have controlled a great part of the Spanish financial system up to register a market share slightly higher than 50%. Therefore, this kind of firms has had a great role in deposits and credits but we can ask ourselves if they also have had it in the issuance of private bonds and securities. In any way, it seems reasonable to think that of course they have had also an importance role in the securitization boom.

From 2000 until then, savings banks and cooperatives originated on average more than 50% of total securitized assets while banks were close to 37%. But from this point forward the reduction on the position of savings banks and cooperative was drastic. Then, as they were the most affected by the financial difficulties, their securitization activity was weakened. Savings banks and credit cooperatives moved to 34% on average while commercial banks and non financial societies took up the place they left.

3.2 The credit market in Spain: Special reference to the mortgage credit market

Even if a financial crisis is not caused by a single factor the combination of some of them at the same time fosters the appearance of financial distresses. In this sense, strong theoretical foundations have allowed a strand of the literature to link credit supply, house prices bubbles and financial crisis (Hofmann, 2004; Allen & Gale, 2000 and Büyükkarabacak & Valev, 2010).

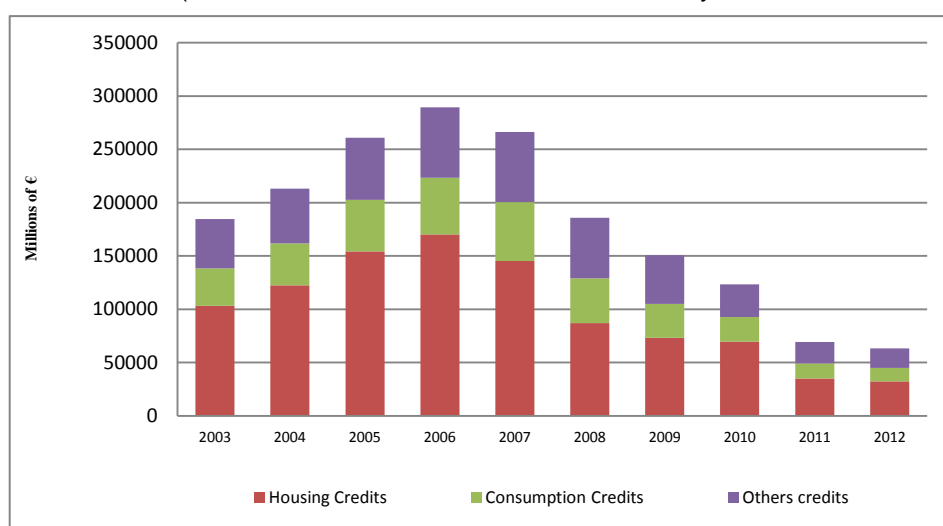


Figure 2. Evolution of new credits granted to households, non financial societies and non-profits organizations by kind of credit purpose. Annual data. (2003 – 2012). Millions of euro.

Sources: Bank of Spain and own elaboration.

Therefore, the credit evolution in Spain is crucial in our analysis. What happened in the Spanish credit market before the crisis can be illuminating. The credit expansion directed towards households was significant. New credits transactions directed towards households, non financial societies and nonprofits organizations experienced a growth as can be seen in Fig-

ure 2. However, the majority of the new credits had a clear destination: the housing market. The credit boom in the housing market was taking place. This fact made the familiar indebtedness reached record values.

In Spain, as in many countries, due to elevated house prices, home purchases are funded by the constitution of a mortgage, so most of the loans granted are collateralized by the property. Thence, the evolution in the volume of constituted mortgages is a good indicator of how the credit market performed particularly the credit directed towards home purchase. Since in Spain it is compulsory to register the mortgage constituted in a Public Property Registry the evolution in the number of mortgages is easily measured.

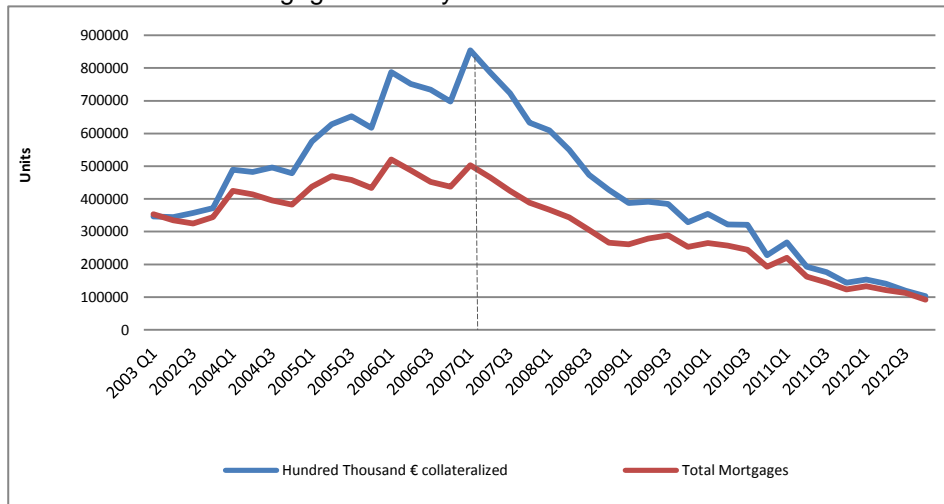


Figure 3. Evolution of total mortgages constituted in Spain and total amount of credit mortgages constituted in hundred thousand Euros. Quarterly data. (2003:Q1 – 2012:Q4). Units
Sources: Spanish Statistical Office and own elaboration.

The number of mortgages registered underwent a remarkable rise since 2000. This growth was continuous until the first quarter of 2007. The growth was twofold: the number of constituted mortgages rose and as expected the total volume of mortgage credit collateralized too (Figure 3). However, the increase experienced in the number of mortgages was lower than the increase in the total value of the mortgage credit. In the first quarter of 2003 credit mortgages were granted with an average nominal value of one hundred thousand euro (100.000 €). Whereas in 2007 each mortgage credit rose up its average nominal value to one hundred and seventy thousands euro (170.000 €).

This suggests that more people accessed to credit and higher amounts were granted to these borrowers. However, the credit expansion represented by the augmentation in mortgages loans found its end when the subprime crisis burst in the United States. Some bonds held by financial firms contained subprime credits. These low-quality bonds were in many cases repacked in Collateral Debt Obligations (CDO) leading to junk bonds. These bonds were dispersed geographically so the contagion effect was significant all over the world financial system. The complexity and opacity created made difficult to distinguish among firms that owned these toxic assets from the ones that did not own them. The global uncertainty affected the interbank market. Banks were reluctant to lend money among them provoking a collapse in the interbank market. The string of these events drove financial firms to opt for turning off the credit tap. This explains in part why the credit evolution seen in previous figures decreases from 2007 in Spain.

3.3 Evolution of Deposits in Spain

In the analysis of the Spanish financial situation it is important to consider what happened with the deposits. Traditionally, deposits have been the main funding source for credit institutions. The traditional banking system is based on capturing deposits provided by households and then lend these funds to other sectors (financial intermediation function). In the last decade this role appears to have changed. The evolution of deposits helps to understand this change. The Spanish banking sector had been increasing its size over time, which means

that credit institutions needed more funds to finance its activity. More deposits were required to sustain the increasingly size.

During the years prior to the financial crisis deposits grew less than they should have been to maintain the credit expansion. There was a stagnation in the deposits growth. So if deposits have not kept the pace of the credit activity what could be thought is that banks have obtained funds from others sources.

Since the securitization was chiefly driven in Spain by financing reasons we are able to argue that these funding needs generated by the high credit activity could have been provided by financial innovations mechanisms like securitization. This suggests that securitization allowed the credit expansion in Spain.

3.4 Spanish Housing Market

As we have abovementioned, during the years prior to the crisis there was a credit expansion in Spain. We have to point out that the credit expansion was not homogeneous. Not all of the resident sectors were recipients of funds. Funds were mainly directed towards Spanish households with the purpose of financing home purchases. Due to this arrival of credits towards households, the house demand experienced a great growth. Taking into account that the households' access to home market is highly determined by the access to credit, the house demand will be affected by changes in the credit conditions. Considering all these aspects what could be expected is a positive relationship among credit and house demand. So considering the demand side, if the house demand increases and more people can afford a home purchase, house prices will increase.

Notwithstanding, an increase in the demand is not the only driver for changes in prices. The supply side also had an important role. Apart from households during the years prior to the crisis the building sector and real estate activities also received important credits to finance the construction of new houses. In the last quarter of 2007 and also the first quarter of 2008, 25,96% of the total outstanding credits in the balance sheets of Spanish credit entities corresponded to building and real estate activities.

The construction of new houses initiated as well as finished from 2000 to 2007 reached historic values (Figure 4). As a result of this intense building activity the stock of houses increased in Spain dramatically. So the increase in the supply is also likely to be explained by the credit expansion, in this case, directed towards building and real estate activities. Credit fostered both; demand and supply.

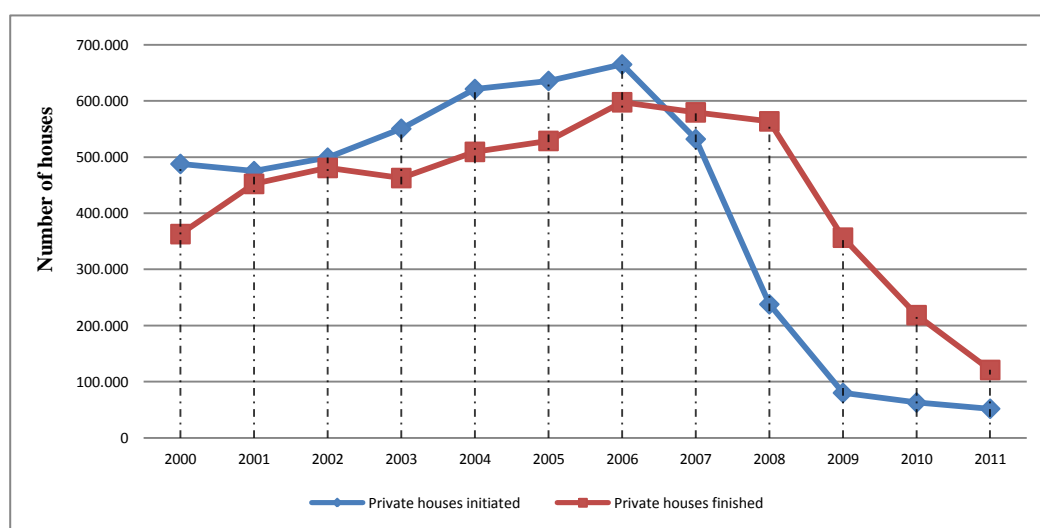


Figure 4. Number of private houses initiated and finished by year. Annual data. (2000 - 2011). Sources: Spanish Ministry of Developments and own elaboration.

But what could lead to a house price appreciation? A difference in the size of the respective rises. The increase in the supply was lower than the one on demand. So the supply increase could not respond as fast as the demand and as a result it was unable to offset the

demand rise. So finally, the demand excess over the supply inevitably pushed house prices up.

As commented, the result was a pricing scale. The Household Index Price elaborated by the Spanish Ministry of Developments reflects the increase in house prices (Figure 5). Taking as base 1st quarter of 2005 (base = 100), the 1st quarter of 2008 house prices reached their maximum value (the house price index was 124,7). House price bubble was a fact but then it burst and in the 1st quarter of 2009, the index decreased until 116,6. House prices decreased at least as fast as they grew during the years prior to the crisis. From 2005, base year, it lasts thirteen quarters to reach the maximum price and fifteen quarters to return to the reference value of 100.

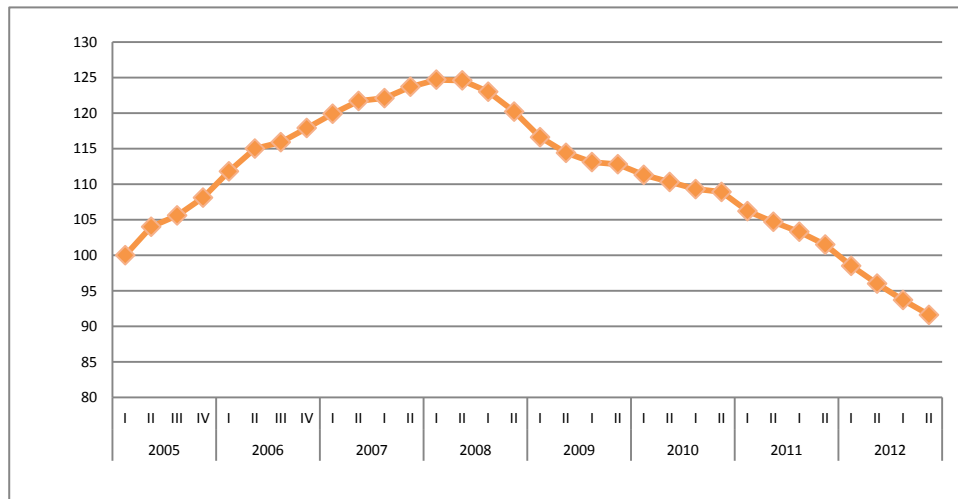


Figure 5. Evolution of the Household Index Price elaborated by the Spanish Ministry of Developments. Quarterly data. (2005:Q1 – 2012:Q4). Base 1st quarter Year (2005) = 100. Sources: Spanish Ministry of Developments and own elaboration.

Another evidence of the existence of a bubble in the real estate sector is provided by the house price to rent ratio. In the housing sector this ratio indicates the value of the initial investment and the rental price. This ratio is based on the Price Earnings Ratio (PER) in the stock market. It is a measure of the annual return that would be obtained with the property. In Spain, the ratio reached a maximum value of 22,8 meaning that housing are overvalued because so many years will be needed to recover the invested capital.

A revision of what happened in Spain during the last decade enables to draw some interesting conclusions. The period analyzed can be divided in two different sub periods. On one side there is a period comprised between 2000 – 2007 characterized by a growth in securitization activity, a mortgage credit expansion, growing importance of savings banks in the Spanish financial system, an increasing household's indebtedness and continuous house price growth. On the contrary, the subsequent period (2008 – 2012) yields different conclusions. Securitization volume decreases, fewer mortgages were constituted, banking sector had to be restructured and house prices had to adjust.

4 Empirical approach

The analysis developed in the previous section about the Spanish case allows us to hypothesize the existence of a relationship among securitization, credit and house prices. What happened in Spain seems to support the idea of a relationship among these variables. In other words, examining how these variables behaved in the past it is possible to deduce a relationship.

As it is discussed in the literature review section, some topics linked to securitization, credit and house prices have been analyzed in the most recent literature. Researchers have focused their attention on specific aspects and that is why in the literature we can find a variety of strands that have studied securitization, credit channel and house prices from different perspectives. A considerable part of all of them was empirically conducted. The opportunity to

exploit real and current data, generated by the time proximity of the financial crisis, encouraged to undertake empirical approaches.

Time series econometrics has been used as the most suitable tool to study the relationship among the variables and different estimation techniques have been considered. One purpose of this paper is to highlight some of the different econometric approaches that have been performed in the literature as well as make a proposal about which approach could be used in the Spanish case.

In the literature so many empirical papers have studied the relationship credit – house prices and many of them have dealt with cointegration analysis.

The uncertainty about the existence of spurious relationships has fostered this kind of analyses. Cointegration's concept is based on the existence of an equilibrium relationship in the long run between variables that are non-stationary.

A cointegration analysis is needed when there is a combination of variables that have the same order of integration. There are different methods to test cointegration. Two time series will be cointegrated if the order of integration of the combination is lower than the order of integration of them separately. In this sense, the common case is the one in which two time series variables are integrated with a first-order of integration and the combination of them presents a integration order lower than the unit (in this case, zero). In econometrics terms, we can test the cointegration hypothesis using different tests. That it is why it is possible to identify more than just one cointegration approach in the empirical literature.

Table 4. Models

Model	Papers	Country
VECM (Vector Error Correc- tion Model)	Hoffman (2004)	16 countries
	Gerlach & Peng (2005)	Hong Kong
	Oikarinen (2007)	Finland
	Gimeno & Martínez Carrascal (2010)	Spain
	Carbó & Rodríguez (2010)	Spain
	$\mathbf{X}_t = \mathbf{B}_1 \mathbf{x}_{t-1} + \dots + \mathbf{B}_k \mathbf{x}_{t-k} + \boldsymbol{\mu} + \varepsilon_t$ $\Delta \mathbf{x}_t = \mathbf{C}_1 \Delta \mathbf{x}_{t-1} + \dots + \mathbf{C}_{k-1} \Delta \mathbf{x}_{t-k+1} + \mathbf{C}_0 \mathbf{x}_{t-1} + \boldsymbol{\mu} + \varepsilon_t$	
Single Equation Estima- tion	Fitzpatrick & McQuinn (2007)	Ireland
	$y_t = \beta_0 + \beta_1 x_{1t} + \beta_2 x_{2t} + \sum_{j=-k}^k \theta_{1j} \Delta x_{1,t+j} + \sum_{j=-k}^k \theta_{2j} \Delta x_{2,t+j} + \varepsilon_t$	

In particular, we have paid attention to three that have been used recently: Vector Error Correction Model (VECM), Single-Equation Error Correction Model and Autoregressive Distributed Lag (ARDL).

Among the most relevant papers that have studied this relationship there is a model with a prevalent position: VECM (Vector Error Correction Model). This model is widely used among so many empirical studies. Some of the most of the papers that have studied the relationship between mortgage credit and house prices in the long run using this model appear in Table 4.

Comparing the VECM with the single equation estimation it is important to take into account from an economic perspective the long run relationship estimated. If the single equation

estimation is used when multiple long run relationship exists, the resultant estimator would be inconsistent. Just in the case in which it is possible to reject the existence of multiple long run relationship the single equation estimation is preferred.

Recently, a new strand of the literature has used an Autoregressive Distributed Lag (ARDL) model firstly proposed in Pesaran et al. 2007. The original approach is applied to the credit and house prices relationship for China (Liang & Cao, 2007) and Greece (Katrakilidis & Trachanas, 2012).

The ARDL maintains the essence of the ECM because following a linear transformation from an ARDL we can obtain the ECM.

Table 5. Example of Papers using ARDL

Paper	Relationship studied
Bildirici, M. E., and Kayıkçı, F. (2013)	Oil production and Economic Growth
Fuinhas, J. A., and Marques, A. C. (2012) Ozturk, I., and Acaravci, A. (2010)	Energy consumption and Economic Growth
Mustabshira, R., Kim, J., and Silvapulle, P. (2012)	Real stock returns and inflation
Hoque, M. M., and Yusop, Z. (2010)	Trade liberalization and imports
Liu Y., (2009)	Urbanization and Energy consumption
De Vita, G., & Abbott, A. (2002)	Savings and Investment

This new method compared with cointegration method presents some advantages. The main advantage is related with the properties that it has with small samples.

Furthermore, it has been used in other fields to study the long-run relationship between variables and good results have been obtained. Some examples of papers that have used this method are provided in Table 5.

Focusing on the Spanish case, the VECM appears to provide consistent results explaining how credit and house prices are related. Gimeno & Martínez-Carrascal, 2010 and Allen & Gale, 2000 are good examples of successful papers that used the VECM. However, because it has not been tested in Spain, as to our knowledge, but it has provided successful results in other economics and other fields and also because it maintains the essence of the VECM we propose that an empirical approach could be done using the ARDL (Autoregressive Distributed Lag).

5 Conclusions

Thanks to the data observation analysis about the case of Spain we find that the high securitization is linked to a credit expansion especially directed towards Spanish households - via mortgage loans - and real estate activities. Therefore, our paper in an attempt to clarify what happened in Spain before the crisis, we find the following results: Spain was characterized by a growth of securitization activity, mortgage credit expansion, increasing household's indebtedness and a continuous house price growth before the crisis. A joint economic and econometrics review of the literature lead us to find VECM (Vector Error Correction Model) as a model that provides consistent results explaining how credit and house prices are related. However, because it has not been tested in Spain, as to our knowledge, but it has provided successful results in other economics and maintains the essence of the VECM we propose that an empirical approach could be done using the ARDL (Autoregressive Distributed Lag).

6 References

1. Cumming, C. (1987). The Economics of Securitization. Federal Reserve Bank of New York Quarterly Review 12 (3), 11-23.
2. Wolfe, S. (2000). Structural effects of asset-backed securitization. The European Journal of Finance, 6(4), 353-369.
3. Diamond, D. W. (1984). Financial intermediation and delegated monitoring. The Review of Economic Studies, 51(3), 393-414.

4. Holmstrom, B., & Tirole, J. (1997). Financial intermediation, loanable funds, and the real sector. *the Quarterly Journal of economics*, 112(3), 663–691.
5. Rajan, U., Seru, A., & Vig, V. (2010). Statistical default models and incentives. *The American Economic Review*, 100(2), 506–510.
6. Keys, Benjamin J., Mukherjee, T., Seru, A., & Vig, V. (2010). Did securitization lead to lax screening? Evidence from subprime loans. *The Quarterly Journal of Economics*, 125(1), 307–362.
7. Purnanandam, A. (2010). Originate-to-distribute Model and the Subprime Mortgage Crisis. *Review of Financial Studies*, 24(6), 1881–1915.
8. Malamud, S., Rui, H., & Whinston, A. (2013). Optimal incentives and securitization of defaultable assets. *Journal of Financial Economics*, 107(1), 111–135.
9. Instejford, N. (2005). Risk and hedging: Do credit derivatives increase bank risk? *Journal of Banking & Finance*, 29(2), 333–345.
10. Franke, G., Krahn, J. P. (2006) Default Risk Sharing between Banks and Markets: The Contribution of Collateralized Debt Obligations. In M. Carey & R. M. Stulz (Eds.), *The Risks of Financial Institutions* (pp. 603-633). University of Chicago Press.
11. Haensel, D., & Krahn, J. (2007). Does credit securitization reduce bank risk? Evidence from the European CDO market. Working Paper. (January, 2007).
12. Uhde, A., & Michalak, T. C. (2010). Securitization and systematic risk in European banking: Empirical evidence. *Journal of Banking & Finance*, 34(12), 3061–3077.
13. Brunnermeier, M. K., Sannikov, Y. (2012). A Macroeconomic Model with a Financial Sector. Working Paper. Princeton University.
14. Nijskens, R., & Wagner, W. (2011). Credit risk transfer activities and systemic risk: How banks became less risky individually but posed greater risks to the financial system at the same time. *Journal of Banking & Finance*, 35(6), 1391–1398.
15. Goodhart, C. (1995). Price Stability and Financial Fragility. In: Z. Sakamoto & H. Taguchi (Eds.), *Financial Stability in a Changing Environment*. St. Martin's Press
16. De Greef, I., & De Haas, R. (2000). Housing prices, bank lending, and monetary policy. *De Nederlandsche Bank Research Series Supervision Paper* no, 31.
17. Collyns, C, & Senhadji, A., (2002). Lending Booms, Real Estate Bubbles, and The Asian Crisis. IMF Working Paper.
18. Hofmann, B. (2004). The determinants of private sector credit in industrialised countries: do property prices matter? *International Finance* 7, pp 203-234
19. Gerlach, S., & Peng, W. (2005). Bank lending and property prices in Hong Kong. *Journal of Banking & Finance*, 29(2), 461–481.
20. Fitzpatrick, T., McQuinn, K., (2007). House prices and mortgage credit: Empirical evidence for Ireland. *The Manchester School*, 75 (1), 82-103
21. Coleman, M., LaCour-Little, M., & Vandell, K. D. (2008). Subprime lending and the housing bubble: Tail wags dog? *Journal of Housing Economics*, 17(4), 272–290.
22. Oikarinen, E. (2009). Interaction between housing prices and household borrowing: The Finnish case. *Journal of Banking & Finance*, 33(4), 747–756.
23. Gimeno, R., & Martínez-Carrascal, C. (2010). The relationship between house prices and house purchase loans: The Spanish case. *Journal of Banking & Finance*, 34(8), 1849–1855.
24. Carbó-Valverde, S., & Rodríguez-Fernández, F. (2010). The relationship between mortgage markets and house prices: does financial instability make the difference? *Federal Reserve Bank of Atlanta CenFIS Working Paper*, 10–02.
25. Allen, F., & Gale, D., (2000). Bubbles and Crisis. *The Economic Journal*, 110 (January), 236-255.
26. Büyükkarabacak, B., & Valev, N. T. (2010). The role of household and business credit in banking crises. *Journal of Banking & Finance*, 34(6), 1247–1256
27. Pesaran, M. H., Shin, Y., & Smith, R. J. (2001). Bounds testing approaches to the analysis of level relationships. *Journal of Applied Econometrics*, 16(3), 289–3
28. Liang, Q., & Cao, H. (2007). Property prices and bank lending in China. *Journal of Asian Economics*, 18(1), 63–75.

29. Katrakilidis, C., & Trachanas, E. (2012). What drives housing price dynamics in Greece: New evidence from asymmetric ARDL cointegration. *Economic Modelling*, 29(4).

CO-127 Use of enzyme Lysozyme and anti bacterial Allicin for food preservation and the prevention of damage.

Abdul Aziz A. W. Abbas¹, Asaad Mohammed A. Ataa²

Corresponding author

Asaad Mohammed A. Ataa

P.O.BOX. 87246 , Thamar, Yemen

asaadataa00@gmail.com / alrgma@yahoo.com

¹ Department of Biotechnology & Food Technology, Thamar University

² Department Chemistry , Division Biochemistry , Faculty Applied Science, Thamar University

Abstract

Introduction and Objective: This study aims to identify the effectiveness of enzyme Lysozyme which is extracted from the eggs' albumin and The Allicin antibiotic which is extracted from the garlic. It also studies their effects on some bacteria which have been obtained pure and others have been isolated in the extracts of Lysozyme and Allicin. Then we face the foods which are contaminated with such species of these bacteria and their dangers on the public health. **Materials and methods:** The study was conducted in two phases, the first of which included knowing the effectiveness of extracts and their effects on some sorts of bacteria which were treated by these extracts through the tests of sensitivity screening. The second phase of this study included the treatment of some types of food which are commonly circulated and speedily damaged – the treatment was with these materials to know their impact in eliminating the microbes that are found in these foods and prevent damage for a long time. We examined three types of bacteria : (E.coli, Streptococcus, Salmonella). **The results:** The results of sensitivity screening, which were done by tow ways: (CD-proliferation plates and confirmation way), showed the sensitivity of these microbes with rates ranging between (100%) to (33.4%) named (garlic male). While the less ones were Allicin extracts that were extracted from the foreign garlic, the mixture of Allicin which was extracted from the local eggs and Lysozyme which was extracted form the foreign eggs with red peel. Besides, tow samples of food (milk and meat), which are commonly circulated in the governorate, were tested and treated with Allicin and Lysozyme extracts. **The inferences:** The results showed the effectiveness of Allicin with its quality in eliminating most microbes in meat especially E.coli and its effectiveness in eliminating all microbes in milk with no influence on Salmonella. But Lysozyme effectiveness notes varied, but it eliminated in the tow samples with no influence on E.coli.

Keywords:

Lysozyme ; Allicin ; Food ; Resistant ; Sensitivity Bacteria; Garlic; Eggs

1 Introduction

The eggs' albumin contains Lysozyme which has the ability to effect on the wall of spherical cells which are necessity for dying one g (*Almuhaize, 2006; Almusleh, 1990*). Lysozyme analyzes the walls of bacteria cells which dye one g by intersecting the chemical bonds between N-acetylmuramic acid and N-acetyl glucose amine in the layer of Mucopeptide (*Almusleh, 1990*).

Eggs are good diet which are rich with fat, vitamins, and protein. They contain all essential amino acids. Their flavor, color, and raste are widespread. Eggs one used in preparing several food meals (*Almusleh, 1990*).

In 1944, scientists could isolate the substance of (Allicin) from garlic, which is the basic material that lies behind the rare therapeutic qualities, and the smell garlic is characterized by. So garlic strengthens the body's immunity and its smell is well enough to kill the microbes, moreover, when its small is inhaled, it mixes with blood and kills the microbes fond in it. Also chewing garlic for minutes kills all mouth microbes (*Oweida 1992*).

Garlic is a herb branched with balbs with aerid smell of lily specy from which the onion, leek, lily, and etc are. Its scientific name is Allium Allsativum which means hot referring to sour taste (*Salunkhe and Kadam, 1998*).

Its name in classical Arabic is (foam) or (Thum). This name is taken from name Pharaonic (Antom). In old Arabic, its name is (Shum). The ground segment of garlic consists of an onion with numerous fibrous roots and give off the ground a number of leaves that are narrow. And stem which transcends to a height of 30 cm and ends with Bannoura tent with crimson flowers. The original place of garlic is at the Mediterranean and in neighboring countries.

Garlic contains 20-27 % multi-candy and 7-28 mg vitamin C, and protein 0.4% of volatile oil consisting of poly Slvedat. It also contain Alvetosetrajn. (**Awdat, Laham, 1992**).

2 Study objectives

1. Studying the inhibitory ability of Lysozyme, Allicin, and anti-bacterial on some microbes especially microbe of: *Streptococcus*, *E.coli*, *Salmonella*.

2. Using the enzyme of Lysozyme and Allicin antibiotic in maintaining some foods rite (Milk , Mea, etc.).

3 Materials and Methods.

Culture Media.

I attended all agricultural communities as instructed by the company processed and sterilized with a temperature of autoclaves (121) °C and under pressure (15) lbs / Wang for a period of (15) minutes.

Solutions and Dyes Used.

We brought distilled water, Lysozyme with its different kinds (raw), raw Allicin (local, and foreign), Sodium Hydroxide (*NaOH*), and Bromo Cresol Purple dye.

Devices and Tools.

Devices

Centrifuge, a device measure pH, a delicate balance, refrigerator cooling room, hood, and an incubator.

Tools and glassware

Picrate glass of different sizes, Petri dishes, glass pipettes, test tubes, DH pipes, Loeb, a Needle, a filter paper, and paper punch.

Collecting and preparing samples.

Lysozyme extraction.

We chase eggs with their different kinds available in the local market in the governorate. We also took some foreign eggs with their kinds red and white (the outer peel color). Then we took the local eggs and separated the albumin form the egg yolk. After that, we pat them in clean, dry, and steriled pipes, and glass containers. We covered them and transferred to the refrigerator in the laboratory unit use, (*A. N. SMOLELIS AND S. E. HARTSELL, 1949*).

Allicin extraction.

We chose garlic with its kinds (doves) available in the local market in the province; we also took some sample of foreign garlic (the Chinese one), we took the local one with its two kinds, the first of which is known as (municipal garlic) and the second is known as (garlic male). After Cushing garlic cloves, we extracted the liquid product. The liquid is filtered by filter paper into the clean steriled dry glass pipes and each sample is put separately until use , (*R R. CUTLER* and P. WILSON, 2004*).

Prepare (Lysozyme, Allicin) extracts.

We prepared the Allicin and lysozyme extracts and (15) extracts, five extracts represent the original material and the other are as a combination of these extracts.

Isolate *E.coli* Streptococcus & Salmonella bacteria.

We obtained them with the help of some Sana'a hospitals like (Al-Thawra, and Seventy Hospital), and from (Benon laboratories) in Thamar..

Working methods.

Sensitivity screening test for *E.coli*, *Salmonella*, & *Streptococcus* bacteria.

Disk Diffusion.

It is way in which we use the pre -wetted filter paper in the extracts of (Lysozyme,& Allicin).

The circles are prepared which are used to develop the bacteria mentioned earlier. Also preparing the extracts of Lysozyme and Allicin to be put in the clean, sterilized and dry pipes. Then putting a certain amount of filter paper which was formed in the form of small disks in a diameter ranging from 0.5 cm; in each tube there is an extract of (Allicin and Lysozyme). The disks should be left in the tube for a period ranging between a half an hour to two hours to absorb a sufficient amount of Allicin and Lysozyme extracts (*Wilkins & Thiel, 1973; Dickert et al., 1981*). After isolating bacteria, we take the filter paper saturated with the extracts of Allicin and Lysozyme and put them in different places by sterilized forceps with alcohol and flame to install on the surface by the light pressure by forceps; each one should be alone (*Klančnik et al., 2010*).

Afterwards, incubating the growth dishes on a temperature of 37°C and for a period ranging between (24-48) hours, (*Kulkarni et al., 2005; Pranoto et al., 2005; Coma et al., 2006; Kim & Kim, 2007; Cao et al., 2009; Mayachiew et al., 2010*).

Confirmatory test to detect the inhibitory ability of the extracts of (Allicin, and Lysozyme).

This way is done by pouring the extracts of Allicin and Lysozyme on the growth after transplanting bacteria by planning to observe the inhibition.

The way is the same way of (Disk-proliferation), but the difference lies in that after isolation, the process of pouring a certain amount of Allicin and Lysozyme extracts on the growth disks and placing the dishes into the incubator to grow at a temperature of 37 ° C for a period, the results are recorded.

Bacteriological examination of food.

Meat

To conduct this process samples of meat (minced meat), pulling 5 g of Homogeneous hash in each tube. Then adding one ml of Allicin and Lysozyme extracts to each tube separately. The additions are as follows: -

One ml of local Allicin was added to the first tube; one ml of foreign Allicin was added to second tube; one ml of local Lysozyme was added to the third tube; one ml white foreign Lysozyme was added to the fourth tube; one ml of red foreign Lysozyme was added to fifth tube, except the sixth tube which was not treated by any extract of Allicin and Lysozyme extracts, however, one ml of distilled water was added to it. Then the sample of meat were put in the refrigerator until use.

Milk.

The samples of milk were prepared by adding 10 ml of them to each tube (7) tubes. Then one ml of Allicin and Lysozyme extracts was added to five tubes, while the milk in the sixth tube was contaminated by the fecal *E.coli* which contaminates milk. But, the seventh tube was not treated by any sample of the research samples or any bacteria. It was like (a standard sample). All samples were put in the refrigerator until using.

Prepare the medium (Lactose Broth).

Lactose Broth was prepared after dissolving an amount of 3.25 g in 250 ml of distilled water adding the dye of purple Bromo cresol with an amount of 0.112 grams for each 250 ml of distilled water. Then Lactose broth was dissolved adding to it drops of Sodium Hydroxide (NaOH), in order to raise value of pH to (7.8) on purpose to know the change of the color in the dye as a result of low pH and at the fermentation of lactose.

After that, 10 ml of Lactose Broth were added to all tube used. The tubes then were placed, down to sterilized Lactose Broth according to instructions of the company., (*Al.Hadithy, Hadil T. & Alisymary, Ihsan A., 1993*).

Lactose fermentation test.

Part I: - Quantitative and Presumptive Test.

In this part, some samples of meat were prepared and a central centrifuge period of 5 minutes for the purpose of extracting the filtrate.

After sterilizing the circle available in the tubes, the vaccination was done by taking a point of milk and meat samples which were added to the tubes separately. After vaccinating the tubes, they were covered by a layer of sterilized was at 121 ° C for a period of 20 minutes.

Then cotton was put on each tube for incubating at 37 ° C for 24-48 hours. Directly after the incubation, the results were written down.

Part II: - Confirmatory Test.

After noting the results of lactose fermentation and the composition of the gas, the centers were prepared which are special for isolation of bacteria types which are expected to come out. The media used for that are as follows:

MacConcky Agar, EMB, S.S. Agar

After sterilization the orcles, they were poured on the plates and then leaving them to harden. During this process the samples on which the gas was composed were prepared. Also, one tube was taken which represents the samples in which lactose was fermented without composing gas.

Loob was taken from the tube after exposing it to the flame to sterilize and vaccinate media planning, and the rest of the work was archer went like wise.

After the transplant process by planning on media, the plates were put for incubating and the incubation was at different temperatures between (37- 44.5) ° C. The results were observed and written down.

Part III: - Completed Test - (Final Test).

After the growth of the colonies in the media, loob was taken to the tubes containing Lactose Broth and to the upside down tubes after sterilization. Incubation was at 37° C for a period of 24-48 hours. After the incubation, the results were observed and recorded.

4 Results.

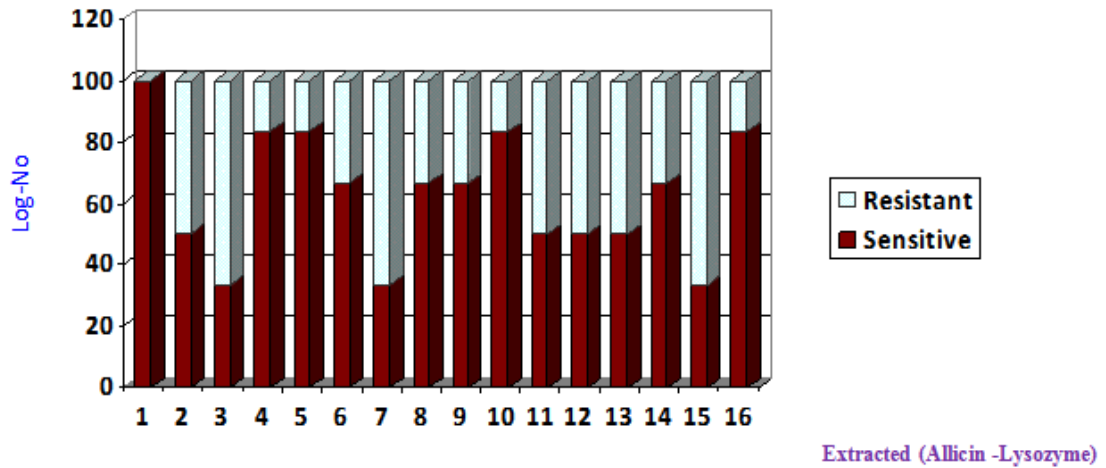
The results in Table (1) refer to the sensitivity of Allicin and Lysozyme extracts and their percentages. The results of sensitivity examination state the sensitivity of these microbes for most of these extracts used in this study with rates range between (100%) for Allicin extracts from garlic (garlic male), (83.4%) for Lysozyme extracted from the local eggs and Lysozyme extracted from the foreign eggs with white crust, the mixture of Lysozyme extracted form the foreign eggs with white and red crust, the mixture of Allicin extracted from the local garlic, Lysozyme extracted form the foreign eggs with red peel, and (66.6%) for Lysozyme extracted from the foreign eggs with red peel, the mixture of Allicin extracted from the local garlic, Lysozyme extracted form the local eggs, the mixture of Allicin extracted from the local garlic, Lysozyme extracted form the foreign eggs with white crust, the mixture of Lysozyme extracted from the local eggs, Lysozyme extracted form the foreign eggs with white crust. (50%) for Allicin extracted from the local garlic, the mixture of Allicin extracted from the foreign garlic, and all kinds of Lysozyme extracted. (33.4%) for Allicin extracted from the foreign garlic, the tow mixture of Allicin extracted from the local and foreign garlic, the tow mixture of Lysozyme extracted from local and foreign eggs with red shell. The differences can be-seen through the sensitivity of Allicin and Lysozyme extracts. can be seen that variation in sensitivity through various forms of ID (1, 2 , 3).



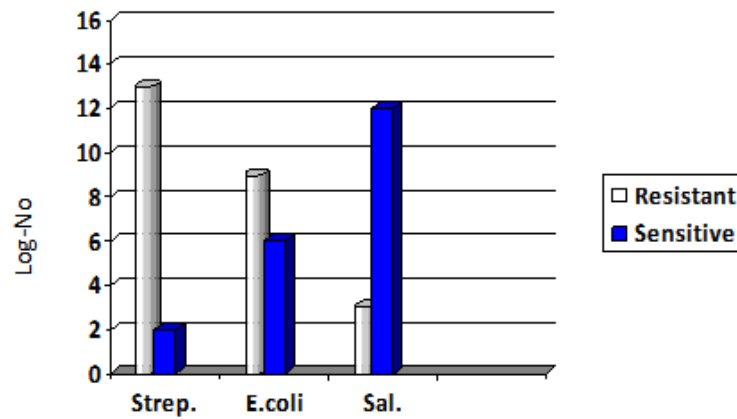
Form (1): - the inhibitory capacity of the extracts on E.coli , Salmonella , Streptococcus method Disk Diffusion

Table (1): The percentage of sensitivity and resistance of bacteria isolated Extract (Allicin, Lysozyme):

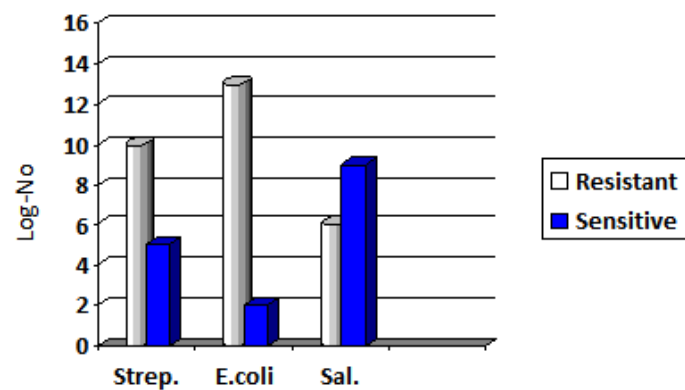
Extracted	Number	The test number of times	Sensitivity	%	The number of resistance	%
Local Allicin (Male Garlic)	1	3	3	100	-	-
Local Allicin	2	6	3	50	3	50
Foreign Allicin	3	6	2	33.4	4	66.6
Local Lysozyme	4	6	5	83.4	1	16.6
Foreign Lysozyme (White)	5	6	5	83.4	1	16.6
Foreign Lysozyme (Red)	6	6	4	66.6	2	33.4
Allicin foreign and local	7	6	2	33.4	4	66.6
The local Allicin and the local Lysozyme	8	6	4	66.6	2	33.4
The local Allicin and the foreign Lysozyme (White)	9	6	4	66.6	2	33.4
The local Allicin and the foreign Lysozyme (Red)	10	6	5	83.4	1	16.6
The external Allicin and the local Lysozyme	11	6	3	50	3	50
The external Allicin and the external Lysozyme (White)	12	6	3	50	3	50
The external Allicin and the external Lysozyme (Red)	13	6	3	50	3	50
Lysozyme local and external (white)	14	6	4	66.6	2	33.4
Lysozyme local and external (red)	15	6	2	33.4	4	66.6
The external Lysozyme (White and Red)	16	6	5	83.4	1	16.6



Form (1): - sensitive bacteria extracts (-Lysozyme Allicin) (method of disks spread)



Form (2): - the sensitivity of bacteria to Extract (Allicin, Lysozyme)



Form (3): - sensitive bacteria extracts (-Lysozyme Allicin) (confirmation method)

The affected bacteria was *Streptococcus* treated by Allicin extracted from the local garlic named (male garlic), but it was not affected by Allicin extracted from the foreign garlic named (Chinese garlic). Regarding the effectiveness of Lysozyme was high on bacteria *Streptococcus* and no the plates treated by Lysozyme extracts either using Lysozyme separately as mixing then together with Allicin extracts. When mixing Lysozyme extract extracted from the red foreign eggs with Allicin extracts both foreign and local, these is growth.

Regarding *E.coli* the results stated that this bacteria was affected by all extracts of Allicin and Lysozyme except Lysozyme local extract when mixed with the extracts of Allicin both foreign and local. But, mixing Lysozyme extract with Allicin foreign extract states the former results (Disk diffusion way) (**Rees et al., 1993**).

For *Salmonella* bacteria, the result stated the effectiveness of Lysozyme extract on *Salmonella*, however, there was no growth for this bacteria when using the two extracts of Lysozyme – the foreign extract both red and white. But mixing Lysozyme extracts together and with Allicin extracts states different result; there is no growth when mixing Lysozyme foreign extract (the white one) with Allicin foreign extract. The sample in which Allicin extracts with their types both local and foreign with Lysozyme. This means that the mixture of Allicin extracts and Lysozyme's does not give effectiveness.

The rate of the *Salmonella*, the results showed the effectiveness of Lysozyme extracted from the egg domestic as well as Lysozyme extracted from the foreign eggs quality red and white and these results match the results obtained (**Michel et al, 2007**) in a previous study. The effect of Lysozyme and substance EDTA factors discouraging *Salmonella* bacteria and the effectiveness of the enzyme made clear Lysozyme *Salmonella*.

Some results did not state the effectiveness of Allicin extracts by using them separately or mixing them together on *Salmonella*.

Through the results, it was stated that there is an effect of Allicin extracts on bacteria *E.coli*. These results correspond with (**Kamil, Kamil, 1990; Almosleh, 1990; Rees et al., 1993; Breithaupt-Grolger et al, 1997**), which state that there is an effect on bacteria *E.coli*. The Lysozyme effect on bacteria *Salmonella* was similar to (**Michel et al, 2007**) study which stated that there is effectiveness on *Salmonella*.

Bacteriological examination of food.

Meat

Table (8.4): The fermentation of lactose, and the product gas in a sample of meat.

NUMBER TUBE	MEAT-TREATMENT SAMPLE	THE RESULT FERMENTATION OF LACTOSE	THE RESULT BE GAS
1	Local Allicin	+	-
2	Foreign Allicin	+	-
3	Local Lysozyme	+	+
4	Foreign Lysozyme (White)	+	+
5	Foreign Lysozyme (Red)	+	+
6	Dis-tilled water	+	+

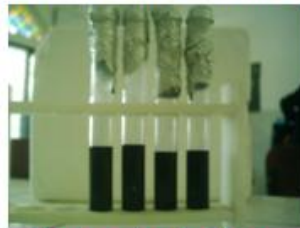
Milk

Table (9.4): The fermentation of lactose, and the product gas in a sample of milk.

NUM BER TUBE	MEAT- TREATMENT SAMPLE	THE RESULT FERMENTATION OF LACTOSE	THE RESULT BE GAS
1	Local Allicin	-	-
2	Foreign Allicin	-	-
3	Local Lysozyme	-	-
4	Foreign Lysozyme (White)	+	+
5	Foreign Lysozyme (Red)	+	+
6	Dis- tilled water	+	+

Microbiological Food

Quantitative and Presumptive tests



Before incubation



Milk



Meat

After incubation



Gas

Meat

Through the experiments conducted on Allicin and Lysozyme with their phases (first and second), the experiment states that Allicin has an effect on *E.coli* and limited on *Streptococcus*. On the other hand, it was not rated that it has an effect on *Salmonella*, although, it has strong effectiveness in eliminating most microbes found in meat. This corresponds (**Almusleh, 1990**). moreover it has strong effectiveness in eliminating all microbes found in milk when treating with these extracts (local and foreign).

Milk

Results have shown a sample of milk, which is known to milk from the appropriate sources for the growth of various microorganisms and which ones cause damage.

The results that extract of Allicin is highly effective not prove ferment lactose or gas in the pipeline that treated milk which extract Allicin remained colored as color pigment blue Dark, and was also confirmation of the results through the implant on different media which did not show any colonies in central EMB, MacConcky Agar and S.S. Agar.

The extract of Lysozyme has demonstrated the effectiveness of the approach of Allicin and extracted it of Lysozyme extracted derived from local eggs, and egg Lysozyme extracted from the outside (white) has effective in the inhibition did not show any planting colonies when the central S.S. Agar, The Lysozyme extracted from white outer (red) did not have an impact notes ferment lactose with gas formation and colonies appeared in various media used.

Through studies conducted on extracts Lysozyme and Allicin stages I and II experience has shown the influence of these substances uneven and that was Allicin has an effect on *E.coli* effectively and limited *Streptococcus* was observed effect on *Salmonella*, and effectiveness of high eliminate most microbes found in meat This corresponds to what is stated in (**Almusleh, 1990**), and its effectiveness concluded in eliminating all of the microbes in the milk counter when treated in this local and external quality, compared with the standard sample.

And effectiveness in eliminating bacteria *Salmonella* found in milk and this corresponds to what Lord's (**Kamil, Kamil, 1990; Al.mosleh, 1990; Breithaupt-Grolger et al, 1997**), and is identical to a previous study conducted for (**Rees et al., 1993**), which explained all to the effectiveness of Allicin *Salmonella*.

Conclusions and Recommendations**Conclusions**

- 1- High efficiency of the Lysozyme enzyme on *Streptococcus* and *Salmonella*.
- 2- The effectiveness of some food; the local one was more effective among them.
- 3- The effectiveness of Allicin in eradicating *E.coli* in all transactions.
- 4- The ineffectiveness of Allicin on bacteria *Salmonella* isolated from chicken livers found in meat and its effectiveness on the same bacteria found in milk.
- 5- The effectiveness of Allicin extracted from the local garlic named (male garlic) and its ineffectiveness in the other treatments with its local and foreign types on bacteria *Streptococcus*.
- 6- The possibility of using Allicin and Lysozyme extracts in some foods, quickly damaged because of their impact on many microbe existing in foods causing damage, as well as food poisoning.
- 7- The effectiveness of Lysozyme foreign extract (the red one) on microbes when treating foods which it.

Recommendations

- 1- Studying the possibility of using Lysozyme enzyme in the field, of food processing such as improving conservation meat with its kinds.
- 2- Extraction and purifying the components of both Lysozyme and Allicin and studying their effect on microbes which cause food damage and diseases widely.

- 3- Using Allicin pure in treating meat, milk and other foods, especially those which Coliform increases and those that are kept for a long time because Allicin is effective against microbes. It is of high therapeutic and healthy, importance with using Lysozyme with foods in which largely *Salmonella* is found especially meat and us derivatives for Lysozyme enzyme has strong effectiveness on *Salmonella*.
- 4- Doing a similar future study all around the republic to study the effectiveness of Allicin on *Salmonella* isolate separately to try using Allicin pure to see its impact on these isolates then specifying the sensitive ones to the counter and the resistance. This study is way important because *Salmonella* is a microbe among microbes which are the most commonly spread in the Republic of Yemen.

References:

1. A. N. SOULELIS AND S. E. HARTSELL, 1949.
2. Breithaupt-Grogler, K., et al. (1997): Protective effect of chronic garlic intake on elastic properties of aorta in the elderly .Circulation,96:2649-2655 Abstract.
3. Brien,P,M;Aitken,R (2002): Methods in Molecular biology antibody phage display methods and protocols., Human press.
4. Cao, R., Xue, C. H. & Liu, Q. (2009). "Changes in microbial flora of Pacific oysters(*Crassostrea gigas*) during refrigerated storage and its shelf-life extension by chitosan." International Journal of Food Microbiology 131: 272-276
5. Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F. & Deschamps, A. (2006). "Edible antimicrobial films based on Chitosan matrix." Journal of Food Science 67: 1162-1169.
6. Dickert, H., Machka, K. & Braveny, I. (1981). "The uses and limitations of disc diffusion in the antibiotic sensitivity testing of bacteria " Infection 9: 18-24.
7. Kim, J. S. & Kim, Y. H. (2007). "The inhibitory effect of natural bioactives on the growth of pathogenic bacteria." Nutrition Research and Practice 1: 273-278.
8. Klancnik, A., Piskernik, S., Jersek, B. & Mozina, S. S. (2010). "Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts." J Microbiol Methods 81: 121-126.
9. Mayachiew, P., Devahastin, S., Mackey, B. M. & Niranjana, K. (2010). "Effects of drying methods and conditions on antimicrobial activity of edible chitosan films enriched with galangal extract." Food Research International 43: 125-132.
10. Michel .J, Facon and Brent .J, Skura (2007): Antibacterial activity of lactoferricin, lysozyme and EDTA against *Salmonella enteritidis*., Published by Elsevier Science Ltd., Pages 558-565.
11. Pranoto, Y., Rakshit, S. K. & Salokhe, V. M. (2005). "Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin." LWT – Food Science and Technology 38: 859-865.
12. Rees LP, Minney S, Plummer NT & Slater J.H. (1993): World J. Microbiol. Biotechnol. 9: 303.
13. Salunkhe, D.K.; Kadam, S.S. (1998), Handbook of Vegetable Science and Technology .Marcel Dekker .ISBN0-8247-0105-4.
14. Wison, G.S., and Miles, A.A. (1966): Topley and wilson's principle of bacteriology and immunology. 5th ed., Arnold-London.
15. Wilkins, T. D. & Thiel, T. (1973). "Modified broth-disk method for testing the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria." American Society for Microbiology 3: 350-356.

e-posters



Association of perceptual and physiological responses during incremental treadmill exercise in women with fibromyalgia

Alberto Soriano-Maldonado¹, Jonatan R Ruiz¹, Inmaculada C Álvarez-Gallardo¹, Víctor Segura-Jiménez¹, Fernando Estévez-López¹, Manuel Delgado-Fernández¹, Alfredo Santalla², Diego Munguía-Izquierdo²

¹ Department of Physical Education and Sport, School of Sports Sciences, University of Granada, Granada, Spain.

² Department of Sport and Informatics, Section of Physical Education and Sports, Faculty of Sport, Pablo de Olavide University, Seville, Spain.

INTRODUCTION

Exercise is one of the main constituents of a multidisciplinary treatment for the management of fibromyalgia. Exercise intensity is an essential component of exercise programs. The ratings of perceived exertion (RPE) might represent a practical tool for monitoring exercise intensity in fibromyalgia patients, although its relationship with physiological indicators of exercise intensity is unclear in this population. Therefore, the aim of the present study was to examine the association of perceptual (RPE) and physiological responses during treadmill exercise in women with fibromyalgia.

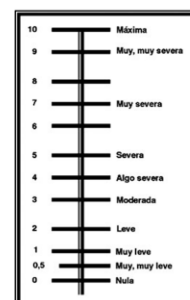


Figure 1. The Borg CR-10 scale

METHODS

Thirty-three women with fibromyalgia performed an incremental treadmill test, consisting of walking and jogging at 6 incremental workloads. Heart rate (HR) and oxygen uptake (VO_2) were continuously measured. The RPE was obtained at each workload with the Borg 10-points category-ratio (CR-10) scale. The association of perceptual and physiological responses was assessed with Spearman correlation. A linear regression model was built to predict the physiological responses as function of RPE and other covariates (age and body mass index).

RESULTS

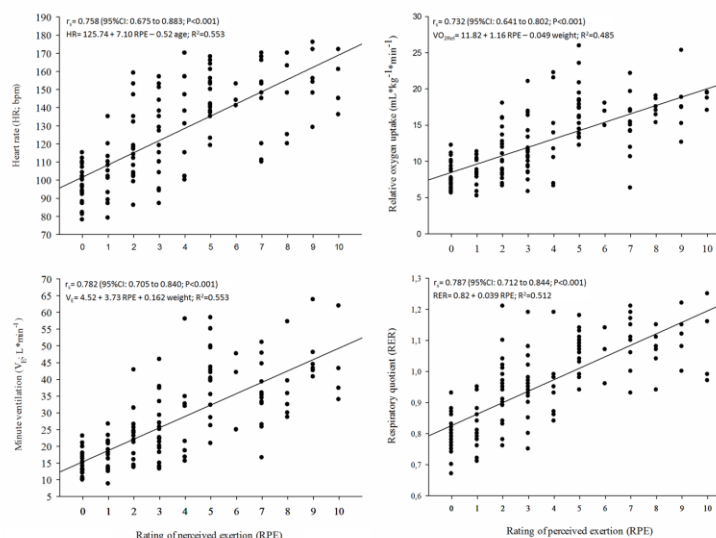


Figure 2. Association between RPE and physiological responses during an incremental treadmill test in women with fibromyalgia.

CONCLUSION

Our results indicated moderate to strong associations between perceptual and physiological responses during treadmill exercise in women with fibromyalgia, suggesting that the CR-10 scale is a valid tool for monitoring exercise intensity in this population. These results are of clinical relevance provided the utility of this scale in clinical settings.

Corresponding author:

Alberto Soriano Maldonado: asm@ugr.es

Acknowledgements: This study was partially supported by the Spanish Ministries of Education (grants FPU12/00963, AP-2010-0963), and Science and Innovation (RYC-2010-05957, BES-2011-047133).



NUEVOS MEROSEQUITERPENOS EJERCEN UNA POTENTE ACTIVIDAD ANTITUMORAL FRENTE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA *IN VITRO* E *IN VIVO* MEDIANTE INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO, BLOQUEO DEL CICLO CELULAR Y APOPTOSIS



Carrasco, E. (1), Leiva, MC. (1), Álvarez-Manzaneda, E. (2), Chahboun, R. (2), Messouri, I. (2), Cabeza, L. (1), Álvarez, P. (1), Rama, A. (1), Rodríguez-Serrano, F.(1)

(1) Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER); (2) Departamento de Química Orgánica, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada

INTRODUCCIÓN

Los compuestos naturales y sus derivados se han utilizado durante miles de años como fuente de agentes terapéuticos para todo tipo de enfermedades, incluido el cáncer. En esta comunicación presentamos las propiedades antitumorales de una nueva familia de merosequiterpenos sintéticos (fig.1) derivados del ácido trans-comúnico, muy abundante en *Cupressus sempervirens*, cuya síntesis y efectos antitumorales están protegidas bajo las patentes internacionales WO2009112622 y WO2010076358, respectivamente

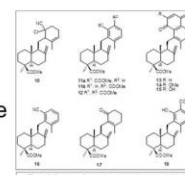


Figura 1. Estructuras de merosequiterpenos sintéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares: líneas tumorales de mama MCF-7, MDA-MB-231, T-47D, colon T-84, HT-29, RKO, SW-480 y pulmón A-549 y normales de mama MCF-10A y colon CCD18Co. **Estudios de proliferación:** cuantificación con Sulforodamina B, a partir de cultivos inducidos con dosis crecientes de los compuestos, ante la presencia o ausencia del antioxidante N-acetilglucosamina (NAC). **Análisis ciclo celular y apoptosis:** citometría de flujo tras tinción de las células con una mezcla de Ioduro de Propidio y RNAsa, o con Anexina V/PI. **Western blot:** análisis de marcadores de ciclo celular y apoptosis en MCF-7 tratadas con 2 μ M de C13 durante 4, 8, 16 y 24 h. **Ensayos *in vivo*:** a 40 ratones hembra C57BL/6 se les inocularó subcutáneamente la línea E0771 (subtipo luminal A). A los 9 días, una vez palpables los tumores, los ratones fueron distribuidos en 4 grupos, el control, que fue tratado con el vehículo, y 3 grupos tratados oralmente con C13 (5, 10 y 15 mg/Kg)

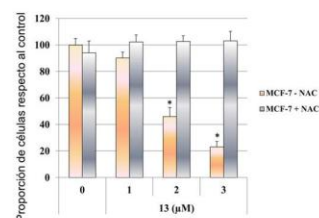
RESULTADOS

1. Actividad citotóxica frente líneas tumorales de mama, colon y pulmón (tabla1). Entre ellos destaca el compuesto 13 (C13), con mayor actividad y especificidad frente a la línea de cáncer de mama MCF-7 (subtipo luminal A) (tabla 2)

2. C13 induce estrés oxidativo. Figura 2. Efecto de C13 sobre células MCF-7 en presencia (+) o ausencia (-) de NAC

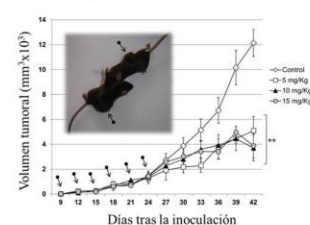
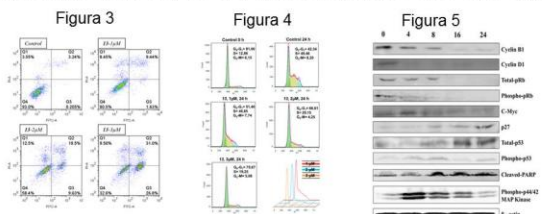
Compuesto	IC ₅₀ (μ M)		
	MCF-7	A-549	T-84
11a	40,41 \pm 9,75	28,14 \pm 0,45	25,04 \pm 0,24
12	33,01 \pm 2,79	19,89 \pm 0,22	25,04 \pm 0,24
13	0,35 \pm 0,10	1,38 \pm 0,83	0,56 \pm 0,13
14	16,02 \pm 0,40	17,51 \pm 0,75	16,74 \pm 0,62
15	38,37 \pm 5,30	41,17 \pm 2,70	30,01 \pm 3,92
16	39,63 \pm 6,00	20,17 \pm 0,21	23,66 \pm 4,40
17	45,06 \pm 6,50	26,96 \pm 0,14	40,02 \pm 0,23

Línea Celular	C13	
	IC ₅₀ (μ M)	TI
Mama		
MCF-7	0,35 \pm 0,10	9,00
MDA-MB-231	0,46 \pm 0,18	6,35
T-47D	0,63 \pm 0,08	5,00
E-0771	0,39 \pm 0,04	8,08
MCF-10 A	3,15 \pm 0,08	1,00
Colon		
T-84	0,56 \pm 0,13	0,59
HT-29	1,97 \pm 0,22	0,17
RKO	0,59 \pm 0,24	0,56
SW-480	0,92 \pm 0,03	0,36
CCD18Co	0,33 \pm 0,24	1,00



3. C13 bloquea el ciclo celular en las fases G₀-G₁ (fig.3) e induce apoptosis (fig.4), todo ello asociado a reducción de ciclina D1, hipofosforilación de pRb, aumento de la expresión de p27 y p53, y fraccionamiento de PARP (fig.5)

4. Inhibición del desarrollo de tumores *in vivo*. En la fotografía podemos distinguir un animal control (abajo) y otro tratado con 15 mg/Kg (arriba)



CONCLUSIÓN

Estos compuestos, en especial C13, ejercen un potente efecto antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que creemos que pueden ser de gran utilidad en el tratamiento del cáncer de mama en humanos.

Study of genes related with obesity in human differentiated adipocytes



Ruiz-Ojeda FJ, Rupérez-Cano AI, Gómez-Llorente C, Gil A, Aguilera CM.
Department of Biochemistry and Molecular Biology II, School of pharmacy, University of Granada.
Institute of Nutrition and Food Technology, Centre of Biomedical Research, University of Granada



Introduction: Adipose tissue is not only storage lipids but also functions as an endocrine organ. New adipocytes are generated by a process known as differentiation. There are more than 100 molecules upregulated in the process, including adipokines (e.g., adiponectin and leptin).

Aims: The main objectives of this study were to obtain differentiated adipocytes and to compare gene expression of obesity-related genes in that cells.

Material and Methods: Human adipose-derived tissue stem cells (hADSC) were differentiated into adipocytes during 12 days. Oil-Red O Staining assay were utilized to confirm adipocyte differentiation. mRNA expression levels of adipokines (leptin and adiponectin) were analyzed by RT-qPCR and normalized by the use of validated reference genes (GAPDH). Protein expression of these genes was validated by Western Blot assay.

Results: Adipogenic differentiation were validated by Oil-Red O quantification. We obtained a significant increase on the last day of differentiation (d12) with respect to undifferentiated (d0) ($P < 0.05$) (Fig 1). Gene expressions of leptin and adiponectin were higher in differentiated adipocyte than undifferentiated. Moreover, these results were validated by Western Blot (Fig 2).

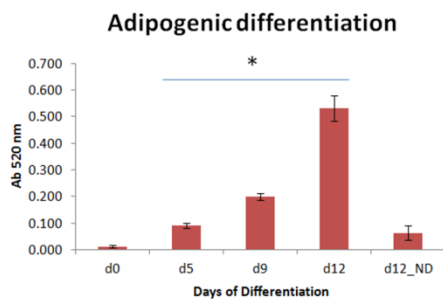


Fig 1: Oil-Red O Staining quantification at 520 nm in different days of adipogenic differentiation. Days 5, 9 and 12 are statistically different compare with the control (d0) ($P < 0.05$)

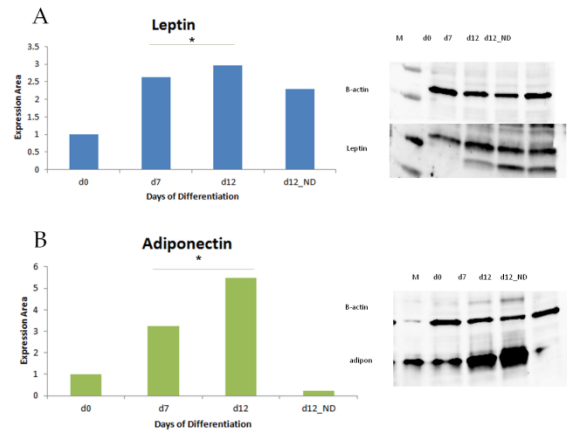


Fig 2: Protein expression of Leptin (A) and Adiponectin (B) in adipogenic differentiation by Western Blot.

Conclusion: These results showed that hADSC can be differentiated into mature adipocytes. Adipogenic differentiation was validated as *in vitro* model after checking leptin and adiponectin gene expression. Thus, we validate the use of these cells as a good model to study the role of candidate genes in the obesity.

References:

- 1-Rafael Gonzalez Cruz and Eric M Darling. Adipocyte 2:2, 87-91, 2013. Adipose derived stem cell fate is predicted by cellular mechanical properties.
- 2-William P. Cawthorn et al. 2012. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future.. Review. Journal of lipid research.



Nuevos biomarcadores con utilidad diagnóstica identificados en sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma ductal pancreático



Jiménez-Luna, Cristina¹; Perazzoli, Gloria¹; Oliver Esteve, Jaime¹; Alvarez Aránega, Pablo¹; Vélez Fernández, Celia¹; Caba Perez, Octavio²; Delgado Pérez, Juan Ramón³; Irigoyen Medina, Antonio³; Rojas Ruiz, Ignacio⁴; Perales Romero, Sonia⁵; Torres Perales, Carolina⁵; Pérez-Florido, Javier⁶; Linares Gil, Ana⁵; Aránega Jiménez, Antonia¹; Prados Salazar, Jose Carlos¹

¹ Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Granada

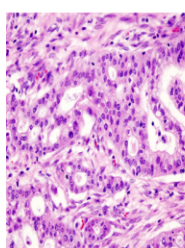
² Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén

³ Departamento de Oncología Médica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves

⁴ Departamento de Arquitectura y Tecnología de Computadores, Universidad de Granada

⁵ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad de Granada

⁶ Plataforma de Genómica y Bioinformática de Andalucía (GBPA)



INTRODUCCIÓN: Hoy en día, aproximadamente el 90% de los cánceres de páncreas diagnosticados son adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) [1]. Esta enfermedad, la mayoría de las veces, cursa de forma asintomática [2], motivo por el que muchos de los casos son detectados en fases muy avanzadas, convirtiéndose en una neoplasia altamente letal, con una tasa de supervivencia a 5 años cercana al 5% [1]. El antígeno CA19-9, único marcador aprobado para PDAC, se ha mostrado insuficiente para un diagnóstico precoz [3]. Nuestro **objetivo** radicó en identificar **nuevos biomarcadores en sangre periférica**, capaces de diferenciar entre pacientes con PDAC de individuos sanos, con objeto de hacer posible una **detección temprana de la enfermedad**.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras recogidas

- Sangre periférica de pacientes con PDAC (n=18) y de individuos sanos control (n=18)

Procesamiento

- Extracción de ARN de células de sangre periférica
- Determinación de calidad ARN obtenido (RIN>7)
- Hibridación en *microarray*

Estudio estadístico

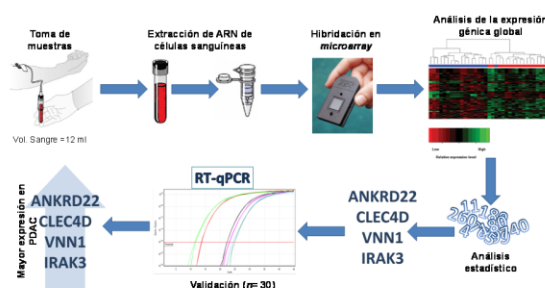
- Selección de genes con mayor expresión diferencial (LIMMA)

Validación por RT-qPCR

- Evaluación del potencial diagnóstico de los genes seleccionados en un nuevo conjunto de muestras ciegas (n=30)

RESULTADOS

- Expresión diferencial: 87 genes
- Seleccionamos 4 genes para estudiar por RT-qPCR: **ANKRD22**, **CLEC4D**, **VNN1**, **IRAK3**
- Mejor poder diagnóstico en muestras ciegas **CLEC4D + IRAK3**: 93% precisión, 86% de sensibilidad y 100% de especificidad



CONCLUSIONES

❖ El perfil de expresión génica de células mononucleares de sangre periférica es útil para el diagnóstico del PDAC

❖ Expresión diferencial en pacientes con PDAC de los genes: **ANKRD22**, **CLEC4D**, **VNN1**, **IRAK3**

[1] Boyle P, Levin B, eds (2008) World Cancer Report 2008. Lyon: International Agency for Research on Cancer.

[2] Baine MJ, Chakraborty S, Smith LM, Mallya K, Sasson AR, Brand RE, Batra SK. Transcriptional profiling of peripheral blood mononuclear cells in pancreatic cancer patients identifies novel genes with potential diagnostic utility. PLoS One. 2011 Feb 10;6(2):e17014

[3] Goonetilleke KS, Sirwardena AK. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. Eur J Surg Oncol. 2007;33(3):266-70

METODOLOGÍAS PARA DETERMINAR LA SIMILITUD DE CROMATOGRAMAS



L. Valverde Som, A.M. Jiménez Carvelo, C. Ruíz Samblás,
A. González Casado, L. Cuadros Rodríguez
Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias,
Universidad de Granada, C/ Fuentenueva s/n, 18071, Granada
(e-mail: luciavs@correo.ugr.es)



INTRODUCCIÓN

Existe un gran interés por comparar espectros (ópticos o de masas) y cromatogramas a través de "huellas dactilares" instrumentales para, por ejemplo:

- Autenticar la identidad de un material
- Verificar la estabilidad de los materiales
- Comparar la reproducibilidad de las medidas dadas en un mismo equipo
- Establecer la similitud entre los registros instrumentales de un mismo material obtenido por equipos diferentes

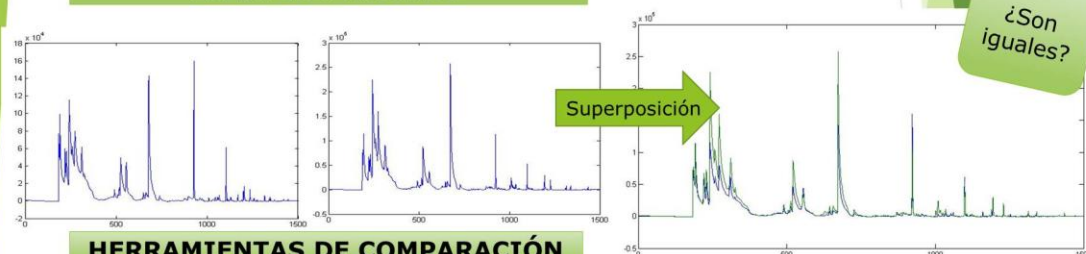
COMPARACIÓN DE CROMATOGRAMAS

La diferencia entre dos cromatogramas a comparar puede venir dada por:

- El perfil cromatográfico (forma del cromatograma)
- Intensidad de la señal (uno o más picos)



EJEMPLO PRÁCTICO



HERRAMIENTAS DE COMPARACIÓN

$$R^2 = \frac{(\sum(a_i - \bar{a}) + (b_i - \bar{b}))^2}{\sum(a_i - \bar{a})^2 + \sum(b_i - \bar{b})^2}$$

$$\cos \theta = \frac{\sum a_i \cdot b_i}{\sqrt{\sum a_i^2 + \sum b_i^2}}$$

El problema se resuelve comparando los conjuntos de datos que caracterizan cada cromatograma y que quedan definidos por un vector.

Cuanto mayor sea la similitud entre los vectores, más cercano a la unidad serán los valores de ambos parámetros.

Criterios de tolerancia

- R^2 ó $\cos \theta \geq$ Criterio \rightarrow Similares
- R^2 ó $\cos \theta \leq$ Criterio \rightarrow NO son similares

Resultados

$R^2 = 0.9166$
 $\cos \theta = 0.9640$

Tolerancia:
Para $R^2 = 0.90$
Para $\cos \theta = 0.95$

CONCLUSIONES

- Se pueden comparar parejas de cromatogramas a partir de las herramientas matemáticas del coseno del ángulo y el coeficiente de determinación de forma satisfactoria.
- Es necesario destacar que en los estudios de estabilidad es necesaria la representación de dichos parámetros, mediante gráficos de control en las muestras, en el tiempo del estudio para así confirmar la estabilidad o inestabilidad de los mismos.



NEW ANTI-CANCER PURINE DERIVATIVES: DESIGN AND SYNTHESIS OF SEVEN AND EIGHT- MEMBERED RINGS.

Nawal Mahfoudh¹, Joaquín María Campos Rosa¹

¹ Department of Pharmaceutical and Organic Chemistry, University of Granada, Campus de Cartuja s/n, Granada 18071 (SPAIN); nawalmj@correo.ugr.es, jmcampos@ugr.es.

INTRODUCTION

Cancer is the first cause of mortality in developed countries; it is therefore necessary to encourage the anticancer research in order to discover new selective drugs to target cancer cells without harming the healthy ones (1).

AIMS

1. To develop new antitumour compounds with specific apoptotic activity and capacity to control the cell cycle in several types of cancers.
2. To design new seven- and eight-purine derivatives

Increasing lipophilicity

RESULTS

Synthesis

1. The most promising structures synthesized by our group are 9-(1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzodioxepine-3-yl)-9H-purines (Fig 1).

Good activity against the MCF-7 cell line (0.33-0.86 μ M) (2, 3).

2. The synthesis of the target molecules has been carried out according the Scheme 1.

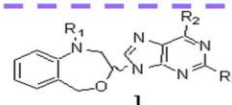
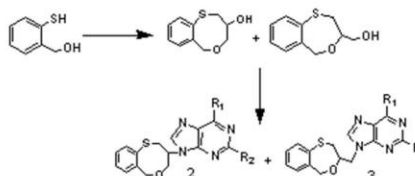


Figure 1.



Scheme 1. Main steps followed to develop new seven- and eight-purine derivatives.

CONCLUSIONS

we have designed new seven- and eight-purine derivatives in which the nitrogen atom of the seven-membered moiety has been changed by the sulfur atom, with the aim of increasing lipophilicity as the key structural characteristic To target pro-apoptotic genes with protein kinase activity.

REFERENCES

- (1) World Health Organization. Cancer Descriptives Notes 2011.297.
- (2) Núñez, M. C.; Díaz-Gavilán, M.; Conejo-García, A.; Cruz-López, O.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. *M. Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2614-2631.
- (3) Díaz-Gavilán, M.; Gómez-Vidal, J. A.; Rodríguez-Serrano, F.; Marchal, J. A.; Caba, O.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. *M. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1457-1460.

RIESGO DE INCENDIOS EN FUNCIÓN DE LA VEGETACIÓN Y FORMAS DE PREVENCIÓN



Montoya, S^a; Marin, L^a; Ortega, E^a

a Dpto. Edafología y Química Agrícola. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada
b Dpto. Biología Vegetal. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada



INTRODUCCIÓN

Los incendios forestales han sido en la historia reciente de España uno de los problemas ambientales más acuciantes, de acuerdo con A. Cerdá y A. Jordan (2010). A sus daños directos en pérdidas de vidas humanas y económicas, se suma el daño ambiental.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realiza en la zona del Sacromonte de Granada (Figura 1).



Figura 1.- Distribución de las zonas de quema

• Elección de la superficie de inventario (figura 2): recorrer el lugar para conocer su clima y elegir la zona en la que estén representadas la mayoría de las plantas típicas de la comunidad.



Figura 2.- Superficie de inventario

• Realización del inventario (tabla 1): consistente en la anotación precisa de las plantas que existen en la zona elegida así como sus índices de abundancia-dominancia (numero de individuos de cada especie y su abundancia) y sociabilidad (manera de disponerse). Van de 1 (mínimo) a 5 (máximo).

ESPECIES	Índices de abundancia-dominancia y sociabilidad
Quercus robur, L.folia	
Pinus halepensis	
Cistus europaeus	
Cedrus australis	
Prunus amygdalus	
Retama sphaerocarpa	
Rosa canina	

Tabla 1.- Modelo de inventario

OBJETIVO

Realizar un diagnóstico de la "vegetación actual" y evaluar las potencialidades de la zona para la lucha contra los incendios.

RESULTADOS

El ecosistema propio de la provincia de Granada es el encinar mesomediterráneo, el paisaje vegetal está caracterizado por una fuerte deforestación a favor de los cultivos.

En nuestra zona de estudio hemos encontrado solo un 5% de población de encinas cuando lo ideal sería que ocupase al menos un 50%, sin embargo, encontramos un 90% de pastizales (figura 3) que es lo que menos interesa ya que arden rápidamente, por ello, se considera conveniente repoblar. También encontramos un grupo pequeño de olivos y algunos pinos (figura 4).

En la figura 5 podemos ver la zona experimental tras la quema y en la figura 6 tres meses después.



Figura 4.- Pastizales en la zona experimental



Figura 3.- Olivos y pinos en la zona de estudio



Figura 5.- Zona experimental tras la quema



Figura 6.- Vegetación regenerada

CONCLUSIONES

La comunidad vegetal estudiada por su composición y densidad presenta un alto grado de riesgo de incendio. Por lo que se recomienda la quema controlada de las retamas y pastizales y la consecuente repoblación con encinas que tienen la ventaja de resistir al fuego frente a los pinos de repoblación que son destruidos por el fuego.

BIBLIOGRAFÍA

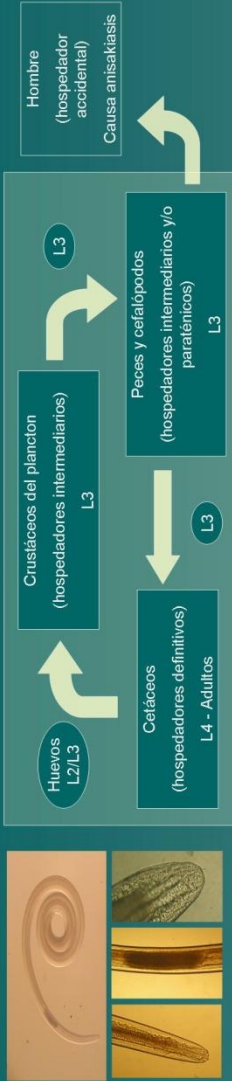
Cerdá, A. y Jordán A. (2010). Actualización en métodos y técnicas para el estudio de los suelos afectados por incendios forestales. Editado por Artemi Cerdá, Antonio Jordán. Valencia: Cátedra de Divulgación de la Ciencia, Universitat de Valencia, FUEGORED 2010.

Estudio preliminar de las proteasas de *Anisakis simplex* s. l.

Dolores Molina Fernández, David Malagón, Rocío Benítez, Javier Adroher. Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada

Introducción

Anisakis simplex (Ascaridoidea: Anisakidae) es un nematodo parásito de cetáceos. En su ciclo de vida también afecta a peces, más de 200 peces de interés comercial. La larva 3 (L3) de este parásito puede afectar al hombre, causando anisakiasis. Las proteasas en los nematodos tienen diversas funciones:
 -Digestión de nutrientes.
 -Están implicadas en la penetración de los tejidos del hospedador
 -Protegen al parásito del sistema inmune del hospedador
 -Intervienen en el proceso de muda
 -Participan en el desarrollo embrionario del huevo



Objetivos

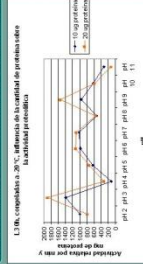
1. Estudiar la actividad proteolítica de *Anisakis simplex* s. l.
 2. Identificar las proteasas presentes en este parásito mediante el uso de inhibidores específicos de clase.
 3. Observar las diferencias de actividad proteolítica entre la larva infectiva para el hombre (L3) y los demás estadios del parásito.
- En este estudio preliminar se ha estudiado la L3 infectiva y la L3 tras 48 de cultivo a 37 °C. Se pretenden estudiar los restantes estadios (L4, adulto inmaduro y adulto maduro), analizar las zonas de máxima actividad e identificar los tipos de proteasas existentes.

Materiales y métodos

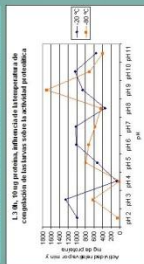
Se extraen L3 de *Anisakis simplex* s. l. de bacaladillas procedentes del océano Atlántico. Una vez aisladas se congelan a -20 °C o a -80 °C (L3-0h) o se ponen en cultivo a 37 °C (para las fases de L3-48h, L4, adulto inmaduro y adulto maduro). Se prepara un extracto con un determinado número de larvas según el estado que se quiera estudiar. Se calcula la cantidad de proteína presente en cada extracto mediante el método de Bradford. Se prepara el ensayo en placas de microtitulación negras, que contienen: extracto de *Anisakis simplex* (el volumen depende de la cantidad de proteína presente en el mismo), solución de NaCl, agua, tampón, reactivo fluorógeno (BODIPY-FL caseína). Volumen final por pocillo: 200 µl. La reacción comienza al mezclar el reactivo comercial BODIPY-FL caseína con la muestra (extracto de *Anisakis simplex*) que contiene proteasas. La fluorescencia se activa cuando las distintas proteasas actúan sobre el reactivo. Esta fluorescencia es proporcional a las proteasas presentes en el extracto, y se detecta con un espectrofluorímetro (ajustado a 490 nm λ de excitación y 510 nm λ de emisión) con lecturas cada minuto durante 60 minutos.

Resultados

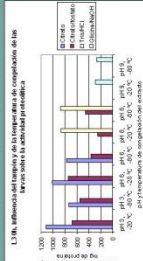
Influencia de la cantidad de proteína



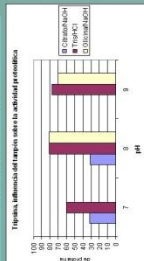
Influencia de la temperatura de congelación de larvas/extracto



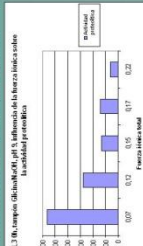
Influencia de la temperatura de congelación y del tampón



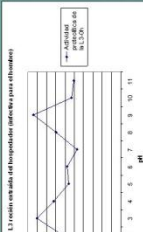
Influencia del tampón



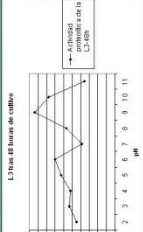
Influencia de la fuerza iónica



Influencia del pH (L3-0h)



Influencia del pH (L3-48h)



Conclusiones

La temperatura óptima de congelación de larvas o extractos es -20 °C para pHs ácidos. Los tampones escogidos para futuros ensayos son: Citrato/HCl o Citrato/NaOH para pHs ácidos, Tris/HCl y Glicina/NaOH para pHs neutros y alcalinos. La concentración óptima de proteína es de 25 µg por pocillo. Al aumentar la fuerza iónica disminuye la actividad proteolítica. Los máximos picos de actividad aparecen a pH 3, 5-6 y 9. El máximo de actividad se encuentra a pH 9 tanto en L3 recién extraída como en L3 tras 48 horas de cultivo.



ESTUDIO INTRAESPECÍFICO DE LAS 2 LÍNEAS MITOCONDRIALES DE PHLEBOTOMUS SERGENTI PRESENTES EN ESPAÑA MEDIANTE PCR-RFLP

Merino-Espínosa, G.¹; Callejón-Fernández, R.²; Corpas-López, V.¹; Díaz-Sáez, V.¹; Gallego, M.^{3,4}; Morillas-Márquez, F.¹; Martín-Sánchez, J.¹

¹Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, España. ²Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla, España. ³Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, España. ⁴Centro de Investigación en Salud Internacional de Barcelona (CRISIB), Barcelona, España.

INTRODUCCIÓN

Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti es el principal vector de *Leishmania tropica*, responsable de la leishmaniosis cutánea antroponótica y ampliamente distribuida en Marruecos. Mientras que *P. sergenti* está muy representado en España, *L. tropica* no es endémica en nuestro país, aunque se dan circunstancias que podrían permitir su establecimiento. La diversidad genética de *P. sergenti* en España es elevada y existen dos líneas mitocondriales, una típicamente española y otra común con Marruecos.

Nuestro objetivo ha sido desarrollar un método que diferencie estas líneas mitocondriales para su vigilancia epidemiológica.

MATERIAL Y MÉTODOS

CAPTURA Y MONTAJE DE FLEBOTOMOS

- Los ejemplares de *P. sergenti* son capturados tanto con trampas adhesivas como con trampas de luz CDC. A todos ellos se les diseccionó la cabeza y los últimos segmentos abdominales, que es donde se encuentra la genitalia, para su identificación morfológica y clasificación.
- El resto del cuerpo del flebotomo se reserva para su análisis mediante biología molecular.

TRAMPAS CDC

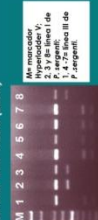


- Analizamos nuevos ejemplares de flebotomos de España y Portugal mediante la PCR-RFLP desarrollada.
- PCR utilizadas:

PCR-RFLP

- Seleccionamos Hae III (BsuR I) y Hpa II (Msp I) como probables enzimas de corte en base al estudio (Barón et al., 2008) de las 4 líneas mitocondriales que presenta *P. sergenti*.
- Amplificamos por PCR un fragmento mitocondrial de 650 pb del Cyt b en 20 individuos de la línea I, 3 de la línea II, 17 españoles y 6 marroquíes de la línea III, y un individuo de la línea IV, y los digerimos con cada enzima.

PCR-RFLP con HaeIII (BsuR I)



PCR-RFLP con HpaII (Msp I)



LÍNEA	NÚMERO DE BANDAS	PESO MOLECULAR APROXIMADO DE LAS BANDAS
LÍNEA I	2	298 y 292
LÍNEA II	2	298 y 292
LÍNEA III	2	298 y 292
LÍNEA IV	2	320 y 220

- 1. PCR para Cyt b: Esseghir et al. (1997) Fragmento mitocondrial de 550 pb.
- 2. PCR para fragmento interno de Cyt b: A partir de secuencias de Cyt b (Barón et al., 2008) Fragmento mitocondrial de 250 pb. Diseñada específicamente para los objetivos de este trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

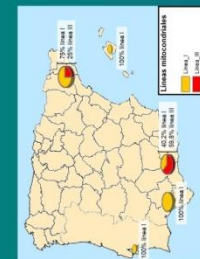
ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO BASADO EN PCR-RFLP

- Evaluación de las técnicas PCR-RFLP con los ejemplares capturados en Andalucía, Cataluña, Baleares y Portugal.
- 68 individuos de los que 33 (47.8%) pertenecen a línea I y los 36 (52.2%) restantes pertenecen a línea III. De los capturados en la provincia de Granada, 66.7% son línea III.

País de captura	Provincia	Número de individuos	Línea I	Línea II	Línea III	Línea IV
España	Granada	14	1	0	13	0
	Granada	3	0	0	3	0
	Granada	3	0	0	3	0
	Granada	2	0	0	2	0
	Granada	2	0	0	2	0
	Granada	2	0	0	2	0
	Granada	2	0	0	2	0
	Granada	2	0	0	2	0
	Granada	2	0	0	2	0
	Granada	2	0	0	2	0
Marruecos	Almería	2	0	0	2	0
	Almería	2	0	0	2	0
	Almería	2	0	0	2	0
	Almería	2	0	0	2	0
	Almería	2	0	0	2	0
	Almería	2	0	0	2	0
	Almería	2	0	0	2	0
	Almería	2	0	0	2	0
	Almería	2	0	0	2	0
	Almería	2	0	0	2	0
Portugal	Alentejo	2	0	0	2	0
	Alentejo	2	0	0	2	0
	Alentejo	2	0	0	2	0
	Alentejo	2	0	0	2	0
	Alentejo	2	0	0	2	0
	Alentejo	2	0	0	2	0
	Alentejo	2	0	0	2	0
	Alentejo	2	0	0	2	0
	Alentejo	2	0	0	2	0
	Alentejo	2	0	0	2	0
TOTAL		68	0	0	33	35

CONCLUSIONES

1. La PCR-RFLP de un fragmento de 550 pb del Cyt b con la enzima de restricción HaeIII que hemos desarrollado resulta útil para la identificación de las líneas mitocondriales de *P. sergenti* de la península.
2. Los nuevos cebadores sintetizados que amplifican un fragmento más interno de Cyt b resuelven la problemática en ejemplares en los que los cebadores descritos por Esseghir et al. (1997) y posteriormente utilizados por Barón et al. (2008) no amplifican ningún fragmento, lo cual ocurre en Baleares.
3. La enzima de restricción HaeIII también es capaz de diferenciar las líneas mitocondriales a partir de la PCR del fragmento interno del Cyt b.
4. La calibración molecular nos ha permitido datar la separación de las líneas mitocondriales I y III que habría ocurrido hace 2,8 – 1,8 m.a.



Representación de las dos líneas mitocondriales en las estancias investigadas.



Mapa que muestra el origen y dispersión de *Phlebotomus sergenti* (Dopazo et al., 2007). Modificado por la autora. Según Dopazo et al., (2008) el antepasado de la especie *P. sergenti* probablemente surgió en la zona medio oriental del continente africano. Antes de la formación de la península ibérica, *P. sergenti* habría migrado desde el norte de África habiendo permitido llegar a España. Según la calibración de Esseghir et al., (1997), para la elaboración de un reloj molecular, podemos asumir que la separación de ambas líneas ocurrió hace 2,8-1,8 m. a.



REFERENCIAS

1. Barón, S.D., Martín-Sánchez, J., Gallego, M., Morales-Vieito, M., Bousasa, S., Morillas-Márquez, F. 2008. Intraspecific variability (DNAITS and mtDNA Cyt b) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco. *Acta Tropica*, 107 (3): 239-47.
2. Dopazo, J., Ferte, H., Léger, N., Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A., Killick-Kendrick, M., Hanafi, H.A., Gobert, S. 2000. Genetic diversity of *Phlebotomus sergenti* (Diptera: Phlebotomidae) in the Mediterranean region: hypotheses of dispersal and speciation. *Insect Molecular Biology*, 9 (3): 293-300.
3. Esseghir, S., Ready, P.D., Killick-Kendrick, R., Bon-Samail, R. 1997. Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus sergenti*. *Insect Molecular Biology*, 6 (3): 211-25.

APLICACIÓN DE LA MICROENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS EN NUTRACÉUTICA

Enrique García Ramos, M^a José Martín, M^a Teresa Sánchez, M^a Adolfin Ruíz y M^a Encarnación Morales.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, 18071, Granada, España.



1. INTRODUCCIÓN

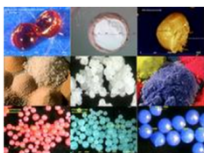
Un nutraceutico es un producto de origen natural con propiedades biológicas activas, beneficiosas para la salud. Algunas de sus funciones son la prevención de infecciones intestinales, urinarias y alérgicas, así como la prevención y disminución de la gravedad de las infecciones en neonatos prematuros.

Los probióticos han demostrado eficacia en alteraciones digestivas pediátricas como la diarrea infecciosa, el cólico del lactante o el estreñimiento. También en alteraciones inmunológicas de tipo alérgico, como la dermatitis atópica y la alergia alimentaria, y en la prevención de patologías de recién nacidos pretérmino.

Los probióticos son muy sensibles al calor, la humedad y la contaminación microbiana, por lo que es imprescindible desarrollar un método que permita mantener su viabilidad cuando se incorporan en formas farmacéuticas o en matrices alimentarias.

2. OBJETIVO

Se centra en el estudio de un método que nos permita obtener microcápsulas que confieran estabilidad y protección a diferentes cepas probióticas. En concreto, el método propuesto es la gelificación iónica a partir de una emulsión previa.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

El probiótico usado es *Lactobacillus coryniformis*.
El material empleado es alginato sódico, carbonato cálcico, Spam 80 (tensoactivo), aceite de soja, ácido acético y cloruro cálcico.

MÉTODO ANALÍTICO: cultivos microbiológicos

Los cultivos se llevan a cabo en MRS Agar como medio selectivo que se incuba en jarras de anaerobiosis a 37°C durante 48 horas. La liberación del contenido de las microcápsulas se hace por disolución en un tampón fosfato de pH≈7, simulando el medio intestinal.

MÉTODO DE MICROENCAPSULACIÓN

Se trata de la gelificación iónica, que se basa en la liberación del calcio desde un complejo insoluble en una solución de alginato de sodio, mediante acidificación de un sistema aceite-ácido soluble. A la fase acuosa se le adiciona la fase oleosa bajo agitación continua durante todo el proceso, y se añade cloruro cálcico para endurecer la microcápsula.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tras analizar la cantidad de bacterias microencapsuladas de acuerdo con el método propuesto y considerando que se parte de 10¹¹ UFC/g, se observa que la viabilidad de las mismas no ha descendido durante el proceso de encapsulación. Asimismo, la viabilidad se mantiene durante los primeros 15 días.

En la figura 1, se observa que las microparticulas obtenidas son esféricas y constituyen un sistema polidiserso.

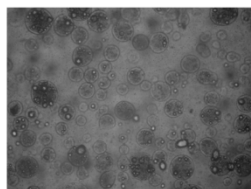


Figura 1. Microscopía óptica de las microparticulas.



Figura 2. SEM de *Lactobacillus coryniformis*.

5. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos tras la microencapsulación, se puede concluir que el método utilizado por gelificación iónica mantiene la viabilidad de la cepa y, por tanto, se adecúa a los fines planteados con las bacterias microencapsuladas.

BIBLIOGRAFÍA

Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. Martín Villena MJ, Morales Hernández ME, Gallardo Lara V y Ruiz Martínez MA. ARS Pharmaceutica Simbióticos. Actualización y aplicación en farmacia pediátrica. Papel de la Nutraceutica. Curso de formación continuada. 2013 Ediciones Mayo, S.A.



STUDY OF THE MAIN VARIABLES AFFECTING THE REGENERATION PROCESS OF AMBERLITE IRA-67 RESIN

M. D. Víctor-Ortega^{1*}, J. M. Ochando-Pulido¹, G. Hodaifa² and A. Martínez-Férez¹

¹Department of Chemical Engineering, University of Granada, Campus Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain.

²Molecular Biology and Biochemical Engineering Department, University Pablo de Olavide, 14013 Seville.

*email: mdvictor@ugr.es

Introduction

Regeneration process is a key stage in wastewater purification systems based on the usage of ion exchange (IE) resins. A basic solution can solubilize anions adsorbed on an anionic resin, which can be present in wastewaters.

In our former works, Amberlite IRA-67 anion exchange resin was used for purification of olive mill wastewater (OMW) previously treated by means of chemical oxidation based on Fenton's reagent, coagulation-flocculation and filtration through olive stones. This resin can reduce the residual concentration of chloride and total phenols, which are principal anionic pollutants in this pretreated effluent. The aim of the present study was to optimize the regeneration process of Amberlite IRA-67 by varying experimental conditions.

Materials and methods

- Experiments were carried out by taking 350 g of Amberlite IRA-67, which was previously used to remove chloride and phenols ions from model pretreated OMW.
- The IE column employed in this study was made of an acrylic tube 540 mm x 46 mm i.d.
- Amberlite IRA-67 anion exchange resin was regenerated using NaOH solutions.
- After regeneration process, the resin was washed with double distilled water to remove all excess of base



Fig. 1. Ion exchange column filled with Amberlite IRA-67 resin

Results and discussion

Regenerant solution concentration, operating temperature and flow rate are the main variables affecting regeneration process.

➤ Effect of Regenerant solution concentration

2%, 4% and 8% NaOH regenerant solutions were assessed. Operating temperature and flow rate were kept at 298 K and 2.5 L/h, respectively.

Regenerant concentration	2% NaOH (1 L aprox)	4% NaOH (0,6 L aprox)	8% NaOH (0,4 L aprox)
Regeneration time	20 minutes	12 minutes	8 minutes
Rinse time	45 minutes	55 minutes	80 minutes

Table 1. Effect of regenerant solution concentration on regeneration and rinse times.

➤ Effect of operating temperature

The effect of operating temperature was studied at 298 K, 308 K and 318 K. Regenerant concentration and flow rate were kept at 2% NaOH and 2.5 L/h, respectively.

Regenerant solution volume: 1L.

Operating temperature	298 K	308 K	318 K
Regeneration efficiency	97 %	99 %	99 %

Table 2. Effect of operating temperature on regeneration efficiency.

➤ Effect of flow rate

The influence of flow rate was investigated at 2.5 L/h, 5 L/h and 10 L/h. Regenerant concentration and operating temperature were kept at 2% NaOH and 298 K, respectively.

Regenerant solution volume: 1 L.

Flow rate	2.5 L/h	5 L/h	10 L/h
Regeneration efficiency	99 %	85 %	75 %

Table 3. Effect of flow rate on regeneration efficiency.

Conclusions

- Increasing regenerant concentration involves decreasing the necessary time to regenerate the resin. However high regenerant concentrations normally imply longer rinsing times.
- The regeneration process was not significantly affected by temperature.
- However, regeneration efficiency was considerably reduced with increasing flow rate.



Spanish Ministry of Science and Innovation is gratefully acknowledged for funding the project CTQ2010-21411: Depuration of wastewater from olive oil industry for its reutilization in the process.



IMPACT OF INITIAL CONCENTRATION ON THE UPTAKE OF IRON, CHLORIDE AND SODIUM IONS FOR THE PURIFICATION OF OLIVE MILL WASTEWATER BY ION EXCHANGE

M. D. Víctor-Ortega^{1*}, J. M. Ochando-Pulido¹, G. Hodaifa² and A. Martínez-Férez¹

¹Department of Chemical Engineering, University of Granada, Campus Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain.

²Molecular Biology and Biochemical Engineering Department, University Pablo de Olavide, 14013 Seville.

*email: mdvictor@ugr.es

Introduction

The adsorption of sodium, iron and chloride from model pretreated olive mill wastewater (OMW) was investigated by using Dowex Marathon C and Amberlite IRA-67 resins. OMW is a highly pollutant effluent which has high concentration of organic matter and inorganic compounds such as several salts of potassium, calcium, iron, magnesium, sodium and copper. In the present study, ion exchange (IE) is proposed as an efficient alternative for purification of OMW pretreated by means of chemical oxidation based on Fenton's reagent, followed by a coagulation-flocculation step and a filtration in series through three different adsorbent medium.

Semi-batch sorption experiments were carried out to assess the removal of sodium, iron and chloride ions, which are the main ionic pollutants in this effluent, from model water simulating pretreated OMW at varying these pollutant ions initial concentrations and contact time.

Materials and methods

- Removal of sodium and iron ions from model water simulating pretreated OMW by Dowex Marathon C cation exchange resin.
- Removal of chloride from model pretreated OMW by Amberlite IRA-67 anion exchange resin.
- Experiments were carried out by taking 346 g of Dowex Marathon C and 350 g of Amberlite IRA-67.
- After each operational cycle, the resins were regenerated with diluted HCl and NaOH. Then, the hydrogen and the hydroxide form of the resin, was washed with double distilled water.



Fig. 1. Dowex Marathon C resin.



Fig. 2. Amberlite IRA-67 resin.

Results and discussion

Initial sodium concentration

Initial concentrations of 250, 500, 750 and 1000 mg/L were fixed for sodium ions. Sodium removal efficiencies increased significantly with decreasing initial concentration.

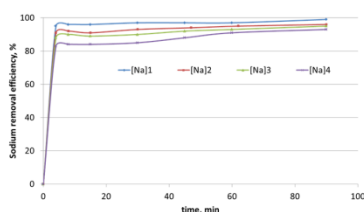


Fig. 3. Effect of initial sodium concentration on its removal efficiency.

Initial chloride concentration

Initial concentrations of 250, 500, 1000 and 1500 mg/L were fixed for chloride ions. Chloride removal efficiencies increased significantly with decreasing initial concentration.

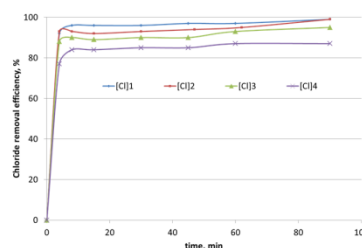


Fig. 5. Effect of initial sodium concentration on its removal efficiency.

Initial total iron concentration

Initial concentrations of 0.400, 1.00, 2.50 and 5.00 mg/L were fixed for total iron ions. Total iron removal efficiency increased with reducing initial concentration.

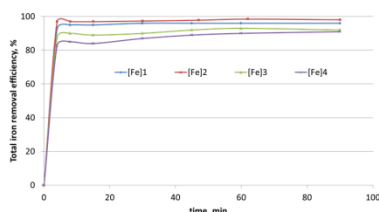


Fig. 4. Effect of initial total iron concentration on its removal efficiency.

Conclusions

- Sodium, total iron and chloride removal efficiencies were considerably increased with increasing contact time and decreasing initial concentration.
- At the end of experiments removal efficiencies were higher than 90% in all cases.
- The uptake of the studied ions by the assayed resins was reversible and so they have good potential for the removal of these ions from pretreated OMW.



VAGINITIS: UNA ALTERNATIVA TERAPÉUTICA A LOS ANTIBIÓTICOS



M^a Alejandra Asensio Ruiz, M^a Rosa Espigares García, M^a José Martín, M^a Encarnación Morales y M^a Adolfin Ruiz.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada

INTRODUCCIÓN

La vaginitis es el problema ginecológico más frecuente diagnosticado por los médicos de atención primaria. Se trata de una inflamación causada principalmente por la alteración del equilibrio de la microbiota vaginal habitual. Resulta fácil de diagnosticar y tratar, sin embargo lleva asociadas altas tasas de recurrencia. Esto suele provocar una exposición repetida a antibióticos, su principal tratamiento, lo que plantea cierta preocupación por la aparición de cepas resistentes y reacciones adversas.

Una alternativa a los antibióticos son los probióticos, efectivos para el tratamiento y la profilaxis de la vaginitis debido a su capacidad para mantener el pH vaginal $\leq 4,5$, agregarse a los patógenos bloqueando su adhesión y/o desplazándolos de las células del epitelio vaginal y la protección frente a uropatógenos mediante la producción de biosurfactantes.

Por todo ello, el objetivo de nuestro trabajo consiste en la elaboración de micropartículas que protejan al probiótico tanto de las condiciones ambientales como tecnológicas y que permitan su posterior incorporación en una forma de administración vaginal.



- FLUJO VAGINAL ANORMAL
- OLOR DESAGRADABLE
- ARDOR AL ORINAR
- PRURITO VAGINAL EXTERNO

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Realizada la síntesis de las micropartículas, determinamos la cantidad de bacterias microencapsuladas. Para ello, tras la filtración y purificación de las mismas, precedimos a la liberación de las bacterias atrapadas en la matriz polimérica con la intención de analizar la influencia del método de microencapsulación en su viabilidad. De acuerdo con las pruebas realizadas por nuestro grupo de investigación con otras cepas de bacterias probióticas, utilizamos un tampón fosfato a pH 7. Sin embargo, con él no fue posible la liberación de las bacterias y se hizo necesario la utilización de un tampón citrato.

La viabilidad del probiótico a lo largo del proceso de encapsulación se redujo en 0'5 log UFC.

Asimismo, la forma de las partículas es esférica, tal y como se comprueba en la *figura 2*, y su tamaño está comprendido entre 30-192 μm debido a la polidispersión inherente a la técnica de microencapsulación utilizada. No obstante, se observa un predominio de las partículas con un tamaño comprendido entre 55-80 μm .

MATERIALES Y MÉTODO

Para la microencapsulación del probiótico *Lactobacillus gasseri* hemos empleado alginato sódico, carbonato cálcico, aceite de soja, span 80, ácido acético glacial y cloruro cálcico.

La técnica utilizada para la elaboración de las micropartículas es la emulsificación-gelificación iónica interna para lo que usamos un agitado mecánico (*figura 1*).

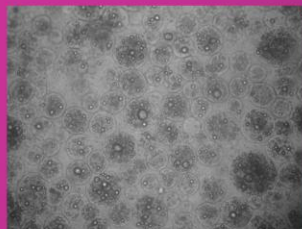


Figura 2. Microscopía óptica de las micropartículas



Figura 1. Agitador mecánico utilizado en la síntesis de micropartículas

CONCLUSIÓN

La viabilidad del probiótico tras su microencapsulación se considera aceptable dado que empleando 1g del mismo obtenemos una dosis de $1'5 \times 10^{10}$ UFC, la cual es suficiente para la profilaxis y el tratamiento de la vaginitis.

El tamaño de partícula se considera aceptable tanto para la elaboración de formas de administración vaginal como tópica.

PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN BASADOS EN EL USO DE RADIACIÓN SOLAR PARA LA ELIMINACIÓN DEL DIATRIZOATO DE SODIO DE LAS AGUAS

Sánchez Polo. A.M. Sánchez Polo. M. López Peñalver J. Velo Gala I.
Departamento Química Inorgánica. Facultad de Farmacia. Granada



Medio de contraste usado en hospitales para el diagnóstico mediante técnicas de imagen

Compuesto muy estable e hidrófilo

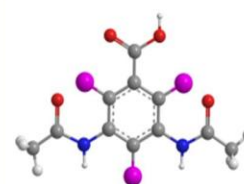
DIATRIZOATO DE SODIO

No es eliminado en las EDAR.

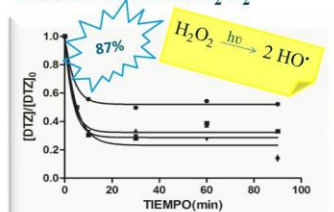
Surge la necesidad de nuevas tecnologías (PAOs)

OBJETIVOS:

- Degradación DTZ:
 - Radiación solar
 - Radiación solar/H₂O₂
 - Radiación solar/K₂S₂O₈
 - Radiación solar/Fenton
 - Reactivo Fenton
- Toxicidad



Radiación solar/H₂O₂

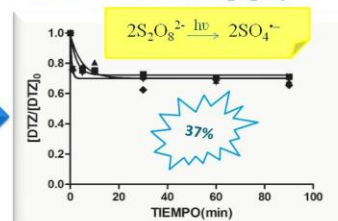


(●) 50 mg L⁻¹ H₂O₂, (■) 100 mg L⁻¹ H₂O₂
(▲) 150 mg L⁻¹ de H₂O₂, (♦) 200 mg L⁻¹ H₂O₂

RESULTADOS:

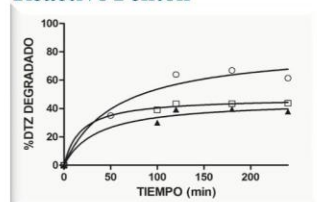
SÓLO RADIACIÓN SOLAR
8,27% Degradación DTZ

Radiación solar/K₂S₂O₈



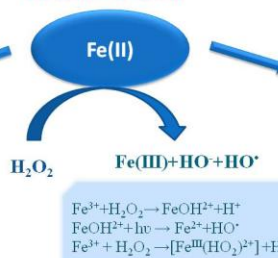
(♦) 50 mg L⁻¹ K₂S₂O₈, (■) 100 mg L⁻¹ K₂S₂O₈
(▲) 150 mg L⁻¹ K₂S₂O₈, (♦) 200 mg L⁻¹ K₂S₂O₈

Reactivo Fenton

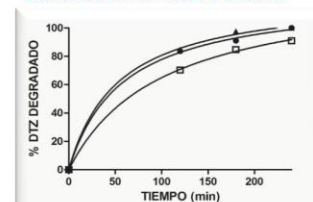


(▲), 10 mg L⁻¹ H₂O₂; (□), 25 mg L⁻¹ H₂O₂; (○), 50 mg L⁻¹ H₂O₂

Reactivo Fenton

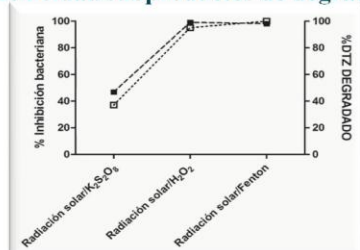


Radiación Solar/Fenton



(□), 10 mg L⁻¹ H₂O₂, (▲), 25 mg L⁻¹ H₂O₂, (●), 50 mg L⁻¹ H₂O₂

Toxicidad subproductos de degradación



Porcentaje de inhibición bacteriana según el porcentaje de DTZ degradado y del tratamiento aplicado. (■), % inhibición bacteriana. (□) % de degradación

CONCLUSIONES:

- La radiación solar por sí misma no es capaz de producir la degradación del DTZ en disolución acuosa.
- La presencia de H₂O₂ y K₂S₂O₈ con radiación solar favorece la eliminación del DTZ debido a la generación de radicales hidroxilo y radicales sulfato.
- El proceso Fenton es eficiente en la eliminación del DTZ en disolución acuosa. Si este proceso lo combinamos con radiación solar, los porcentajes de degradación alcanzan el DTZ 100%.
- El proceso de tratamiento menos tóxico es el K₂S₂O₈ /radiación solar



Adsorción de compuestos farmacéuticos en solución acuosa sobre carbón activado preparado a partir de residuos de café y cáscara de almendra.



Jalila Messoud¹, Manuel Sanchez-Polo^{1*}, Inmaculada Vela-Gala¹, José Valente Flores-Cano¹
¹Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.
 Campus Universitario Cartuja s/n, CP 18071. Granada, España.
 E-mail: mansanch@ugr.es; Teléfono: 696195189

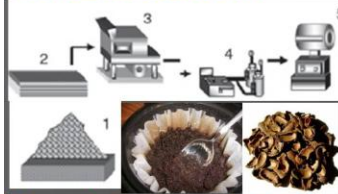
1. INTRODUCCIÓN

La presencia de compuestos farmacéuticos en los sistemas acuosos afecta al ecosistema y a la salud de los seres vivos. Las aguas residuales de hospitales y hogares son la principal fuente de contaminación de estos compuestos farmacéuticos. Se ha detectado la presencia de metronidazol (MNZ), dimetridazol (DMZ) y diatrizoato de sodio (DTZ) en aguas subterráneas y superficiales. La adsorción es un método eficiente para la remoción de compuestos orgánicos e inorgánicos y consiste en la acumulación de una sustancia (adsorbato) sobre una superficie sólida (adsorbente).



El OBJETIVO de este trabajo fue preparar un carbón activado a partir de residuos de café y cáscara de almendra y evaluar la capacidad de adsorción de estos adsorbentes para remover MNZ, DMZ y DTZ.

2. METODOLOGÍA



1. Recepción material
2. Lavado
3. Molienda y tamizado
4. Gases para la síntesis
5. Horno

1. Baño a T constante
2. Recirculador
3. Adsorbedor
4. Carbón Activado

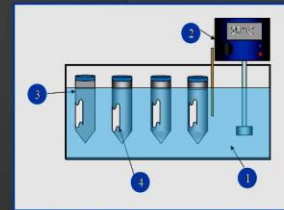


Figura 1. Esquema de síntesis de CA

Figura 2. Adsorbedor de Lote

3. RESULTADOS

Tabla 1. Propiedades de textura y química superficial de los carbones activados.

Carbón activado (CA)	S _{BET} (m ² /g)	V _{mp} (cm ³ /g)	L ₀ (nm)	S.A. Totales (mmol/g)	S.B. Totales (mmol/g)	pH _{PCC}
CAC	221.55	0.16	2.92	37.83	3.73	3.19
CAA1	103.77	0.058	2.25	12.87	4.42	2.40
CAA2	143.27	0.012	3.42	35.53	4.72	4.77

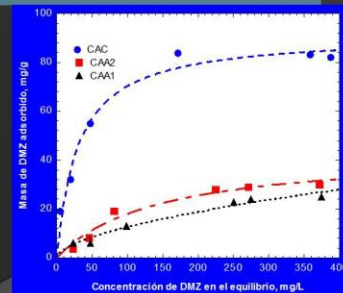
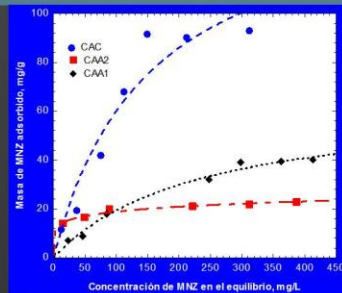
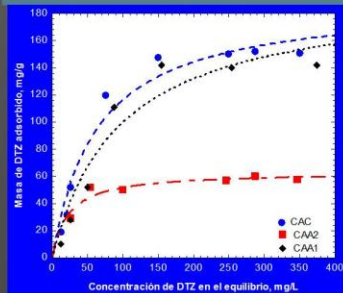


Figura 3. Isotherma de adsorción de DTZ sobre carbón activado. pH=7 y T=25°C
 Figura 4. Isotherma de adsorción de MNZ sobre carbón activado. pH=7 y T=25°C
 Figura 5. Isotherma de adsorción de DMZ sobre carbón activado. pH=7 y T=25°C

4. CONCLUSIONES

- ✓ El carbón activado preparado a partir de residuos de café y cáscara de almendra es una buena opción para remover DTZ, MNZ y DMZ.
- ✓ Las propiedades texturales y químicas del carbón activado afectan la capacidad de adsorción.



DISEÑO Y SÍNTESIS NANOPARTÍCULAS DE Si



R. L. Mochón, M. Rodríguez y M.A Ruiz

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia
Universidad de Granada
rosalau@correo.ugr.es, adolfina@ugr.es

Introducción

En la actualidad, la nanotecnología es fundamental en el diseño de fármacos y, en concreto las partículas a escala nanométrica tienen una gran importancia en el campo de la investigación biomédica y de la industria farmacéutica. En nuestro caso, destacamos las nanopartículas de Si, las cuales tienen unas características que las hacen idóneas para usarse como vehículos transportadores de fármacos, ya que son biocompatibles y con alta penetrabilidad.

Objetivo

Sintetizar nanopartículas de Si para, posteriormente, poder vehicular en ellas principios activos como anticancerígenos o fotoprotectores.

Resultados y Discusión

Las partículas sintetizadas se caracterizan por diferentes métodos instrumentales, microscopía electrónica de barrido (TEM) (Fig.1), espectroscopia UV (Fig.2), espectroscopia FTIR (Fig.3) y Calorimetría de barrido diferencial (DSC) (Fig. 4a y 4b):

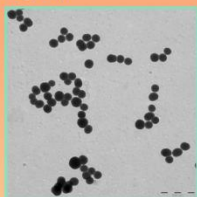


Fig.1 Nanopartículas de Si TEM

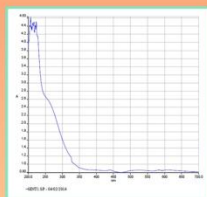


Fig.2 Espectro UV

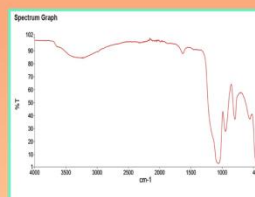


Fig.3 Espectro FTIR

- Las nanopartículas obtenidas tienen una forma esférica y un tamaño de unos 400 nm.
- Muestran un pico exotérmico a 90° en la muestra con menor proporción de EtOH y a 125° en la de mayor.
- No muestran un pico de absorción en el espectro UV.
- Encontramos las bandas fundamentales originadas por el TEOS (1168, 965 y 798 cm⁻¹) y el etanol (banda situada a 881 cm⁻¹).

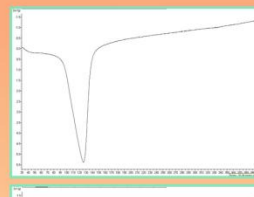


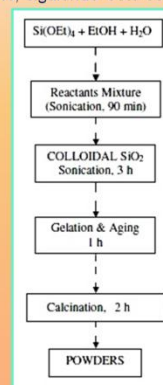
Fig.4a y 4b DSC, síntesis con diferente proporción de etanol

Conclusión

- El tamaño obtenido es apropiado para su aplicación a nivel tóxico.
- Para su aplicación sistémica es necesario optimizar su síntesis y obtener partículas de menor tamaño.

Materiales y métodos

La síntesis se ha llevado a cabo mediante modificaciones en el método sol-gel, utilizando TEOS como precursor, ETOH, y NH₃ al 25%, siguiendo este esquema:



Bibliografía

- Synthesis of silica nanoparticles by modified sol-gel process: the effect of mixing modes of the reactants and drying techniques. M. Jafarzadeh, A. E. A. Rahman, E. C. S. Sipaut. J Sol-Gel Sci Technol (2009) 50:328-336.
- Complex Impedance Spectroscopy Study of Silica Nanoparticles Via Sol-Gel Method. N. Darman Singho, M. Raffe Johan. Int. J. Electrochem. Sci., (2012) 7:5604 - 5615.



Monitorizado remoto de ejercicios de rehabilitación en tiempo real con sensores de profundidad 3D y tecnologías semánticas

N. Díaz Rodríguez (ndiaz@abo.fi), R. Wikström, S. Grönroos, F. Wickström, P. Karvinen, A. Berg, S. Hosseinzadeh, J. Lihus, M. P. Cuéllar, M. Delgado, M. Karppi.

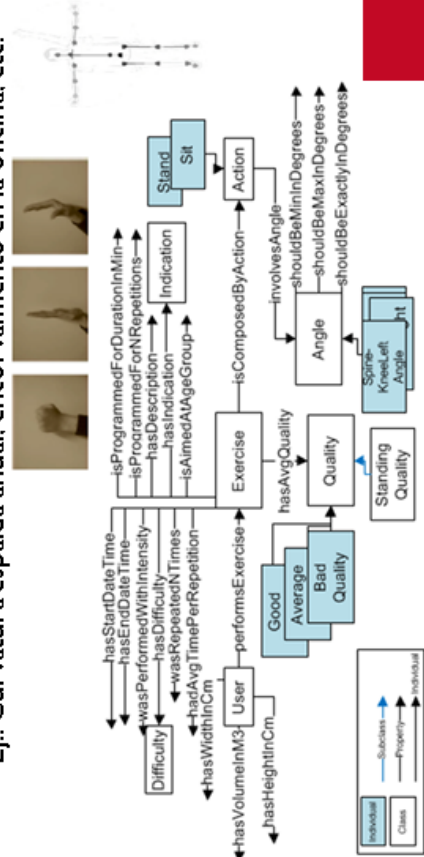
Propuesta: Seguimiento con doble feedback de ejercicios de rehabilitación post-cirugía (cadera, rodilla, hombro, 5 sit-stand)—extensión y abducción—.

- Aprendizaje basado en reconocimiento de patrones.

Método: Anotación semántica con la ontología Kinect para seguir la evolución del rendimiento. Sensor Kinect para Windows y C# SDK.

- Reconocimiento incremental de acciones, gestos, actividades y comportamientos.
 - Integración con datos de sueño, stress y ritmo cardíaco en las plataformas software Philips PHIL y M3.
- Resultados:** Integración de visión por computador y razonamiento automático para monitorización remota de posturas y gestos.

- Ontologías y sistema basado en reglas para notificaciones en tiempo-real. Evaluación continua dependiente del contexto.
- Ej.: Curvatura espalda anual, encorvamiento en la oficina, etc.



ESTUDIO ARQUEOMÉTRICO DE LOS VIDRIOS DE VENTANA ROMANOS DE LA VILLA DE RONDA DEL MARRUBIAL, CÓRDOBA



Velo-Gala, A., Departamento de Historia del Arte, Arqueología y Música, Facultad de Filosofía y Letras, Universidad de Córdoba. Córdoba (España), 635999368, almudeny@msn.com

OBJETIVOS

- Abordar el estudio de un material que se documenta en algunas excavaciones pero que carece de interés, o incluso es desconocido, para muchos investigadores y arqueólogos.
- Demostrar en valor que el vidrio de ventana tiene para un conocimiento exhaustivo de la arquitectura y de la industria vidriera en época romana.
- Proceder a la investigación de un material que hasta el momento no había sido objeto de estudio en el ámbito cordobés.
- Incidir en la importante información obtenida a partir de los análisis químicos en esta tipología de materiales.

MATERIAL DE ESTUDIO

- Conjunto de 219 fragmentos de vidrio plano.
- Documentados en la *pars urbana* de una villa exhumada en el año 2008 en el solar de Ronda del Marrubial esquina avenida Agrupación Córdoba (Córdoba), cuya ocupación se estima tuvo lugar entre los siglos I-III d.C.

CARACTERÍSTICAS DE LOS VIDRIOS

- Una superficie mate lisa y otra irregular y brillante.
- Marcas –en lado mate– por la impronta del molde de las partículas de arena aplicadas al mismo para evitar su adhesión.
- Grosor: entre 1 y 7 mm.
- Huellas de herramientas (circulares y lineales).
- Colores “sucios” a causa de las impurezas.

EXPERIMENTAL

Exhaustivo análisis visual
Análisis químico mediante

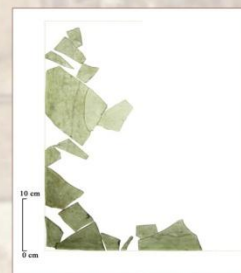
Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)
Fluorescencia de Rayos X (XRF)
Espectrometría de masas con Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS)

RESULTADOS

Resultados del análisis mediante Fluorescencia de Rayos X

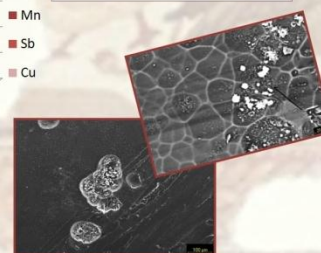


Resultados del análisis mediante Espectrometría de masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS)



CONCLUSIONES

- Según las características físicas analizadas, se concluyó que se trata de 4 paneles vítreos elaborados mediante colado en moldes.
- Mediante análisis químico, se ratificó que son vidrios de época romana.
- Se determinó que su fabricación fue realizada mediante la práctica del reciclaje, empleando para ello fragmentos previamente seleccionados de vidrio decolorado.
- Se identificaron dos técnicas de decoloración diferentes en el proceso de fabricación de los nuevos paneles vítreos.



Imágenes obtenidas con Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)





Synthesis of coumarin-triazole hybrids

Torres, F.¹; Kawano, D.¹; Garcia-Rubiño, M.E.²; Carvalho, I.³; Arraché, G.¹; Campos, J.M.²; Eifler-Lima, V. L.¹ von Poser, G.¹;

¹Faculdade de Farmácia, UFRGS-Brazil; ²Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada; ³Faculdade de Ciências Farmacéuticas de Ribeirão Preto, USP-Brazil.

INTRODUCTION

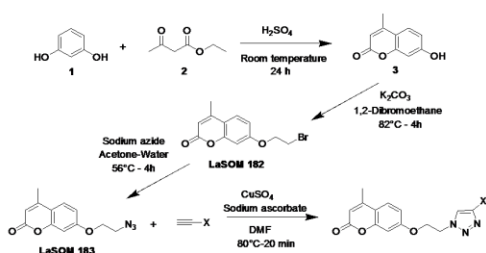
The compound 4-methylumbelliferone (4-MU), has been evaluated clinically in the treatment of hepatic disorders and renal carcinoma¹. Moreover, studies involving this compound indicate a potential inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells². In continuation of a previous study about the synthesis of coumarins and analogues³, in this work we increased the molecular diversity of 4-MU by the synthesis of a library of 1,2,3-triazoles-coumarin hybrids using 1,3-dipolar cycloaddition because triazole functionalized compounds can induce the apoptosis of breast cancer cells⁴ *in vitro*. For this purpose, 4-MU was obtained and used as starting material to obtain 39 triazoles derivatives, in three steps (Scheme 1). The 1,3-dipolar cycloaddition known as "Click Chemistry" produces 1,2,3-triazoles through the reaction of azides with terminal alkynes. Thus, we have introduced several 4-substituent groups that could possibly produce different electronic or steric effects of triazole-coumarins hybrids.

OBJECTIVES

Synthesize a series of coumarin-triazole hybrids employing "Click Chemistry".

MATERIALS AND METHODS

The synthetic route and general conditions can be observed in Scheme 1. 4-MU was synthesized using a mixture of resorcinol (1) and ethylacetoacetate (2) in acid medium at room temperature. The reaction of 4-MU with 1,2-dibromoethane produces the bromate intermediate LaSOM 182 that is used for the production of LaSOM 183 when reacted with sodium azide in a mixture of water-acetone (1:1). "Click Chemistry" involving LaSOM 183 (0.1 mmol) were carried out with a diverse set of commercially available terminal alkynes, having different steric bulk, hydrogen-bonding and hydrophobic groups. The cycloaddition coupling was performed using a 10 mol % excess of the terminal alkynes in a sealed tube under MW conditions. Copper sulfate (0.03 mM) and sodium ascorbate (0.1 mM) were used in the experiments for the *in situ* generation of Cu(I) catalyst. The reactions were conducted at 80 °C for ca of 20-50 min in DMF and purified by simple silica-gel filtration.



Scheme 1: Synthetic route to obtain coumarin-triazole hybrids

RESULTS AND DISCUSSION

In fact, the "Click Chemistry" is a great alternative to the structural diversification of coumarins containing azide group at the position 7. The presence of a linker between azide group and coumarin ring prevent the aromatic effects in the azide group and can be increasing the reaction yields. Thus, we have synthesized a series of 39 derivatives (Figure 2) in excellent yields (70–100%), and with complete regioselectivity (according ¹H NMR spectra). Experiments will be realized to evaluate the antiproliferative breast cancer effects of the target compounds.

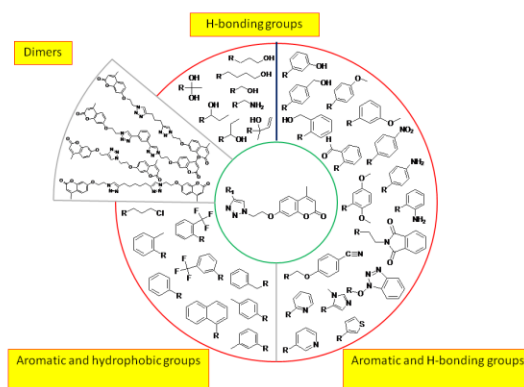


Figure 1: Coumarin-triazole hybrids obtained by "Click Chemistry"

REFERENCES

- ¹Saklani, A.; Kutty, A.K. Drug discovery Today. **2008**. 13(161–171);
- ²Urakawa, H. *et alii.* ; Int. J. Cancer. **2012**. 130(2), 454–66;
- ³Vianna, D. *et alii.* Int. J. Mol. Sci. **2012**. 13, 7260–7270;
- ⁴Guo L. *et alii.* Eur. J. Pharmacol. **2006**. 538, 15–22.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to CAPES(Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior - Brazil) and CNPQ(Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brazil)

HOMOCHIRAL ADENINES OBTAINED THROUGH MICROWAVE CONDITIONS

M. E. García-Rubiño,¹ M. C. Núñez-Carretero,¹ C. Lozano-López,¹ Y. Madrid,² M. A. Gallo,¹ J. M. Campos¹

¹Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, c/ Campus de Cartuja, s/n, 18071 Granada (Spain)

²Centro de Instrumentación Científica, Universidad de Granada, Edificio Mecenas, Campus Universitario de Fuente Nueva, 18071 Granada (Spain)

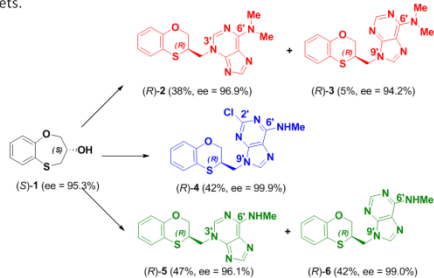


The National Multidisciplinary Congress of Young Researchers

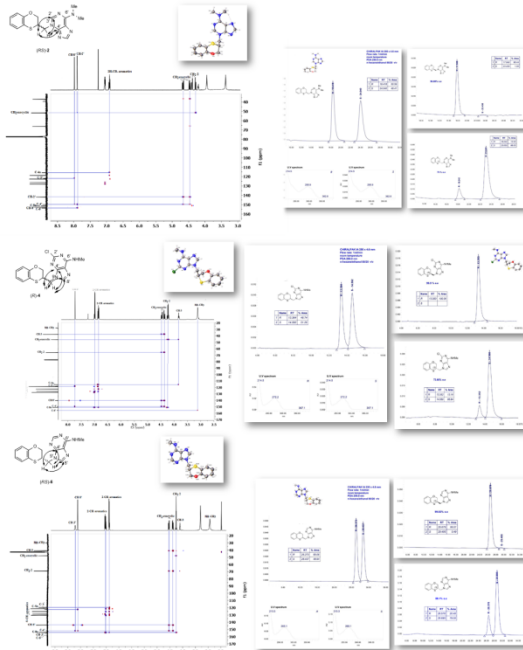
INTRODUCTION

The purine motif is a privileged structure. Its biological relevance and the occurrence of the purine heterocycle in nature make it an attractive target for chemical modification. Adenine stands out against the ample variety of purines, among other things as a component of DNA and RNA.

Alkylation of purines usually results in the formation of *N*-9' and *N*-7' alkympurines [1]. Nevertheless, *N*-3' regioisomers of purines are scarcely reported, especially when a chiral moiety is linked to the purine ring, and these substructures could lead to specific inhibitors of known biological targets.

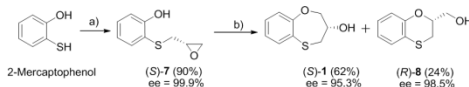


2D-RMN AND HPLC CHROMATOGRAMS



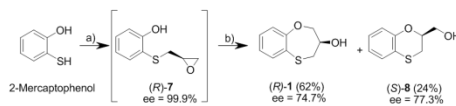
CHEMICAL ASPECTS

When 2-mercaptofenol is reacted with (*R*)-epichlorohydrin, (*S*)-7 is obtained with complete inversion of the stereocenter of its oxirane moiety [1]. This implies a complete regioselective process as a consequence of the nucleophilic attack of the sulfanyl anion at the less hindered face of the oxirane moiety of (*R*)-epichlorohydrin, thus resulting in (*S*)-7 with an excellent ee. Heating (*S*)-7 with NaOH in H₂O gives the cyclization products, (*S*)-1 and the six-membered primary alcohol (*R*)-8 (Scheme 1). The absolute configuration of these intermediates and of the final products of this manuscript has been previously established [2].



Scheme 1. Reagents and conditions: a) (*R*)-epichlorohydrin, pyridine, MW, 140 °C, 10 min, DMF; b) NaOH (1 eq), H₂O, 100 °C, 24 h.

The experimental workup was modified using (*S*)-epichlorohydrin. Scheme 2 shows the different stereochemical behavior although pathway a) is exactly the same as that shown in Scheme 1, compound (*R*)-7 is not isolated and more DMF is added (instead of water).



Scheme 2. Reagents and conditions: a) (*S*)-epichlorohydrin, pyridine, MW, 140 °C, 10 min, DMF; b) not isolating (*R*)-7, NaOH (1 eq), DMF, 100 °C, 24 h.

The formation of (*R*)-7 follows the same pattern for (*S*)-7. Nevertheless, HCl is present in the reaction and it produces racemisation [3]. Accordingly, (*R*)-7 follows two different pathways, a preferential S_N2 process and a S_N1 process with concomitant racemization.

CONCLUSIONS

- 1) A typical and standardized alkylation condition has been used to study the reaction of several substituted adenines [6-*N,N*-dimethyl-, 2-chloro-6-*N*-methyl-, and 6-*N*-methyl-adenines] with racemic 3,4-dihydro-2*H*-1,5-benzoxathiepin-3-ol, [(*RS*)-1] and its two enantiomers through the Mitsunobu reaction under microwave conditions.
- 2) The alkylated aminopurines reveal a complete inversion of the stereogenic center of the secondary alcohol giving an alkylated purine linked to a homochiral six-membered ring.
- 3) Alkylation sites have been determined by 2D NMR techniques and for three compounds have been confirmed by X-ray crystallography.
- 4) The *N*-9'/*N*-3' regioselectivity can be justified by the electronic effects of the substituents at positions 2' and 6' of purine.
- 5) Several biological studies on the chiral and achiral molecules described here are underway.

REFERENCES

- [1] Díaz-Gavilán, M.; Gómez-Vidal, J. A.; Rodríguez-Serrano, F.; Marchal, J. A.; Caba, O.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. A. Anticancer Activity of (1,2,3,5-Tetrahydro-4,1-Benzoxazepine-3-yl)-Pyrimidines and Purines against the MCF-7 Cell Line: Preliminary cDNA Microarray Studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1457-1460.
- [2] García-Rubiño, M. E.; Conejo-García, A.; Núñez, M. C.; Carrasco, E.; García, M. A.; Choquesillo-Lazarte, D.; García-Ruiz, J. M.; Gallo, M. A.; Marchal, J. A.; Campos, J. M. *Curr. Med. Chem.* **2013**. (In Press).
- [3] Smith, Michael B.; March, J. *March's Advanced Organic Chemistry*, 6th ed.; John Wiley & Sons, Inc: New Jersey, 2007, p 436.

*The M.E. G.-R. FPU grant AP2007-02954 from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain.

*ERDF (European Regional Development Fund) for funding these projects.

*Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigación Sanitaria) through projects no. PI10/00592 and PI10/02295.

ACKNOWLEDGMENTS





Physico-chemical quality parameters of several grown or imported tropical fruits, marketed in the coast of Malaga and Granada

M. Barea, M. Olalla, J.A. Ruffán, R. Giménez.

Department of Nutrition and Bromatology. Faculty of Pharmacy. Campus Cartuja, s/n 18007 Granada



The mundial production of tropical fruit will reach 82 millions of tons in 2014¹. United States and Europe are the main import countries and the export countries are developing their economic situation (Malasia, India, Costa Rica...). The FAO says that this activity improve the situation of the export countries, improving the food security, increasing the employed and decreasing the poverty. The fruit quality will mark the choice of the import countries, not the price¹.

Furthermore, although continental Spain is considered a temperate country, where temperate fruits, olives and also citrus are the main tree fruit crops, subtropical fruits such as avocado and annona have been long cultivated in the coastal areas of Andalusia².

Concretly: in the Axarquía in Malaga and in the tropical coast of Granada.

- Tourist
- Intensive agriculture hortícola products.

INTRODUCTION

JUSTIFICATION & OBJETIVES

We study the physico chemical parameters of several tropical fruits grown and marketed in this area and we will compare these with:

- the same fruits grown in others national place
- the same fruits had been imported (international) sold in markets of east coast Andalusia.

This parameters will give us an maturity index and quality characteristics of all them, so we will can see the different between local tropical fruits and other national crops with more years or crops internationals, who have been imported and carry on it long travels.

We consider that the quality of these tropical fruits grown in the coast of Malaga and Granada will not only be the same, but sometimes exceed the quality of the other ones.

MATERIAL & METHODS

We collected two fruits from five different markets or particular producer of the coast of Malaga and Granada. We study the follow fruits:

MANGO Malaga, Granada, Brazil, Peru, Ecuador	PAPAYA Canaria, Brazil	PERSIMMON Malaga, Granada, Valencia	KIWI FRUIT Granade, Galicia, Chile, Italy, New Zeland	STARTFRUIT Malaga, Colombia, Malasia

The fruits were got at two sampling periods: one from DEC-MAR and OCT-DEC.

Once in the work place, the weight and length measurements were taken. Only the edible portion (pulp) was used for analysis. The fruit was lyophilised. The wet matter was obtained after lyophilisation. The total acidity was measured by titration, in this moment is taken the pH initial. The Brix degree (°Bx) was measured using an Abbe refractometer.

RESULTS & DISCUSSION

The lowest moisture is found in Papaya from Brazil (65,4% ± 3,18) and Mango from Malaga (69,5% ± 0,39) and the highest in Startfruit from Malaga (91,2% ± 0,28), but all the measurements are inside of the normal level of moisture (70-95%).

The pH is constante in both samplings and in each fruit with his normal valor.

In relation to maturity index the most relevant have been that in persimmon the maturity of local fruit was higher than valencian sample. The international fruits, Malasia, New Zeland and Brazil have index of maturity higher. Authors reported that the °Bx increase during the storage⁽⁴⁾. Brazilian mango is the highest maturity and our data is conording with found by other authors⁽³⁾.

In this study we see that in relation of quality parameters, local tropical fruits grown in coast of Malaga and Granada have the same levels in comparing with national and international ones.

Concretly in the maturity index the result have a high variability. Kiwi fruit have a similar index in compare with national and international samples. Persimmon at contrary have a very variable index of maturity in compare with valencian sample. Maybe that is because valencian persimmon have a denomination of origen with a very controlled production.

Brazilian samples have the highest index, maybe agree with the long travel and the time of storage.

CONCLUSION

REFERENC: (1) FAO, 2012.
 (2) Galán Saucó, V; Farré Messip, J.M. *Chronica Horticulturae*, 2006, 46, 26-30
 (3) Rodríguez Pleguezuelo et al 2012. Physico-chemical quality parameters of Mango (*Mangifera indica* L.) fruits grown in a Mediterranean subtropical climate (SE Spain). *J. Agr. Sci. Tech* 14: 365-374.
 (4) Santoni, F. et al 2013. Influence of cultivation parameters on the composition of volatile compounds and physico-chemical characteristics of kiwi fruit. *J. Sci Food Agric*, 93: 604-610.



ACCIÓN DE DISTINTOS PRODUCTOS NATURALES SOBRE ANISAKIS TIPO I

Gómez-Mateos M*, Valero A*, Romero MC*, Navarro-Mol MC**

*Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. avalero@ugr.es
**Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. cnavarro@ugr.es

Introducción

España es el segundo país del mundo con mayor número de infecciones por *Anisakis* spp., después de Japón, siendo la principal causa el consumo de boquerones en vinagre. Esta parasitosis puede cursar con cuadros gastrointestinales y reacciones alérgicas más o menos graves, lo que hace necesario la búsqueda de tratamientos farmacológicos, no disponibles en el mercado. Entre las investigaciones dirigidas a encontrar un tratamiento eficaz frente a la anisakiosis, destacan las relativas a la actuación de distintos productos naturales, tales como los aceites esenciales y sus principales componentes, obtenidos a partir de la flora aromática. En este sentido nuestro grupo de trabajo ha establecido una línea de investigación (1-4), basada en el estudio de la actividad larvícida de distintas especies aromáticas empleadas habitualmente en nuestro país.

Material y métodos

Los parásitos fueron aislados a partir del hospedador *Micromesistius poutassou* (bacaladilla) (Fig. 1-2). Para el ensayo *in vitro* las L3 de *Anisakis* Tipo I se avivaron en solución antibiótica durante 20 minutos. Seguidamente, se depositaron individualmente en placas de poliestireno con 2 ml de NaCl al 0,9 % estéril y 20 µl de la solución etanólica de los diferentes productos naturales (Fig. 3). Las concentraciones finales ensayadas fueron 125, 62,50 y 31,25 µg/ml. A continuación, se procedió a la incubación a 37°C con un 5% de CO₂. La observación de los parásitos se realizó con el microscopio estereoscópico a las 4, 8, 24 y 48 horas atendiendo a criterios de movilidad. Cada producto se ensayó cinco veces en días diferentes con el fin de asegurar que las larvas mueren por acción de los productos ensayados.

En el estudio *in vivo* se infectaron ratas Wistar hembra con 6 larvas de *Anisakis*, mediante sondaje gástrico junto con el producto natural a ensayar (46,9 mg/0,5ml de aceite de oliva) y se sacrificaron a las 4 horas para observar si se producen lesiones digestivas y aparecen larvas muertas, fijadas y/o en la cavidad gastrointestinal (Fig 4-6). De forma paralela, a los animales del grupo control se les administraron 6 larvas y 0,5 ml de aceite de oliva.

Objetivo

Habida cuenta de que diversos productos naturales se han mostrado activos frente a distintos agentes patógenos, hemos procedido a estudiar la posible actividad de algunos de ellos frente a las larvas L3 de *Anisakis* Tipo I.



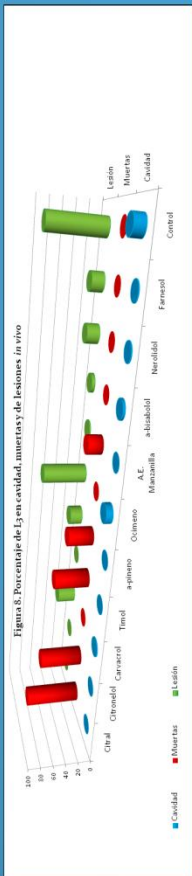
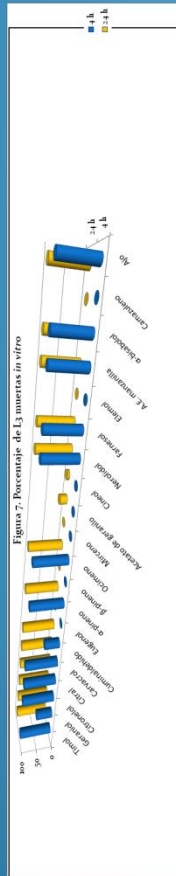
Figura 1. Larvas de *Anisakis* spp. en bacaladilla. (Microscopio estereoscópico)
Figura 2. Larvas L3, en solución salina 0,9%
Figura 3. Ensayo *in vitro* en placas de poliestireno
Figura 4. Sondaje gástrico con larvas de *Anisakis* spp. Tipo I
Figura 5. Infección del animal con larvas L3 de *Anisakis* spp. Tipo I
Figura 6. Sacrificio de los animales y localización de las larvas.

Resultados

Respecto a los derivados monoterpénicos probados *in vitro*, citral, citral, carvacrol y citronelol provocaron el 100 % de mortalidad de las larvas a las 4 h del ensayo, a una concentración de 125 µg/ml, cuando se administraron citral y citronelol a los animales no se produjeron lesiones en su sistema gastrointestinal y si la inactivación de la mayoría de las larvas. Se han encontrado resultados similares *in vitro* con los monoterpénicos no oxigenados α -pineno y ocimeno, mientras que su actividad *in vitro* fue significativamente menor, al igual que el efecto de otros derivados utilizados. El α -bisabolol, sesquiterpene presente en el aceite esencial de manzanilla, fue muy eficaz *in vitro* y *in vivo*, del mismo modo que dicho aceite esencial, a 125 µg/ml. Otros sesquiterpenos, nerolidol y farnesol, también se muestran como posibles productos antimisakís. Por su parte, un licuado de ajo provocó la muerte de todas las larvas a las 4 h.

Conclusión

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*, los derivados monoterpénicos oxigenados, seguidos de los sesquiterpenos, muestran una mayor actividad larvícida que los monoterpénicos no oxigenados. El uso de los aceites esenciales y/o los diferentes compuestos naturales se presenta como una buena opción en el tratamiento de la anisakiosis humana.



1) Herrero A, Valero A, Romero MC, Navarro M. *In vivo* larvicidal activity of monoterpene derivatives from sea anemone plant against L3 larvae of *Anisakis simplex*. J. Parasitol. 31: 2007, 22-28.
2) A. Valero, A. Herrero, F. González, F. Román, M.C. Navarro. Activity of natural essential oils and their main components against L3 larvae of *Anisakis simplex*. J. In. P. 133: 2011, 1-6.
3) A. Valero, A. Herrero, F. González, F. Román, M.C. Navarro. Activity of natural essential oils and their main components against L3 larvae of *Anisakis simplex*. J. Parasitol. 33: 2007, 249-256.
4) M.C. Navarro, A. Valero, F. Román, F. González, A. Valero. Actividad de aceites esenciales frente a larvas L3 de *Anisakis simplex*. J. Parasitol. 33: 2007, 249-256.
Trabajo financiado por el proyecto Pos-CVI-0310.

DISEÑO DE SISTEMAS TERAPÉUTICOS TRANSDÉRMICOS DE METADONA



María Dolores Muñoz de los Ríos, Herminia Castán, M^a Adolfinia Ruiz y M^a Encarnación Morales.
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.



INTRODUCCIÓN

El clorhidrato de metadona es un opiáceo sintético. Se emplea como analgésico y como supresor del síndrome de abstinencia en la desintoxicación de los heroinómanos.

En los últimos años, ha surgido un interés creciente por el desarrollo de nuevos sistemas terapéuticos transdérmicos (STT), en el caso de la metadona, permitiría un mejor control de la posología y el mantenimiento constante de los niveles plasmáticos del fármaco durante el tiempo de aplicación del sistema. De este modo se evitaría un mal uso de este medicamento por parte del paciente y mejorar su colaboración en el tratamiento de deshabituación de opiáceos, además de suponer una potencial alternativa en el tratamiento del dolor crónico.

MATERIALES Y MÉTODOS



FIGURA 1.
EXTENSIÓMETRO

MATERIAL

Para el diseño de un STT hemos utilizado: clorhidrato de metadona, eudragit® E 100, ácido láurico, ácido adípico, glicerol, alcohol polivinílico, etanol, agua destilada, propilenglicol y sorbitol.

MÉTODO DE ELABORACIÓN DEL STT.

Primero se prepara el plastoid: dispersamos el eudragit en una solución de ácido láurico y ácido adípico a 80 °C y se agita a 450 rpm durante 45 minutos. Se enfría a 60 °C y se añade glicerol. Se enfría hasta temperatura ambiente bajo agitación continua.

A continuación el principio activo se adiciona al agua de la formulación bajo agitación continua y protegido de la luz. Una vez disuelto se añade el resto de componentes. Se mantiene 24 horas en un agitador magnético a 300 rpm. Pasadas las 24 horas se extiende.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ST T	Plastoid gramos	Metadona gramos	PVA gramos	Agua destilada gramos	Glicerol gramos	Etanol gramos	Propilenglicol gramos	Sorbitol gramos
1	27	2	12.4	59.6	1	0	0	0
2	27	1	12.4	59.6	1	0	0	0
3	27	1	12.4	59.6	0	1	0	0
4	27	0.500	12.4	56.6	0	2	2	0
5	27	0.250	12.4	56.6	0	2	2	0
6	27	0.250	12.4	56.6	0	0	2	2
7	27	0.250	12.4	56.6	0	0	2	2
8	27	0.250	12.4	54.6	0	0	3	3

CONCLUSIONES

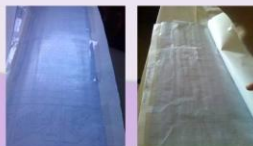
El resultado de la laminación nos ha mostrado la incompatibilidad entre metadona y glicerol, ya que es insoluble en glicerina. Es necesaria la asociación de agentes filmógenos, para conseguir películas uniformes y homogéneas.

Podemos afirmar que el propilenglicol y el sorbitol se pueden utilizar como agentes filmógenos compatibles con el clorhidrato de metadona. No obstante, se hace necesario continuar nuestra formulación más adecuada para el fármaco objeto de estudio y con total ausencia de retracción durante el proceso de desecación.

BIBLIOGRAFÍA

Andresen T, Staahl C, Drewes AM. Effect of transdermal opioids in experimentally induced superficial, deep and hyperalgesic pain. *British Journal of Pharmacology*. 2011: 934-945.

Henrique A, Parsons MD, Maxine de la Cruz, M.D., Eduardo Bruera MD. Methadone initiation and rotation in the outpatient setting for patients with cancer pain. *Cancer*. 2010: 520-528.



El resultado ha mejorado notablemente ya que se consigue evitar en gran medida la retracción de la película de parche durante la desecación..



Presencia de flebotomos *Phlebotomus perniciosus* y *P. ariasi* vectores de *Leishmania infantum* durante el periodo invernal en el área Termomediterránea del sur de España

Morillas Márquez, M.J.; Abattouy, N.; Barón López S.; Balderas López, M.; Díaz Sáez, V.; Martín Sánchez, J., Morillas Márquez, F.

Dpt. Parasitología, Fac. Farmacia, Univ. Granada, ESPAÑA

Introducción: El termomediterráneo del sur de España presenta inviernos benignos sin heladas, lo que induce a pensar que los vectores de *Leishmania infantum* (*Phlebotomus perniciosus* y *P. ariasi*) podrían tener actividad durante dicho periodo, máxime si en los últimos años parece haber aumentado la Temperatura.

Métodos: Para comprobar dicha actividad invernal, realizamos un muestreo en 27 estaciones de captura del Termomediterráneo de la provincia de Granada, entre los meses Noviembre-Abril, empleando los papeles adhesivos de superficie de trampa (Fig.1-2-3).



Fig 1. Localidad de Guajares: Valle del río de la Toba.



Fig 2. Zonas de muestreo: muros de contención, con huecos donde se colocan las trampas.



Fig. 3. a-b. Puesta del papel adhesivo. C. Papel adhesivo con los flebotomos capturados

Resultados: los dos vectores de *L. infantum* son los que presentan mayor pervivencia durante los meses invernales. *P. ariasi* se captura con densidades de 1'79, 0'39, 0'28, 0'27, 0'69 y 3'15/m² desde Noviembre a Abril, respectivamente. *P. perniciosus* se captura en Noviembre, Diciembre y Abril, con una densidad media de 7'04 y 3'15 ejemplares/m² en Noviembre y Abril respectivamente (gráfico 1).



Gráfico 1. Pervivencia de *Phlebotomus perniciosus* y *P. ariasi* en los meses invernales



Fig.3. Pueblo de Gualchos: En una estación de este pueblo se capturaron 87'77 Pa+Pp/m² en el mes de Abril

Más importante aún, en algunas estaciones las densidades son netamente superiores a la media global, llegando en Abril a 87'77/m² si se contabilizan conjuntamente ambas especies. Estas cifras son especialmente significativas si se tiene en cuenta que se ha comprobado que cuando la densidad de vectores es ≥ 4 ejemplares/m² hay mayor riesgo de transmisión de leishmaniosis. *P. sergenti* se captura en Noviembre y Abril; *P. papatasi* solo en el mes de Noviembre.

Conclusiones: es aconsejable adelantar el periodo de inicio de las campañas informativas para el inicio del control de la leishmaniosis canina

Abstract

The objective of this work is to study numerically the hydrodynamics of a droplet of pure water falling in a continuous oily phase. The model under focus is two-dimensional and includes gravity and the basic physical properties that occur at interfaces like surface tension. Particular emphasis is put on the tracking of liquid-liquid interfaces and on the limitation of numerical diffusion. This is indeed fundamental for a precise description of the phenomena that arise at interfaces in particular between drops in dispersed systems like emulsions .

Numerical model

We assume the two fluids under consideration to be Newtonian and incompressible, with uniform surface tension and no phase change. The evolution of the two-phase flow is described using the one-fluid VOF (Volume Of Fluid) formulation of the Navier–Stokes equations.

The numerical simulations rely on a color function that describes the relative volume fraction of the two fluids. This function is set to one (resp. zero) in cells filled with fluid 1 (resp. 2) and takes intermediate values in the cells belonging to the interface region (fi

Mathematical model

$$\begin{aligned} \nabla \cdot \mathbf{V} &= 0 \\ \rho \frac{\partial \mathbf{V}}{\partial t} + \rho \mathbf{V} \nabla \cdot \mathbf{V} &= -\nabla P + \rho \mathbf{g} + \mu \Delta \mathbf{V} + \sigma \kappa \mathbf{n} \nabla C \\ \frac{\partial C}{\partial t} + \mathbf{V} \cdot \nabla C &= 0 \\ \rho(\mathbf{x}, \mathbf{y}, t) &= \rho_{PO} + (\rho_W - \rho_{PO}) \times H(C(\mathbf{x}, \mathbf{y}, t)) \\ \mu(\mathbf{x}, \mathbf{y}, t) &= \mu_{PO} + (\mu_W - \mu_{PO}) \times H(C(\mathbf{x}, \mathbf{y}, t)) \end{aligned}$$

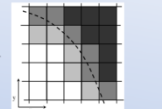


Fig 1 : Schematic plot of the color function in the vicinity of the interface. VOF cells appear as squares and the interface location as a dashed curve. White cells are inside the droplet (C(x,y)=1) and black in the paraffin oil (C(x,y)=0). Grey cells correspond to intermediate interface region.

Interfaces modelling

Model CSF Continuum surface force

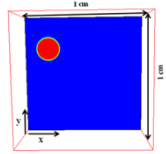


Fig 2 : Example of color function C(x,y) for a 200x200 mesh grid at time t=0.2 s. Orientation of gravity field is top down and droplet radius is r=1 mm. Water/paraffin oil interface shows a good spatial resolution. Initially, the center of the droplet is located at and velocity are all set to zero.

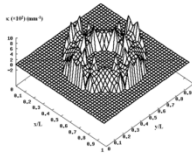


Fig 3 : 3D illustration of the curvature for a droplet radius r=15 mm and for a 40 x 40 Cartesian mesh grid and a box size of 60 mm x 60 mm. The center of the droplet is at x/L=0.5 and y/L=0.5 where L=60 mm is the length of the side of the box.

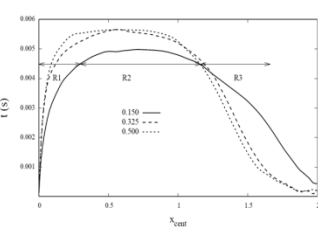


Fig 1 : Time evolution of the average velocity for a r=1 mm droplet at t=200 h. Initial height is and positions vary and are given in the legend.

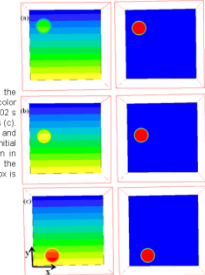


Fig 1 : Contour plot of the pressure field (left) and color function (right) at time t=0.02 s (a), t=1.00 s (b) and t=1.5 s (c). Droplet radius is r=1 mm and mesh grid resolution is 1. Initial condition is the same than in Figure 2. Pressure at the bottom (resp. top) of the box is (resp.) .

Hydrodynamics inside the droplet

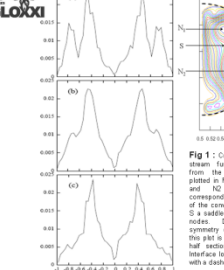
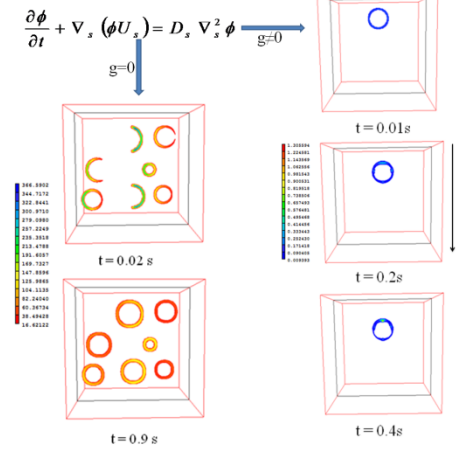


Fig 1 : Values of ϕ_1 and ϕ_2 as a function of the initial height h. The initial height h is same than in Figure 3. Time duration of regime trees R1, R2 () and R3 () in the case are represented by arrows.

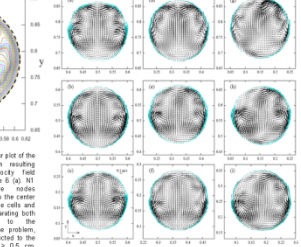


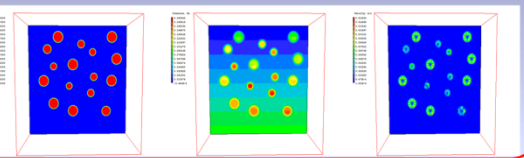
Fig 1 : Contour plot of the stream function resulting from the velocity field plotted in Figure 0 (a), (b) and (c) with nodes corresponding to the center of the convergent cells and S a saddle separating both nodes. Due to the symmetry of the problem, this plot is restricted to the half section x >= 0.5 cm. Interface location is plotted with a dashed line.

Conclusions and perspectives

Conclusions
This work presents the method and the results of the simulation of the hydrodynamics inside and on the interface of a water droplet in paraffin oil and under gravity conditions. Good resolution of the interface is achieved and precise predictions are obtained for the velocity distributions and Laplace pressure differences.

Perspectives
Role of surface active molecules and interfacial rheology in the dynamics of droplets. Influence of oil soluble surfactants on the time evolution of the droplets.

Simulation of the aging dynamics of diluted emulsions.



Refs : J.Brackbill & J.Zemach Comput. Phys. 1983
G.Balmigere , S.Vincent & J.Caltagirone. Comput. Phys. 2007
A.Lekhlifi, M.Antoni & J.Ouzzani. 2009

PROCESOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN BASADOS EN EL USO DE SALES DE HIERRO PARA LA ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES DE LAS AGUAS



Velo-Gala, I., Sánchez-Polo, M., López-Peñalver, J.J., Rivera-Utrilla, J.
 Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada.
 Granada (España), invega@ugr.es

Universidad de Granada

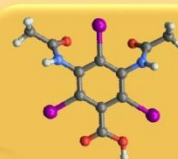
OBJETIVOS

- Comparar los procesos basados en el uso de sales de hierro (Fe(II)/H₂O₂, Fe(III)/H₂O₂ y Fe(VI)) en la degradación de DTZ (modelo de contaminantes emergente) en agua.
- Analizar el mecanismo de reacción y la función de los diferentes parámetros operacionales en cada proceso de oxidación.
- Determinar la toxicidad de los subproductos de degradación del DTZ.

Contaminante emergente

Polar

Presente en aguas residuales, superficiales y subterráneas (mg L⁻¹)



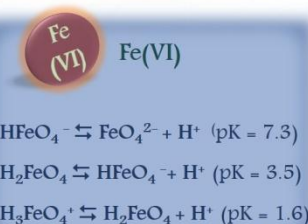
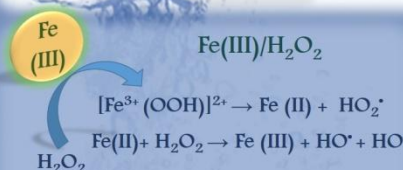
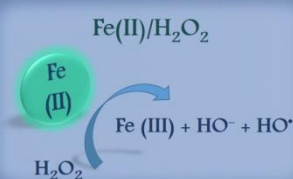
DIATRIZOATO DE SODIO (DTZ)

Elevada producción y consumo

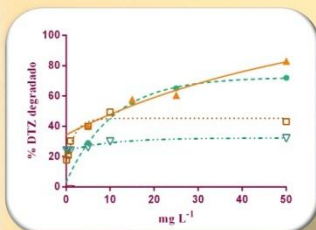
Inerte

Productos de degradación estables y más tóxicos

EXPERIMENTAL

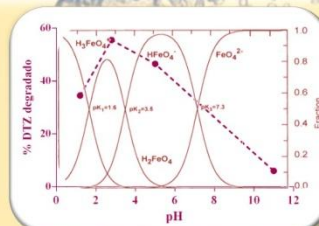


RESULTADOS

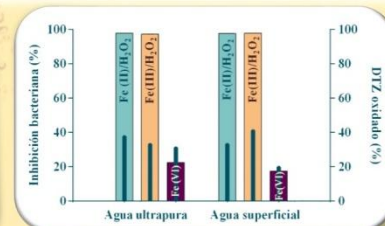


Influencia del [H₂O₂] y [Fe(II)] o [Fe(III)] en los procesos Fe(II)/H₂O₂ y Fe(III)/H₂O₂ ([DTZ] = 25 mg L⁻¹; pH = 3; T = 298K).

- (●) [Fe²⁺] = 5 mg L⁻¹, [H₂O₂]₀ = 5, 15, 25, 50, 100 mg L⁻¹
- (▲) [Fe³⁺] = 5 mg L⁻¹, [H₂O₂]₀ = 5, 15, 25, 50, 100 mg L⁻¹
- (▼) [H₂O₂]₀ = 5 mg L⁻¹, [Fe²⁺] = 5, 15, 25, 50, 100 mg L⁻¹
- (□) [H₂O₂]₀ = 5 mg L⁻¹, [Fe³⁺] = 5, 15, 25, 50, 100 mg L⁻¹



Influencia del pH en el proceso Fe(VI) (●) % DTZ degradado dependiendo del pH de la disolución.



Efecto de la matriz acuosa en la degradación de DTZ (■) y toxicidad del efluente (■).

CONCLUSIONES

- Los procesos de oxidación basados en el uso de sales de hierro son eficientes para la degradación de DTZ.
- La concentración de H₂O₂ es el factor más influyente en los procesos Fe(II)/H₂O₂ y Fe(III)/H₂O₂.
- El pH de la disolución determina el porcentaje de eliminación de DTZ en el proceso Fe(VI).
- La naturaleza de la matriz acuosa no influye en la degradación del DTZ en estos procesos.
- La toxicidad del efluente resultantes es menor tras el proceso Fe(VI).

NANOPARTÍCULAS DE PBCA PARA MEJORAR LA EFICACIA DEL 5-FLUOROURACILO EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE COLON

Leiva, M.C.¹, Carrasco, E.¹, Cabeza, L.¹, Rama, A.², Caba, O.², Melguizo, C.¹, Arias, J.L.³, Ruiz, A.³, Prados, J.C.¹

¹Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Anatomía y Embriología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Granada; ²Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén; ³Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada

Introducción

El cáncer de colon presenta una gran prevalencia en nuestro país. Uno de los fármacos de elección para su tratamiento, el 5-fluorouracilo (5-Fu), posee limitaciones en su aplicación que derivan de su rápida metabolización, baja especificidad y alta toxicidad en tejidos sanos. Las nanopartículas (NPs) permiten mejorar la farmacocinética de los agentes antitumorales e incrementar su acumulación en el interior de la célula tumoral. La asociación de nanopartículas y agentes citotóxicos, como el 5-FU, puede suponer una nueva vía para mejorar los efectos de este fármaco frente al cáncer de colon.

Objetivo

Desarrollar NPs de poly(butyl cyanoacrylate) (PBCA) asociadas a 5-FU que permitan mejorar la actividad del fármaco frente a células tumorales de cáncer de colon.

Materiales y Métodos

Cultivos celulares: se utilizaron las líneas de cáncer de colon: RKO y SW480 (American Type Culture Collection-ATCC, Manassas, VA) y MC38.

Nanopartículas: Las NPs de PBCA fueron sintetizadas por el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada.

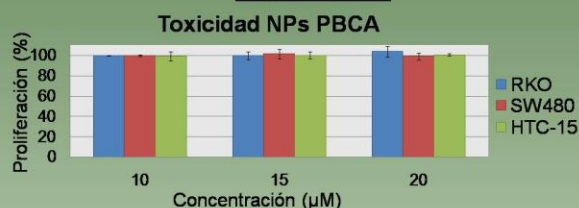
Estudios de proliferación: Las células se sembraron en placas de 24 pocillos. Se les administró el tratamiento y se dejó actuar durante 72h. Se fijaron las placas con ácido tricloroacético, y se tiñeron con sulforrodamina B. Ésta se retiró para medir la absorbancia en un espectrofotómetro y se comparó cada tratamiento con el control sin tratar.

Ensayos in-vivo: a ratones hembra C57BL/6 (Charles River, Barcelona, Spain) se les inoculó subcutáneamente la línea MC38.

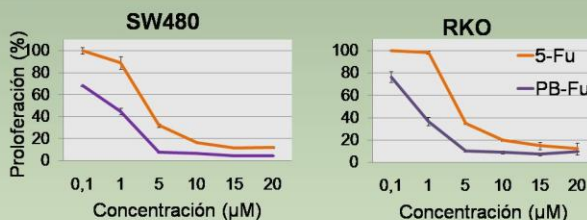
Cuando los tumores fueron palpables, grupos de 10 ratones fueron tratados con PBCA, 5-FU, PBCA-5-FU (10mg/kg en 5 dosis), y un grupo control sin tratar. El volumen tumoral fue analizado a lo largo del tratamiento y se calculó con la fórmula $V = (a \times b^2 \times \pi) / 6$, siendo a el diámetro mayor y b el menor.

Análisis estadístico: Statistical Package for the Social Sciences v.15.0 (SPSS), con test de t-Student a un nivel de significación de 0.05 ($\alpha = 0,05$).

Resultados

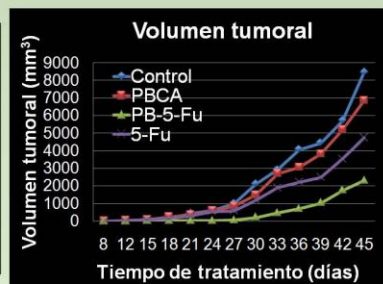


Estudios de proliferación: Todas las líneas tumorales tratadas con PBCA-5-FU mostraron una inhibición de proliferación significativamente mayor que las tratadas 5-FU libre.




Ensayos in-vivo:

El tratamiento con PBCA-5-FU provocó una reducción significativa del volumen tumoral en comparación con el 5-FU libre (p-valor < 0,05).



Conclusiones


La asociación de NPs de PBCA al agente 5-FU mejora en efecto antitumoral in vitro e in vivo en células de cáncer de colon, respecto al 5-Fu libre. Estos resultados sugieren que esta nanoplataforma podría ser usada como nueva estrategia para el tratamiento del cáncer de colon.



EXPRESIÓN DE MGMT Y CD133 COMO BIOMARCADOR PRONÓSTICO EN ADENOCARCINOMA COLORRECTAL

Oliver, J.A.¹, Jiménez-Luna, C.¹, Perazzoli, G.¹, Álvarez, P.¹, Vélez, C.¹, Rama, A.R.², Melguizo, C.¹

¹Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER), Universidad de Granada
²Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén



GRUPO CTS-107

El cáncer colorrectal (CCR), uno de los cánceres más frecuentes, precisa de nuevos marcadores pronósticos y diagnósticos. MGMT, una proteína reparadora de los daños en el DNA por alquilación, y CD133, una proteína asociada a las *cancer stem cells*, están siendo investigadas para tal fin. Nuestro objetivo ha sido analizar las implicaciones clínicas de MGMT y CD133 en el CCR

MATERAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en 123 pacientes con CCR, en los que se determinaron:

Variables clínicas

- Supervivencia libre de enfermedad (SLE)
- Supervivencia global (SG)

Variables moleculares

- Estado de metilación de MGMT
- Expresión de MGMT y CD133

PCR específica de metilación (MSP)

Se realizó la MSP para determinar el estado de metilación de MGMT

Valoración

	Metilado (M)
	No metilado (UM)

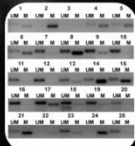


Fig 1. Imagen representativa de MSP

Inmunohistoquímica (IHQ):

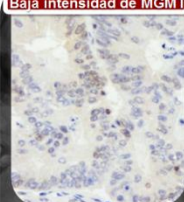
Se realizó la IHQ para C133 y MGMT

Valoración

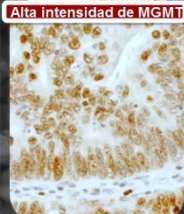
	Porcentaje
	≥50 % (alto)
	<50% (bajo)
	Intensidad
	Alta
	Baja

RESULTADOS


Baja intensidad de MGMT




Alta intensidad de MGMT



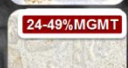
0%MGMT




1-24%MGMT



24-49%MGMT



50-74%MGMT



74-100%MGMT


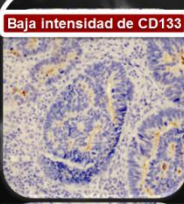
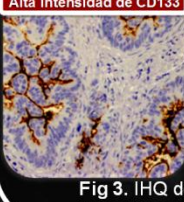


Fig 2. IHQ de MGMT: Marcaje nuclear


Baja intensidad de CD133




Alta intensidad de CD133



0%CD133



1-49%CD133



50-100%CD133

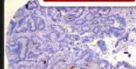


Fig 3. IHQ de CD133: Marcaje endoluminal

1. Determinación de expresión de MGMT (Fig 2)

2. Estudio de correlación de MGMT y datos clínicos:

La SG se correlacionó con la intensidad de expresión de MGMT (Fig 4)

SG media

- Baja intensidad: 61.36 meses
- Alta intensidad: 77.48 meses

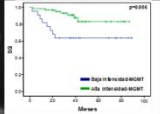


Fig 4. Curvas Kaplan-Meier para intensidad de expresión de MGMT

3. Determinación de expresión de CD133 (Fig 3)

4. Estudio de correlación de CD133 y datos clínicos:

La SLE se correlacionó con el % de expresión de CD133 (Fig 5)

SLE media

- Bajo %: 67.91 meses
- Alto %: 46.01 meses

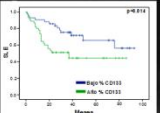


Fig 5. Curvas Kaplan-Meier para % de expresión de CD133

CONCLUSIÓN: nuestros resultados sugieren que MGMT y CD133 pueden ser relevante para la determinación del pronóstico de los pacientes con CCR, indicando su posible papel en la selección de pacientes que requieran una terapia adyuvante más agresiva



USO DE BIOMATERIALES EN LA ENCAPSULACIÓN DE CÉLULAS PARA USO CLÍNICO

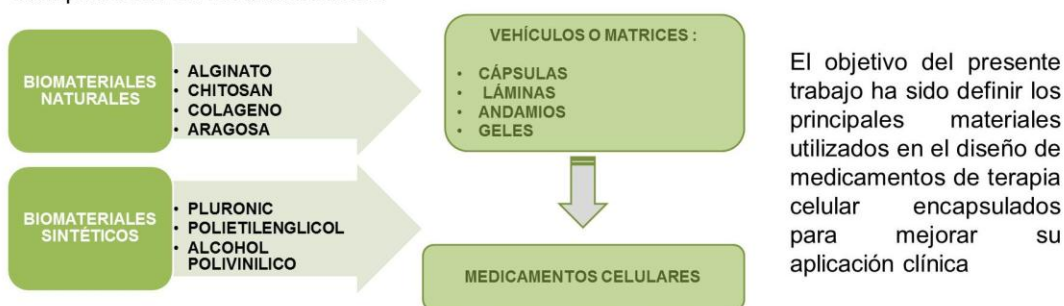
Patricia Gálvez¹, María Jose Martín², Cristina Lorente³, Julia Rodríguez⁴, Beatriz Clares⁵

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Campus de Cartuja s/n, 18071, Universidad de Granada, España. 1. galmafarma@gmail.com; 2. mjmv@ugr.es; 3. crislg@correo.ugr.es; 4. juliarodrgz@correo.ugr.es; 5. beatrizclares@ugr.es



INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

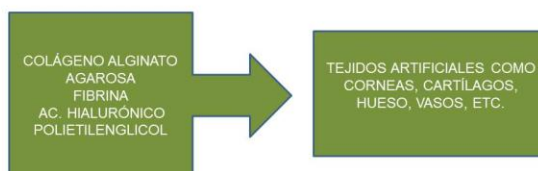
La aplicación clínica de células madre y el desarrollo de nuevos sistemas de administración de fármacos han permitido avances significativos en el campo de la terapia celular y la encapsulación en los últimos años.



MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se realizó una búsqueda en MEDLINE, PUBMED y en clinicaltrial.gov y así poder destacar los estudios más relevantes sobre el uso de biomateriales en terapia celular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



CONCLUSIONES

La capacidad de combinar células y estructuras poliméricas para desarrollar medicamentos celulares, abre nuevas expectativas en la administración de estos fármacos en el área de la Terapia Celular.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Freimark D et al. Use of encapsulated stem cells to overcome the bottleneck of cell availability for cell therapy approaches. *Transfusion Med Hemoth.* 2010;37:66–73.
- 2- Song K et al. Fabrication and evaluation of a sustained-release chitosan-based scaffold embedded with PLGA microspheres. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(3):1506-13.
- 3- Duarte Campos DF et al. Three-dimensional printing of stem cell-laden hydrogels submerged in a hydrophobic high-density fluid. *Biofabrication.* 2013;5(1):015003.
- 4- Chang CC et al. Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011;98(1):160-70.
- 5- Bhat S, Kumar A. Cell proliferation on three-dimensional chitosan-agarose-gelatin cryogel scaffolds for tissue engineering applications. *J Biosci Bioeng.* 2012;114(6):663-70.
- 6- Ko Hfet al. Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2010;368(1917):1981-97.
- 7- Khan F, Ahmad SR. Polysaccharides and their derivatives for versatile tissue engineering application. *Macromol Biosci.* 2013 Apr;13(4):395-421.



Aceite de Argán: nueva perspectiva en la prevención de Enfermedades Cardiovasculares

Julia Rodríguez¹, M^o José Martín¹, Cristina Lorente², Patricia Gálvez², Carmen Cabrera², Beatriz Clares¹.

¹Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada Campus de Cartuja s/n 18007 Granada, España.

²Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada Campus de Cartuja s/n 18007 Granada, España.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Siendo la dislipemia, trastorno metabólico heterogéneo que implica diversas etiologías, el principal factor de riesgo. Comúnmente se caracteriza por un aumento de los triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad (LDL), colesterol y apolipoproteína. Estos componentes, además contribuyen en el desarrollo de la aterosclerosis y la trombosis, dos eventos responsables del inicio y la progresión de ECV. Varios estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales han establecido que la dieta puede tener efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular, y por lo tanto se puede considerar una herramienta terapéutica eficaz para prevenir varios factores de riesgo de ECV, como dislipidemia y diabetes [1].

El aceite de argán se obtiene del fruto del árbol del mismo nombre, *Argania spinosa*. La composición del aceite de argán lo hace especialmente interesante para su aplicación en dermatología y cosmética.



Contiene elevados niveles de ácido linoléico y oleico, así como polifenoles y tocoferoles lo que caracteriza al aceite con un alto valor nutricional y relevancia clínica [2].

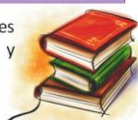
Ácidos grasos	Aceite de Argán	Aceite de oliva
Ácido oleico	43-49%	55-83%
Ácido linoléico	29-36%	3,5-21%
Ácido palmítico	11,5-15%	7,5-20%
Ácido esteárico	4-7%	0,5-5%
Materia insaponificable	1,1%	<1,5%

Tabla 1. Composición del aceite de argán y aceite de oliva.

Objetivo: investigar las ventajas que ofrece la administración oral de este aceite en el tratamiento de ECV mediante el análisis bibliográfico de las principales bases de datos disponibles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda de información en diferentes fuentes bibliográficas Pubmed, Scopus y Science Direct.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio	Pacientes con	Dosis	Resultados
Haimer et al. 2013 [1]	Pacientes con dislipemia	20 ml/día	Reducción del colesterol total y LDL (24-25%)
Mekfi et al. 2012 [3]	Ratones Wistar	1ml/100g/día	Mostraron una actividad antitrombótica de prevención
Sour et al. 2012 [4]	Pacientes sanos	15 g/día	↑ concentración Vitamina E, ↓ LDL y TGA
Ould et al. 2011 [5]	Pacientes con dislipemia	25 ml/día	↓ TGA (12%), ↓ Colesterol total (9%), ↓ LDL (12%)
Derouiche et al. 2005 [6]	Pacientes sanos	25 g/día	↓ TGA
Berrougui et al 2005 [7]	Pacientes sanos		↑ Vitamina E y ↑ Efecto antioxidante
Drissi et al. 2004 [8]	Pacientes sanos	15 g/día	↓ Ácidos grasos poliinsaturados y ↓ LDL
Berrougui et al 2004 [9]	Ratas Wister hipertensas	10 ml/kg/día	↓ presión arterial
Berrougui et al 2003 [10]	Ratas shawi	1 ml/kg/día	↓ colesterol total, ↓ LDL, ↓ TGA y peso corporal
Berrada et al 2000 [11]	Ratas	5 ml/kg/día	↓ Presión arterial

Tabla 2. Estudios realizados con Aceite de Argán en ECV.

CONCLUSIONES

La incorporación del aceite de Argán a la dieta diaria, supone un beneficio en la prevención de las ECV. Ya que su consumo diario reduce de forma significativa los valores de colesterol total, de TGA y las LDL. El aceite de argán puede ser usado como alimento funcional que reduce el riesgo cardiovascular.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Haimer A., Messaoui H., Ulmann L., Mimouni V., Marar A., Charabi A., Tremblin G., Meskini N. Argan oil prevents prothrombotic complications by lowering lipid levels and platelet aggregation, enhancing oxidative status in dyslipidemic patients from the area of Babat (Morocco). *Lipids in Health and Disease*. 2013;12:107.
- [2] Cabrera-Vique, C.; Marfil R.; Giménez, R.; and Martínez-Augustín, O. Bioactive compounds and nutritional significance of virgin argan oil—an edible with potential as a functional food. *Nutrition Reviews*. 2012;70(5):266-279.
- [3] Mekhfi H., Belmekki F., Ziyat A., Legssyer A., Bnouham M., Aziz M. Antithrombotic activity of argan oil: An in vivo experimental study. *Nutrition*. 2012;28:937-941.
- [4] Sour S., Belarbi M., Khalid D., Benmansour N., Sari N., Nani A., Chemat F., Visioli F. Argan oil improves surrogate markers of CVD in humans. *British Journal of Nutrition*. 2012;107:1800-1805.
- [5] OuldMohamedou M.M., Zouirech K., ElMessal M., El Kebhaj M.S., Charabi A., Adloun A. Argan Oil Exerts an Antithrombotic Effect by Improving Lipids and Susceptibility of LDL to Oxidation in Type 2 Diabetes Patients. *International Journal of Endocrinology*. 2011.
- [6] Derouiche A., Cherki M., Drissi A. Nutritional intervention study with argan oil in man: effects on lipids and apolipoproteins. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2005;49:196-201.
- [7] Berrougui H., Cloutier M., Isabelle M., Khalil A. Phenolic extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*. 2006;184:389-396.
- [8] Drissi A., Girona J., Cherki M. Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). *Clinical Nutrition*. 2004;23:1159-1166.
- [9] Berrougui H., Sotomayor M., Pérez-Guerrero C., Ettaib A., Hinamouchi M., Marhuenda E., Herrera M. Argan (*Argania spinosa*) oil lowers blood pressure and improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition*. 2004;92:921-929.
- [10] Berrougui H., Ettaib A., Herrera Gonzalez M.D., Alvarez de Sotomayor M., Benani-Kabchia N., Hinamouchi M. Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in Meriones shawi rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003;89(1):15-18.
- [11] Berrada Y., Settaf A., Bakkouri K., Cherrah A., Hassar M. Experimental assessment of antihypertensive and hypolipidemic effects of oil of Argan, *Argania sideroxylo*n. 2000;55(3):375-378.



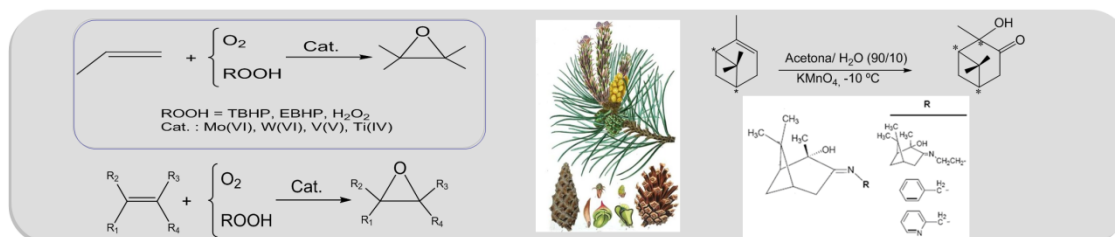
COMPLEJOS OCTAÉDRICOS DE MOLIBDENO (VI) CON LIGANDOS POLIFUNCIONALES DERIVADOS DE α -PINENO. SÍNTESIS Y PROPIEDADES CATALÍTICAS.

Ghaita Chahboun,^a José A. Brito,^b Eva Royo,^a Tomás Cuenca,^a Beatriz Royo,^b Mohamed Amin Elamrani,^c Abdelaziz Dahdouh,^c

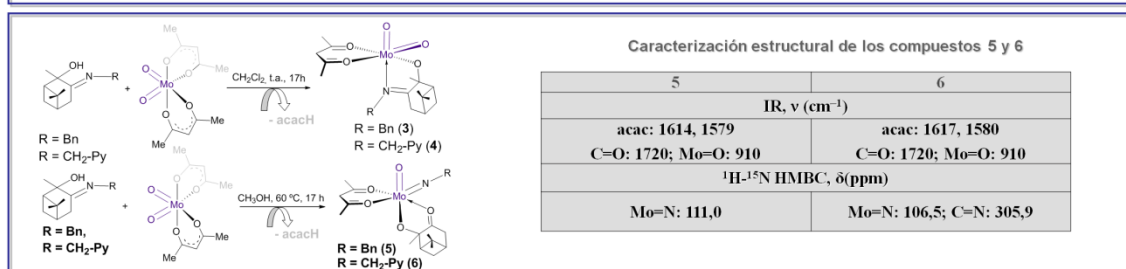
^aDpto. de Química Inorgánica, Campus Universitario, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España

^bInstituto de Tecnología Química y Biológica da Universidad Nova de Lisboa, Oeiras, Lisboa, Portugal

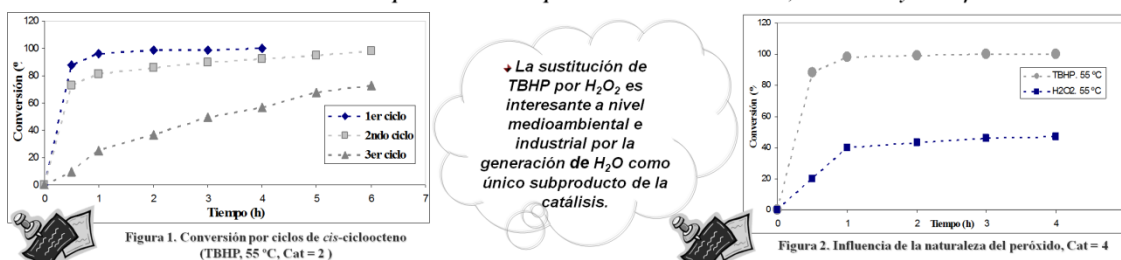
^cUniversité Abdelmalek El Essâdi, Faculté des Sciences, Laboratoire de Chimie Organique Appliquée, Tétouan, Marruecos



➤ Síntesis y caracterización de los compuestos del tipo [MoO₂Cl₂L₂] y [MoO₂LL'] [1,2]



➤ Estudio de la actividad catalítica de los compuestos 1-4 en la epoxidación de *cis*-cicloocteno, *R*-limoneno y *trans*- β -metilestireno [1,3]



➤ La sustitución de TBHP por H₂O₂ es interesante a nivel medioambiental e industrial por la generación de H₂O como único subproducto de la catálisis.

- ✓ La mejor producción se alcanza con *cis*-cicloocteno, disminuyendo en el sentido *cis*-cicloocteno, *R*-limoneno y *trans*- β -metilestireno.
- ✓ El derivado 2 continúa siendo estable durante 2 ciclos, disminuyendo la conversión en el tercer ciclo debido a la acumulación de [terc-butanol] como subproducto de reacción y compite con TBHP para coordinarse al centro metálico conduciendo a la disminución de la actividad del precatalizador.
- ✓ Los derivados 1-4 catalizan también la epoxidación de *cis*-cicloocteno a 55 °C en presencia de H₂O₂.
- ✓ El aumento de la temperatura afecta exclusivamente a la actividad de las especies 3-6.

➤ Referencias

- [1] Ghaita Chahboun, J. A. Brito, B. Royo, M. A. El Amrani, E. Gómez-Bengoa, M. E. G. Mosquera, T. Cuenca, *E. Royo*, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 2940–2949.
 [2] M. S. Ibn Elalami, A. Dahdouh, A. Ibn Mansour, M. A. El Amrani, I. Suisse, A. Mortreux, F. Agbossou, *Comptes Rendus Chimie*, **2009**, 12, 1253–1258.
 [3] A. Al-Ajlouni, A. A. Valente, C. D. Nunes, M. Pillinger, A. M. Santos, J. Zhao, C. C. Romão, I. S. Gonçalves, F. E. Kühn, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 1716–1723.

APLICACIONES DE LA VEHICULIZACIÓN DE PREDNISOLONA EN LIPOSOMAS EN ENFERMEDADES INFLAMATORIAS ARTICULARES

Cristina Lorente Guirado¹, José Luis Arias Mediano², Julia Rodríguez Ruiz¹, M^a José Martín Villena¹, Patricia Gálvez Martín¹, Beatriz Clares Naveros³.

¹Estudiante Doctorado. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Campus Universitario de Cartuja, s/n. Universidad de Granada. 18071 Granada.

² Profesor Titular de Universidad. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Campus Universitario de Cartuja, s/n. Universidad de Granada. 18071 Granada.

³ Profesor Contratado Doctor. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Campus Universitario de Cartuja, s/n. Universidad de Granada. 18071 Granada.

crislg@correo.ugr.es.

INTRODUCCIÓN

La prednisolona es el principal glucocorticoide utilizado en la terapia de las enfermedades inflamatorias articulares. Frecuentemente, es necesario el uso de altas dosis de este fármaco debido al rápido aclaramiento plasmático que sufre tras su administración, ya sea vía sistémica o intra-articular, lo que conlleva a la aparición de fenómenos tóxicos. El desarrollo de liposomas como sistemas transportadores del glucocorticoide prednisolona podría ser la herramienta que permita solventar estos problemas.

OBJETIVOS

Evaluación de las potenciales aplicaciones que ofrecen las nanoplataformas de tipo liposomal en el transporte de prednisolona.

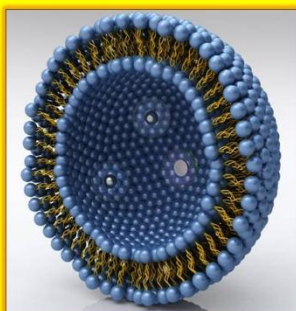


MATERIAL Y MÉTODOS

Extensa revisión y análisis bibliográfico basado en las principales bases de datos disponibles (PUBMED, HCAPLUS, THOMSON o REGISTRY).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

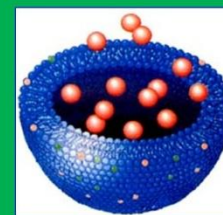
El empleo de liposomas como sistemas transportadores de prednisolona es importante por ser plataformas:



- ★ INERTES
- ★ BIOCOMPATIBLES
- ★ ATÓXICAS



Mejora de la eficacia farmacológica del tratamiento con prednisolona y disminución de la toxicidad asociada.




Hofkens, W; van den Hoven, JM; Pesman, GJ; Nabbe, KC; Sweep, FC; Storm, G; van den Berg, WB; van Lent, PL. *Int. J. Pharm.* **2010**, *416*, 493-498.
 Moreland, LW; O' Dell, JR. *Arthritis Rheum.*, **2002**, *46*, 2553-2563.
 van den Hoven, JM; Hofkens, W; Wauben, MHM; Wagenaar-Hilbers, JPA; Beijnen, JH; Nuijen, B; Metselaar, JM; Storm, G. *Int. J. Pharm.* **2011**, *416*, 471- 477.
 Clares, B; Medina, MM, Gallardo, V; Ruiz, MA. *J. Liposome Res.* **2009**, *19*, 197-206.
 Metselaar, JM, Storm, G. *Exp. Opin.* **2005**, *2*, 465-476.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto FIS 11/02571

(Instituto de Salud Carlos III, España) y PE-2012-FQM-694 (Junta de Andalucía, España).






DEVELOPMENT OF A SYSTEM FOR THE VAGINAL TREATMENT OF *Candida albicans*

María José Martín-Villena. Francisco Fernandez- Campos Ana Cristina Calpena -Campmany Adolfinia Ruiz Martinez Beatriz Clares-Naveros

1 Biopharmaceutical and Pharmacokinetics Unit, School of Pharmacy, University of Barcelona. Avda. Joan XXIII, 08028 Barcelona, Spain. 2 Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, School of Pharmacy, University of Granada, Campus Cartuja s/n 18071 Granada, Spain.



INTRODUCTION

Vulvovaginal Candidiasis




Figure 1. *Candida albicans*

➔

THE PROBLEM

The excessive use of azole has increased the fungi resistances

Up to 75% of all women suffer at least one episode of this infection during their lifetime. Most of this patients *respond to topical* treatment with imidazoles.

OBJETIVE

TO DEVELOP:

Microcapsules coated with chitosan

Characterize the particles

Nystatine (1)

could improve the effectiveness of the treatment due to their Antifungal and fungistatic activity

MATERIALS AND METHODS

Uncoated alginate and chitosan coated microparticles (CCM) were prepared by internal gelation method. Internal gelation involves the formation of a water in oil emulsion using a dissolution of sodium alginate mixed with calcium carbonate and a vegetable oil. Then an organic acid is added to the emulsion to release the calcium. Calcium will react with the alginate which will form the pregelified particles. Then calcium chloride is added to harden the particles (Figure 2).

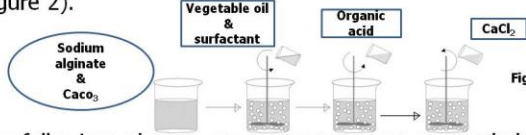


Figure 2. Internal gelation technology.

Coating method was the following: alginate microparticles were suspended in 100 mL of 0.5 % (W/V) chitosan, and stirred for 30 min. Finally, the resulting microparticles were washed by vacuum filtration and kept at 4°C.

RESULTS

Uncoated alginate and chitosan coated microparticles were successfully prepared by an emulsification/internal gelation method. Size of the systems increased with the incorporation of the drug, but not after storage periods. These microparticle systems showed spherical shape and slightly rough surface (Figure 3).

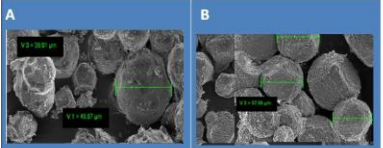


Figure 3. SEM micrographs of the alginate microparticles (A) and chitosan coated microparticles (B).
Optimal values of percentage yield (PY), loading capacity (LC) and encapsulation efficiency (EE) were obtained as show figure 5.

	AM	CCM
PY%	82.26 ± 3.9	87.38 ± 6.9
LC%	Surface 0.4 ± 0.1	0.91 ± 0.3
	Inside 6.78 ± 0.8	4.87 ± 2.6
EE%	Surface 12.07 ± 2.2	9.19 ± 0.3
	Inside 81.12 ± 3.9	85.08 ± 7.8

Figure 5. Percentage yield, loading capacity and encapsulation efficiency.

It has also been tested the ability of these systems, to adhere to the vaginal mucosa (Figure 4).

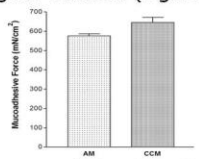


Figure 4. Mucoadhesive force for alginate microparticles (AM) and chitosan coated microparticles (CCM). Each bar represents the mean ± SD (n = 3).

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHY

ACKNOWLEDGEMENT

The data (LC, EE, PY, and adherence to the vagine) suggest that NYS loaded microparticles could have a clinical potential use in the treatment of vulvovaginal candidosis

1.Recamier, K. S. et al. (2010). J. Membr. Biol. 237, 31–40.

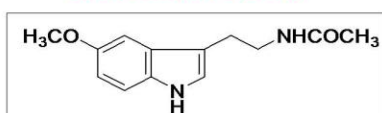
Financial support from project MAT2011-26994 is acknowledged.

NUEVA RUTA SINTÉTICA DEL PRINCIPAL METABOLITO CEREBRAL DE LA MELATONINA

M. Chayah, M. D. Carrión, M. E. Camacho, M. A. Gallo.
Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, Granada, España.

Introducción

La melatonina (aMT) ¹



N-acetil-5-metoxitriptamina

anticonvulsivante hipnótica antitumoral
antioxidante neuroprotectora ²

➔ Inhibición de la Oxido Nítrico Sintasa (NOS)



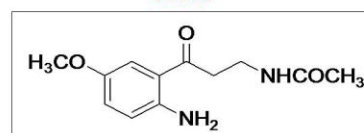
neuronal (nNOS)

inducible (iNOS)

endotelial (eNOS)

mitocondrial (mtNOS)

AMK ^{3,4}

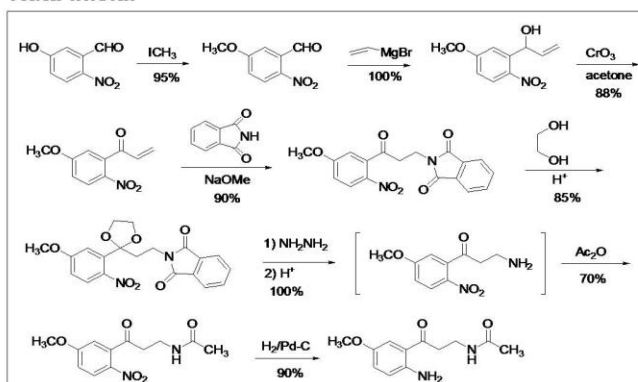


N-acetil-5-metoxikinurenamina

Química

Conclusiones

Ruta inicial ⁵



Rendimiento global = 42.4%

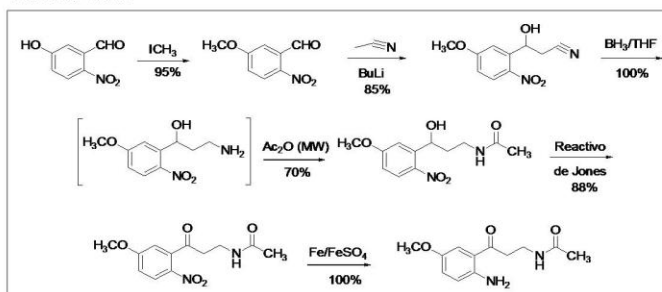
✓ Se ha conseguido poner a punto una nueva ruta sintética para el principal metabolito cerebral de la aMT.

✓ Es una ruta mas corta tanto en el número de reacciones como en el tiempo empleado para llevarla a cabo.

✓ Presenta un rendimiento global mejor.

✓ Esta nueva ruta nos facilitará la síntesis de nuevos análogos del AMK obtenidos mediante farmacomodulación como inhibidores de la NOS con propiedades neuroprotectoras.

Nueva ruta



Rendimiento global = 52.3%

Referencias

- 1) *Aging.*, 1995, 5, 340-351.
- 2) *J. Pineal Res.* 1996, 20, 205-210.
- 3) *Journal of Neurochemistry*, 2006, 98, 2023-2033.
- 4) *Journal of Neuroscience Research*, 2009, 87, 3002-3010.
- 5) *J. Med. Chem.*, 2005, 48, 8174-8181.



An open-source MATLAB code to support the learning process of acid-base titration concepts for university students

David González-Gómez¹, Florentina Cañada-Cañada², Jin Su Jeong³, Diego Airado Rodríguez⁴

¹Department of Science and Mathematics Education, Training Teaching School, University of Extremadura, Avd. de la Universidad s/n (Cáceres) dggomez@unex.es; ²Department of Science and Mathematics Education, Education School, University of Extremadura (Badajoz) lor@unex.es; ³Department of Graphic Expression, University Center of Mérida, University of Extremadura, Calle Santa Teresa de Jornet 38 (Mérida) jin@unex.es; ⁴Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Campus Fuentenueva s/n (Granada) airado@ugr.es

Introduction

The benefits of using new technology tools to promote student knowledge have been already proved. In fact, the current virtual courses using collaborative web tools such as aL, Moodle or WebCT are already used in most universities and educational institutions [1]. Beside these web tools, the implementation of user-friendly coding systems and interactive e-Learning or m-Learning applications allows instructors to develop ad-hoc pieces of software or applications to reinforce the concepts that students have already read in textbooks or taken lectures, especially in those subjects with sophisticated contents of mathematical calculations applied to chemical data [2,3].

The software has been designed by the means of pop-up windows where the final user only needs to know basic or elementary knowledge of MATLAB. The benefits of these e-learning methodologies include the means for creation of motivational environments enhancing significantly students' meaningful learning. Different references have been already published [4,5] indicating that students achieve better comprehension, retain the information longer and enjoy classes more effectively when e-learning methodologies are employed, empowering and enhancing their construction of a more cohesive understanding of the interconnected facets of a discipline.

Software

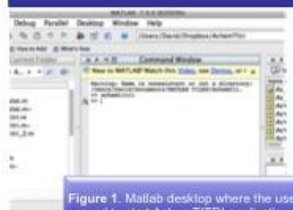


Figure 1. Matlab desktop where the user need to start AChemTITRI application



Figure 2. Main screen of AChemTITRI. Here user can select the type of titration and the values of different variables

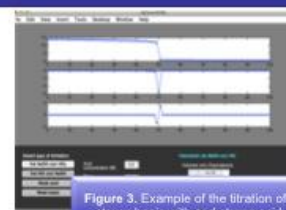


Figure 3. Example of the titration of a strong basis with and strong acid.

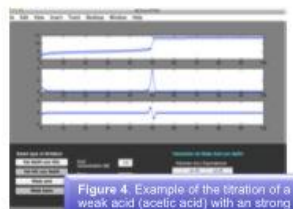


Figure 4. Example of the titration of a weak acid (acetic acid) with an strong basis.

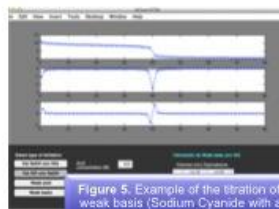


Figure 5. Example of the titration of a weak basis (Sodium Cyanide with an strong acid



Figure 6. QRC code where the AChemTITRI is freely available.

Conclusions

This educational research describes an ad-hoc MATLAB based-code toolbox, intended to show students how to determine the final point of a titration curve. Different type of acid and base have been included in the software code to allow the student to work with the major number of experimental cases. The proposed software, named AChemTITRI, is suitable for distance learning systems as well as traditional teaching methods. The versatility of the software allows the student to modify multiple parameters, such as acid/base concentration as well as solution volume, and therefore they will have the chance to practice different alternative to reinforce the proposed concepts. In addition, the software presents different graphical alternative to resolve the titration problem. This software is freely available through after request to authors or by the QRC code showed in this poster.

References

- [1] S. S. Mack, S. E. Ponder, R. Garcia Proceedings of the American Chemical Conference, Chicago, Illinois, 3444 (2010)
- [2] A. Espinosa Manilla, A. Muñoz de la Peña, D. González Gómez, The Chemical Educator 10 (2005) 331
- [3] A. Muñoz de la Peña, D. González-Gómez, D. Muñoz de la Peña, F. Gómez-Estern, M. Sánchez-Sequedo, M. Journal of Chemical Education 90 (2013) 306
- [4] L. M. Requena, E. Verba, M. F. Muñoz, M. Pérez, J. P. Castro, M. J. Verba, IEEE Transactions on education, 52, (2009) 279
- [5] D. J. Lubliner Enhancing Learning with resources, social networking and digital libraries, (2010) Chapter 6, pp 149-166, DePaul University Press, USA

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank the Gobierno de Extremadura (Spain) and European funding from FEDER (project GR10075).



GOBIERNO DE EXTREMADURA





KINETIC STUDY OF THE DEGRADATION OF ORGANIC POLLUTANTS IN TWO-PHASE OLIVE OIL MILL WASTEWATER BY PHOTOCATALYSIS WITH FERROMAGNETIC-CORE DIOXIDE TITANIUM NANOPARTICLES

J.M. Ochando-Pulido^{1*}, M.D. Victor-Ortega¹, G. Hodaifa², A. Martinez-Ferez¹

¹ Chemical Engineering Department, University of Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain, *jmochandop@ugr.es

² Molecular Biology and Biochemical Engineering Department, University Pablo de Olavide, 14013 Seville

Key words: Olive mill wastewater; Wastewater reclamation; Photocatalysis; Kinetics.

INTRODUCTION

The more efficient continuous centrifugation-based olive oil extraction processes brought as drawback a significant increment of the generated effluents, called olive mill wastewater (OMW).

Between 10-15 m³/day are generated in an olive oil mill, which means more than 9 million m³/year only in Spain. OMW cannot be efficiently treated by conventional and biological treatments, because the presence of some organic pollutants (phenolic contaminants, tannins and organic acids) make these effluents recalcitrant to biological degradation.

In this work, OMW was treated by means of photocatalysis with titanium dioxide (TiO₂) under UV irradiation.

A novel photocatalyst with ferromagnetic-core for ease of recovery and reuse was developed and characterized, and finally tested on OMW samples.

ANALYTICAL METHODS AND EXPERIMENTAL

1. Analytical methods

Chemical oxygen demand (COD), total suspended solids (Tss), total phenols (Tph), electrical conductivity (EC) and pH were measured following standard methods (Greenberg *et al.*, 1992).

Particle size distribution analysis of suspended and colloidal matter was performed with a Plus-90 nanosizer supplied by Brookhaven.

Overall morphology of the produced nanoparticles was observed with a transmission electron microscopy

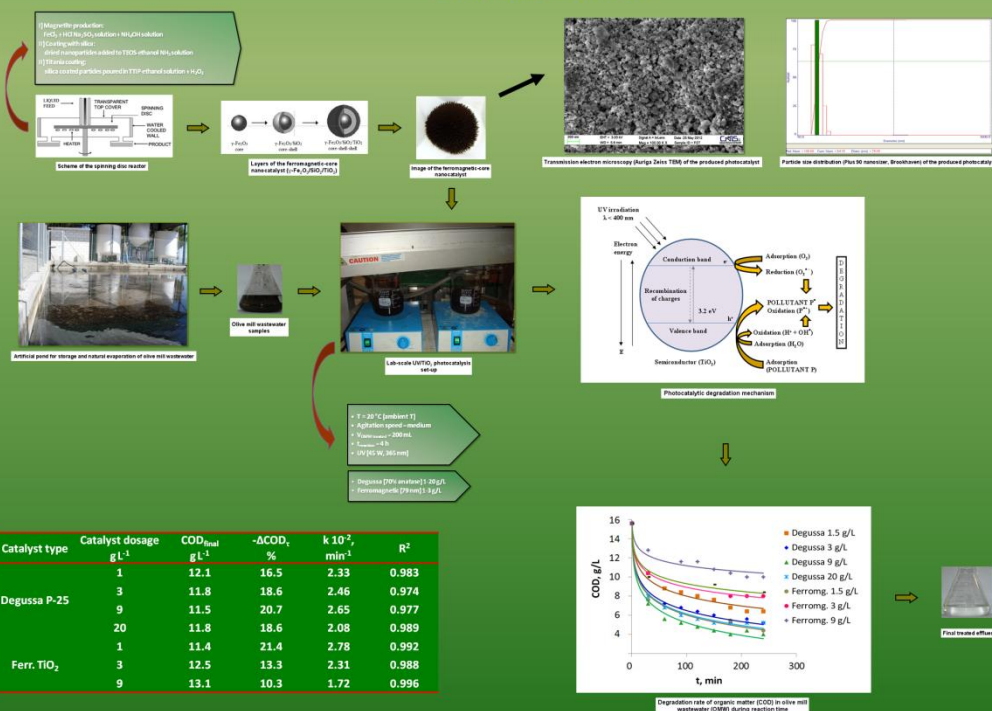
2. Experimental devices

- Spinning-disk reactor (lab-scale).
- Stirred Beakers under UV light lamp (45 W, 365 nm) at lab-scale.
- Transmission electron microscopy (TEM) from Auriga Zeiss.
- Dynamic light scattering device (DLS) from Brookhaven.

CONCLUSIONS

- ✓ Organic matter in OMW can be effectively removed by photocatalysis with TiO₂ under UV light
- ✓ Lab-made ferromagnetic-core TiO₂ yielded better results (COD removal up to 63.3%) than commercial photocatalysts (Degussa P-25) upon lower dosage (1.5 g/L) and 3 hours residence time
- ✓ Lab-made ferromagnetic-core TiO₂ mean size was 79 nm, pure (100% anatase with only traces of brookite) and uniform
- ✓ First-order kinetic model successfully applied
- ✓ Further research shall be done on the use of this nanocatalyst under sunlight illumination

RESULTS AND DISCUSSION



References:

- [1] T. Akar, I. Kaya, Z. Kayrak, E. Okara, O. Yeri, E. N. Sahin, S. T. Akar, J. Hazard. Mater. 166(2-3)(2009) 1217-1225.
- [2] B. De Caprari, M. Di Rita, M. Stales, N. Verdine, A. Chianese. Chem. Eng. Science, 76(2012) 73-80.
- [3] J.M. Ochando-Pulido, G. Hodaifa, M.D. Victor-Ortega, A. Martinez-Ferez. The Scientific World Journal. doi.org/10.1155/2013/196670.

Acknowledgements:

Spanish Ministry of Science and Innovation project CTQ2010-21411 and European projects PHOTOCHEM (contract no. FP7-SME-2011-gant262470) and ETOLE (contract no. FP7-SME-2007-1-gant222331).



IMPACT OF PERMEATE RECIRCULATION ON FOULING BUILD-UP DURING REVERSE OSMOSIS OF OLIVE MILL WASTEWATER BY A LOW-PRESSURE MEMBRANE

J.M. Ochando-Pulido¹, M.D. Victor-Ortega¹, G. Hodaifa², A. Martinez-Ferez²

¹ Chemical Engineering Department, University of Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain, *jmochandop@ugr.es

² Molecular Biology and Biochemical Engineering Department, University Pablo de Olavide, 14013 Seville

Key words: Olive mill wastewater, Fenton process, Permeate recirculation, Wastewater reclamation.

INTRODUCTION

Membranes are currently one of the most versatile and efficient technologies for environmental quality control. Nevertheless, it still remains very difficult to predict fouling phenomena over the membranes, up to today one of the main challenges of membrane technology (Field and Pearce, 2011), and proper pretreatment is key for this purpose.

OMW from a two-phase olive oil production process (OMW-2) was conducted through a final purification step by means of RO in lab-scale. A hydrophilic TFC polyamide/polysulfone membrane in flat configuration was chosen for the experiments. Previously, OMW was subjected to pretreatment comprising sequentially chemical oxidation based on Fenton's reagent, flocculation-sedimentation and filtration through olive stones (Martínez-Nieto *et al.*, 2010 and 2011).

Improvement driven by recirculating a fraction of the permeate stream (0 - 30 %) on membrane performance was studied in a diafiltration (semicontinuous) mode.

Results were analyzed with the osmotic-pressure resistances in series model.

The concentration polarization and fouling build-up was studied and the benefits of recirculating a fraction of the permeate stream back to the feed tank were investigated.

ANALYTICAL METHODS AND EXPERIMENTAL SET-UP

1. Analytical methods

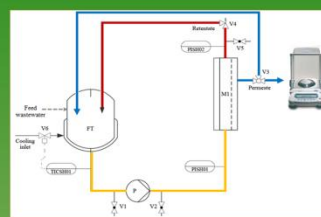
Chemical oxygen demand (COD), suspended solids (ss), ashes, total phenols, total iron, electrical conductivity (EC) and pH measurements were carried out in the raw OMW, inlet stream (pretreated OMW) and RO permeate according to standard methods (Greenberg *et al.*, 1992).

2. Bench-scale cross-flow filtration system

Semicontinuous operation mode consisted in recycling the concentrate stream back to the feedwater tank whereas collecting the permeate, so that the same amount was replaced into the feed tank with raw OMW and a percentage (10 - 30 %) of the permeate stream. Minimum recovery factor (Y) was set at 90%.

Operating in a diafiltration mode, instead of the batchwise common to most OMW deuration processes, attempted semicontinuous production and lower rate of increase of pollutants concentration. Upon recirculation of a fraction of the permeate stream above 10%, high and stable permeate flux was provided ensuring no significant steady-state flux decline.

Under these conditions, 100% suspended solids, phenols and iron removal was achieved, in addition to around 99.4% and 98.2% overall COD and conductivity rejection efficiencies respectively.



Bench-scale pressure-driven membranes unit.

RESULTS, MODELIZATION AND DISCUSSION

Table 1. CHARACTERISTICS OF TESTED RO MEMBRANE

Parameters	GE Water & Process Tech., SC
Nominal salt rejection, %	99.0
Permeability, L/hm ² bar	5.8 ± 0.3
Effective surface area, m ²	0.02
Configuration	Flat
Chemical composition	TFC polyamide/polysulfone
Module dimensions, cm	3.9 x 33.5 x 14.2
Active surface nature	Hydrophilic
Maximum supported TMP, bar	7.7
Maximum operating T, °C	50
pH range	4 - 11

Table 2. PRETREATED OMW/PERMEATE PARAMETERS

Parameters	OMW after pretreatment	Permeate
pH	7.9	7.4
Conductivity, µS/cm	3550	92.3
COD, mg/L	226.6	< 5
Susp. solids, mg/L	16	-
Total phenols, mg/L	1.1	-
Total iron, µg/L	400	-
Na ⁺ , mg/L	728.7	21.9
Cl ⁻ , mg/L	1045.1	20.9

References:

Cheryan, 1998. UF and MF Handbook, Technomic, Lancaster, PA.
Greenberg, A.E., Clesceri, L.S., Eaton, A.D., 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA/AWWA/WEF, 19th ed., Washington DC, Calif.
Field, R.W., Pearce, G.K., 2011. Adv. Colloid Interface Sci. 164, 38-44.
Martínez Nieto, L., Hodaifa, G., Rodríguez Vives, S., Gómez Casares, J.A., J. Ochando, Chem. Eng. Journal. 173 (2) (2011) 503-510.
Stoller, 2011. Effective fouling inhibition by critical flux based optimization methods on a NF membrane module for olive mill wastewater treatment. Chemical Engineering Journal 166, 1140-1148.

Acknowledgements:

Spanish Ministry of Science and Innovation is gratefully acknowledged for funding the project CTQ2010-21411: Depuration of wastewater from olive oil industry for its reutilization in the process

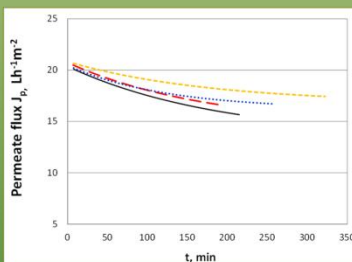


Fig. 1. Modelized influence of permeate recirculation ratio on permeate flux profile, 15 °C, 7 bar, 5.1 m/s (corresponding $N_{pe} = 2.6 \cdot 10^4$): - = no perm. recirculation (D_1); - = 10% perm. rec. (D_2); - = 20% (D_3); - = 30% (D_4).

$$R_f = \frac{\Delta P - \Delta \pi}{\mu \cdot J_{pt}} - R_m - R_{cp}$$

D_c	v_c	P_c	T_c	Perm. rec., %	μ_{feed} , Pa·s	N_{ka}	R_{cp} , m ⁻²	R_{cp}/R_m	R_f , m ⁻²	R_f/R_m	$\Delta(R_f/R_m)/\Delta t$, min ⁻²
D_1	5.09	7	15	no p.r.	$0.8 \cdot 10^{-3}$	$2.6 \cdot 10^4$	$1.13 \cdot 10^{14}$	0.41	$5.3 \cdot 10^{13}$	0.19	$5.6 \cdot 10^{-4}$
D_2	5.09	7	15	10	$0.8 \cdot 10^{-3}$	$2.6 \cdot 10^4$	$1.12 \cdot 10^{14}$	0.40	$4.6 \cdot 10^{13}$	0.16	$4.9 \cdot 10^{-4}$
D_3	5.09	7	15	20	$0.8 \cdot 10^{-3}$	$2.6 \cdot 10^4$	$1.11 \cdot 10^{14}$	0.39	$4.0 \cdot 10^{13}$	0.15	$4.4 \cdot 10^{-4}$
D_4	5.09	7	15	30	$0.8 \cdot 10^{-3}$	$2.6 \cdot 10^4$	$9.73 \cdot 10^{13}$	0.35	$3.4 \cdot 10^{13}$	0.12	$3.7 \cdot 10^{-4}$

Table 3. Influence of permeate recirculation ratio on concentration polarization (R_{cp}) and fouling (R_f) resistances, besides normalized values (R_{cp}/R_m and R_f/R_m) and rate of fouling resistance ($\Delta(R_f/R_m)/\Delta t$). D_c : diafiltration cycle.

CONCLUSIONS

- ✓ Higher and stable threshold flux (J_{th}) ensured upon recirculation of a fraction of the permeate stream.
- ✓ Results confirmed by the resistances-in-series model analysis: lower concentration polarization and lower fouling resistance build-up over the membrane.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ELISA PARA CUANTIFICAR LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ANTICUERPO MONOCLONAL INFlixIMAB

I. Suárez González¹, N. Navas Iglesias², A. Salmerón García³, J. Cabeza Barrera⁴, L. F. Capitán Vallvey⁴

1. Dto. Química Analítica. Ftad. de Ciencias, Universidad de Granada.
 2. Dto. Química Analítica e Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, Ftad. de Ciencias, Universidad de Granada.
 3. UGC Farmacia Granada e Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.
 4. UGC Farmacia Granada e Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, Hospital Universitario San Cecilio, Granada.
- e-mail: inmasg@correo.ugr.es. Corresponding author: Inmaculada Suárez González



INTRODUCCIÓN

Infliximab (Remicade®) es un Ab monoclonal quimérico que actúa mediante su unión al Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) bloqueando su efecto. Está indicado en el tratamiento de patologías como la artritis reumatoide y enfermedad de Crohn's entre otras. El coste del tratamiento con IFX es muy elevado y su estabilidad, según las indicaciones del fabricante, una vez abierto el vial, es de 24 horas.

PROPUESTA Y OBJETIVOS

Evaluación de la actividad biológica de IFX reconstituido a 10.0 mg/mL en NaCl 0.9 % mediante un estudio de estabilidad en el tiempo llevado a cabo durante 15 días. También se ha abordado un estudio de degradación del fármaco para comprobar la actividad remanente del mismo.

EXPERIMENTAL



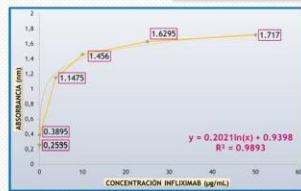
Ha sido desarrollado y validado un inmunoensayo tipo ELISA indirecto no competitivo basado en el uso de placas ELISA sensibilizadas con TNF- α para evaluar la actividad biológica de IFX reconstituido en condiciones de uso hospitalario.



RESULTADOS

Concentración IFX ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia 450nm/Ref. 620nm
50.00	1.6630
25.00	1.6295
10.00	1.4560
3.80	1.1475
0.10	0.3895
0.04	0.2535
0.02	0.2555

FUNCIÓN DE CALIBRADO



Absorbancia 450 nm/Ref. 620 nm	In (Conc)
3.9	1.717
3.2	1.629
2.3	1.456
1.3	1.147
-2.3	0.389
-3.2	0.253



VALIDACIÓN DEL INMUNOENSAYO

LOD	0.06 $\mu\text{g/ml}$
LOQ	0.2 $\mu\text{g/ml}$
DI	0.06-0.2 $\mu\text{g/ml}$
RSD (%)	0.027 %
EXACTITUD	% promedio recuperación 95 %
PRECISIÓN	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)
REPETIBILIDAD	8 %
5 $\mu\text{g/mL}$	7 %
2 $\mu\text{g/mL}$	

CONCLUSIONES

La pérdida de actividad biológica de soluciones de IFX a 10.0 mg/mL en NaCl 0.9% refrigeradas a 4°C y protegidas de la luz durante 15 días es de aproximadamente un 80 %.

Estudio de estabilidad

Realizado para muestras de IFX a 10.0 mg/mL en NaCl 0.9% y a 4°C protegidas de la luz, durante 15 días.

DÍA CONTROL	CONCENTRACIONES ESTUDIADAS ($\mu\text{g/mL}$)	PÉRDIDA DE ACTIVIDAD (%)
1-15	20	86.80
	15	81.84
	5	73.46

Además, también muestran actividad biológica las muestras de IFX sometidas a diferentes condiciones de estrés.

Estudio acelerado de degradación

Varias muestras de IFX a diferentes concentraciones fueron sometidas a condiciones de estrés para poner de manifiesto la actividad biológica remanente (Ver tabla abajo). Fueron analizadas sin diluir.

CONCENTRACIÓN	10 mg/mL	5 mg/mL	2 mg/mL	0.5 mg/mL	5 $\mu\text{g/mL}$
CONDICIONES DE ESTRÉS (24 h.)					
PROMEDIO (señal de absorbancia)					
NaOH 0.1 M	2.086	1.455	0.095	0.137	0.209
HCl 0.1 M	1.736	1.710	0.185	0.214	0.054
H ₂ O ₂ 1% (v/v)	0.980	1.309	0.395	0.202	0.087
H ₂ O ₂ 10% (v/v)	0.871	1.099	0.202	0.251	0.143
Tª 50°C	1.393	1.545	0.492	0.459	0.233
Tª 70°C			0.046	0.214	0.075
U.V Tª 50°C					
250 w/m	1.574	1.647	0.184	0.094	

AGRADECIMIENTOS

Estudio financiado íntegramente por el proyecto PI 101/00201 (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, España). Agradecemos a la Unidad de Farmacia Hospitalaria del Hospital Universitario San Cecilio de Granada la amable cesión de todas las muestras de IFX empleadas en el mismo.



Congreso Nacional Multidisciplinar de Jóvenes Investigadores



Realization of an inexpensive embedded Mini-Datalogger for measuring and controlling Photovoltaic System

H. NAIM*, A. HASSINI, F. Z. FALIL, N. BENABADJI, A. BOUADI
 Department of Physics, University of Science and Technology of Oran (USTO)
 (*).naim.houcine6@gmail.com



Abstract: This article describes the design and the realization of an automatic recording device for measurements and controls of multiple physical parameters, in order to manage and monitor a mini central photovoltaic electricity. It is based on an 8-bit microcontroller, a PIC16F716, which is the lowest cost in the mid-range portfolio from Microchip. The automatic recording device (or datalogger) measures the following parameters: the current sourced by a set of photovoltaic panels to solar batteries, the voltage across these batteries, the internal and the external temperatures, through a 4 channel multiplexed 8-bit ADC integrated module. This datalogger is clocked with a real time and calendar RTCC, which controls also the periodic measurements. These are stored in an external 8 kiloBytes flash EEPROM, a 24LC64, using the I²C protocol, which allows us to easily increase the storage capacity by adding, if necessary, in parallel, up to eight external flash EEPROM.

Keywords: Photovoltaic panel, electrical measurement, Microcontroller, Current charge.

I. INTRODUCTION

This device (is dedicated to the automatic measurement of four important parameters to be monitored in a PV system: the charging current into the storage energy pack (12V solar battery), the batteries voltage, the external temperature (of the PV panels) and the internal temperature (of this device).



Fig. 1 Overview of the prototype.

II. HARDWARE DESCRIPTION

The synoptic below shows the main modules of this design: an 8-bit microcontroller (PIC16F716), a display module with 4 digits 7-segment LED, a 3 buttons keypad, and the circuit for 4 channels measurements (internal temperature, external temperature, charge current, charge voltage) and finally the dual regulated power section.

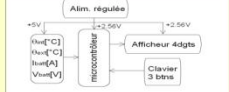


Fig. 2 Complete synoptic of the design.

III. THE 8-BIT MICROCONTROLLER (PIC16F716)

This is a microcontroller from the 8-bit mid-range portfolio of Microchip [1]. It is powered from 2.0V to 5.5V, but in this design, we choose the particular voltage of 2.56V. This choice was dictated by the requirements of the internal analog to digital converter (ADC) module with 8-bit resolution and for the resolution of the two LM35DZ temperature sensors.

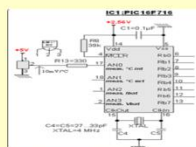


Fig. 3 The PIC16F716,

IV. THE 3 PUSHBUTTONS KEYPAD

The keypad consists of only three small pushbuttons: one to increment, one to decrement, and one to go to the next function.

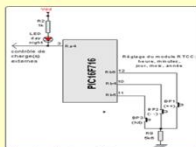


Fig. 4 The 3 pushbuttons Keypad

V. THE DISPLAY MODULE 4 DIGITS 7-SEGMENT LED

A classical display module of 4 digits 7-segment LED requires 12 I/O lines (input/output) from the PIC, as shown in the following schema:

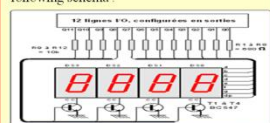


Fig. 5 A classical display module of 4 digits 7-segment LED

In our design, we preferred to use a particular method (figure 5), called Charlieplexing [2], in which a single digit is active at a time. This not only reduces the current consumption, but also reduces the number of I/O lines needed.

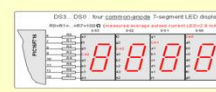
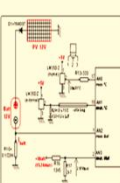


Fig. 6 The display module of 4 digit, with charlieplexing method

VI. CIRCUITERIE POUR 4VOIES DE MESURES

The 4 analog inputs of the PIC16F716 have been devoted to the measurement of the most important physical parameters in a PV system:

- The external temperature (of the PV panels) and the internal temperature (of the device prototype). The temperature sensor used is a LM35DZ [3] with a sensitivity of 10 mV/°C
- The charging current of the battery is done by measuring a voltage drop across a very low resistance (0.1 ohms) in series with the negative pole of the battery to recharge
- Finally, the batteries voltage is measured from a conventional voltage divider.



VII. DUAL VOLTAGE REGULATED POWER SUPPLY SECTION

The dual regulated power supply section includes: a 7805 integrated controller responsible for reduce the voltage of solar panels. The second type regulator LDO with low power circuit is responsible for providing a fixed output voltage of 2.56V required for the 8-bit internal ADC module.

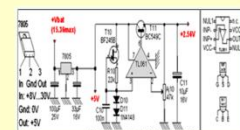
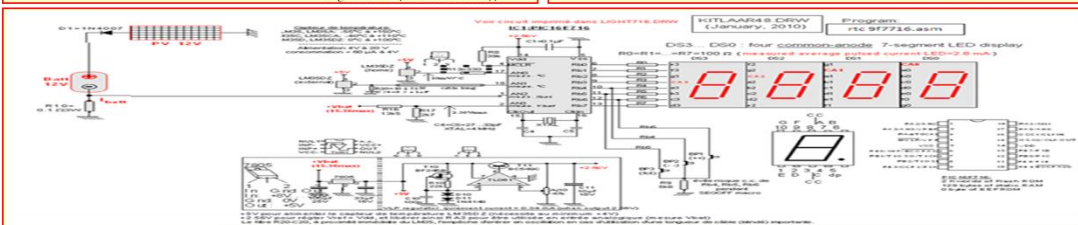


Fig. 8 The dual voltage regulated power supply section.



CONCLUSION

This study was made in two laboratories: LAAR and LAMOSI, in the department of Physics, USTO university. It is based on a very cheap and simple 8-bit microcontroller (PIC16F716). The objective of this design was to present a low cost prototype, which uses easily available components and a small footprint board, in order to monitor one of the most important electrical parameters in a PV system, such as current, voltage and temperature. In particular, we were interested in measuring the charging current of the storage energy accumulator (12V solar battery), the batteries voltage, the external temperature (of the PV panels) and the internal temperature (of the device). The microcontroller was programmed in assembler code, with MPLAB v7, on a PC/Windows XP platform.

I	U	N	LS	CS	TSV	TI	TE
0.29A	11.3V	158J	5143	20H15	1H52	25°C	27°C

REFERENCE

1. DS41206B, PIC16F716 datasheet: 8-bit flash-based microcontroller with A/D converter and enhanced capture/compare/pwm. MICROCHIP, 2007.
2. Charaf LAISSOUB, eight-digit counter works with common anode or common cathode. EDN, electronic design network, July 15, 2010.
3. Nonredine BENABADJI, PIC microcontroller and FETs enable a four-digit voltmeter. EDN, electronic design network, May 10, 2007.
4. MPLAB v7.52, integrated development environment assembler software. MICROCHIP, 2006.

IMMUNOGENETIC STUDY OF CERVICAL LYMPH NOD TUBERCULOSIS IN CHILDREN

H.ZAIDI^{1,2}, S.Elazbaoui², A.Sabri², S.OUARAINI^{1,3}, S.SIAH^{1,4}, N.Alaoui Mrani^{1,5}, J.EL BAGHDADI²

¹University Mohammed V Souissi, Faculty of Medicine and Pharmacy, Rabat, Morocco
²Genetics Unit, Military Hospital Mohamed V, Hay Riad, 10100 Rabat, Morocco
³Service ORL, Military Hospital Mohamed V, Hay Riad, 10100 Rabat, Morocco
⁴Service Surgical Reanimation, Military Hospital Mohamed V, Hay Riad, 10100 Rabat, Morocco
⁵Service Pediatric Surgery P2, CHU Ibn Sina, Rabat, Morocco



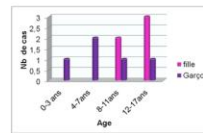
INTRODUCTION

Tuberculosis is a communicable infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* or (BK). Infection with this bacteria may be in form pulmonaire and extrapulmonaire. The lymph nodes are the most common form of extrapulmonary TB (up to 40% of extrapulmonary tuberculosis), The cervical form is 70 to 90% of cases. The diagnostic approach is based on clinical and biological; Histological examination of the cervical ganglion is essential for the diagnosis of disease. Medical treatment includes a quad-antibiotics for two months followed by two drugs for four months.

PATIENTS AND METHODS

1. Patients

Five Patients of ORL service of the Military Hospital Mohammed V in Rabat, and five patients of P2 service of children Hospital in Rabat, Subscriptions for one or more of cervical lymphadenopathy tuberculosis confirmed by data pathological.



3. Gene amplification by polymerization chain reaction technique (PCR):

The amplification reaction is carried by Thermocycleur *Veriti™* and *Eppendorf®*, and control on gel electrophoresis revealed by the apparatus *GelDoc XR* through software « *Quantity One* ».

4. Sequencing

Sequencing using the 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and study results according to the software: Sequencing Analysis v5.4 and v2.7 Seqscape.



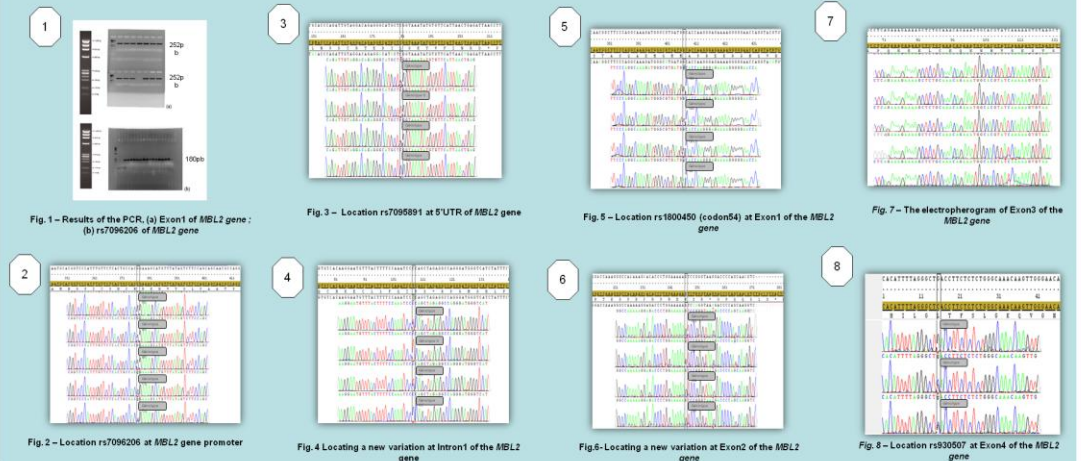
PURPOSE

The search for new mutations in the *MBL2* gene and research polymorphisms previously reported in the literature and that would probably have an impact on the production and function of MBL protein.

2. Extraction of genomic DNA

Extraction of genomic DNA from whole blood by the phenol chloroform method.

RESULTS



CONCLUSIONS

Through this work focused on ten patients with one or more of cervical lymphadenopathy tuberculosis, we demonstrated the presence of several polymorphisms in the *MBL2* gene selected as a candidate gene polymorphisms already described in the literature either new variation in the exon2. In view of these results, these polymorphisms have a crucial role in the innate immune response leading to susceptibility to lymph node tuberculosis.

Efectos del Bisfenol A en genes implicados en muerte y supervivencia celular en corteza prefrontal de rata adulta

Beatriz Castro, Pilar Sánchez, Jesús M. Torres y Esperanza Ortega

Dpto. Bioquímica y Biología Moleculara III e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada



Introducción

La mayoría de las personas en los países desarrollados están expuestas de manera casi continua al xenoestrógeno Bisfenol A (BPA). BPA es un producto químico utilizado para fabricar todo tipo de plásticos policarbonatos, latas de alimentos o bebidas, recibos de compras, CDs e, incluso, biberones.

Estudios con animales de experimentación muestran que el BPA es capaz de interferir en el desarrollo cerebral, la diferenciación sexual, las funciones cognitivas y el comportamiento.

El efecto del BPA sobre la apoptosis en el cerebro no está claro y podría ser responsable, al menos en parte, de estos efectos adversos.

Objetivos

Dado que la corteza prefrontal (CPF) está involucrada en el control de funciones ejecutivas y cognitivas, el objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos del BPA sobre genes relacionados con la apoptosis/proliferación celular en CPF de rata adulta.

Métodos

- **Sujetos experimentales:** Ratas Wistar macho y hembra adultas
- **Dosis y régimen de administración:** 50µg BPA /kg/día (US Environmental Protection Agency's, EPA), s.c., 4 días
- **Metodología:** PCR-Array (*The Rat Neurotoxicity RT² Profiler™ PCR Array*, SA Biosciences)

Genes estudiados relacionados con apoptosis/proliferación celular

Ab1	Cideb	No13	Tnfrsf25
Bag4	Dapk1	Prim2	Tp53
Bik	Fas	Sema3b	Traf2
Casp7	Faslg	Sod2	Traf4
Cdkn1a	Gch1	Tnfrsf10b	Xiap
Cidea	Lta	Tnfrsf11b	Ywhae

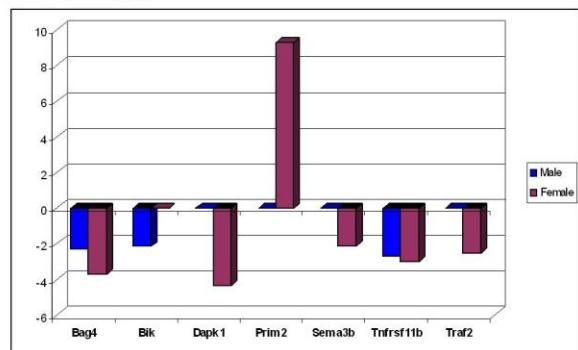
Resultados

■ **Ratas hembra:** la administración de BPA resultó en una disminución de los niveles de ARNm de los factores proapoptóticos y de inducción de muerte celular **Tnfrsf11b** y **Dapk1**, aunque los factores antiapoptóticos **Bag4** y **Traf2** fueron también disminuidos.

Adicionalmente, encontramos una disminución en los niveles de ARNm de **Sema3b**, un supresor tumoral que codifica para una proteína importante implicada en la guía axonal.

BPA incrementó los niveles de transcritos de **Prim2**, la subunidad 58-kDa de la DNA primasa, implicada en la replicación del ADN.

■ **Ratas macho:** BPA disminuyó los niveles de ARNm de factores proapoptóticos (**Bik**, **Tnfrsf11b**) y antiapoptóticos (**Bag4**).



Conclusiones

Nuestros resultados sugieren que, a la dosis estudiada, el BPA podría afectar los mecanismos de apoptosis principalmente en CPF de rata hembra. Este hecho podría contribuir a alterar la función fisiológica de esta área cerebral.



Semantic and Fuzzy Modelling of Human Behaviour in Smart Spaces. A case study on Ambient Assisted Living and Remote Rehabilitation

Natalia Díaz Rodríguez, Manuel Pegalajar Cuéllar, Johan Lilius, Miguel Delgado.

ndiaz@abo.fi

- **Problem:** Lack of semantic models for machine situation understanding.
- **Proposal:** Human activity recognition (HAR) in ubiquitous spaces with automatic reasoning for Ambient Assisted Living.
 - Reactive event system with semantic knowledge representation and inferring of behaviours in Smart Spaces.
 - Reasoning with uncertain, vague or incomplete information.
 - End-user visual language to represent behaviours and IF/THEN rules.
- **Methodology:** Semantic formal models (ontologies) to deal with context-awareness.

Fuzzy logic. End-user rule-based visual language for rapid application development.

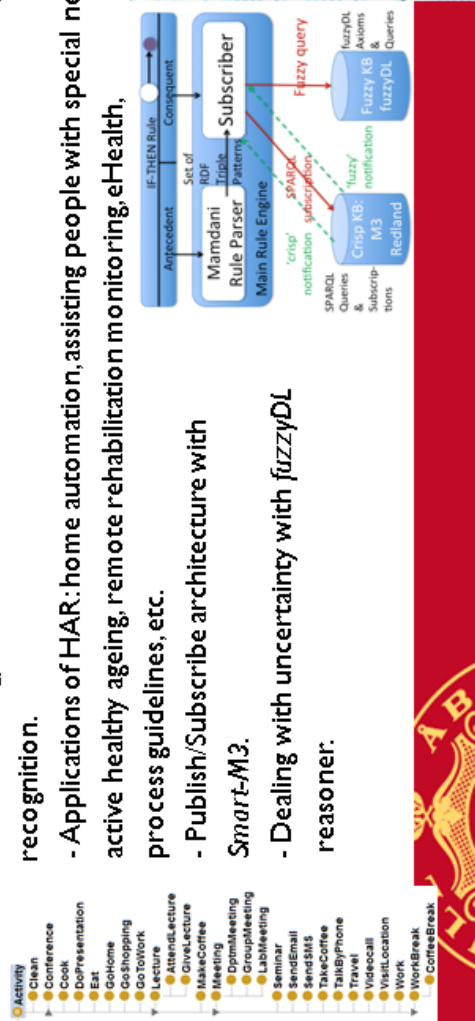
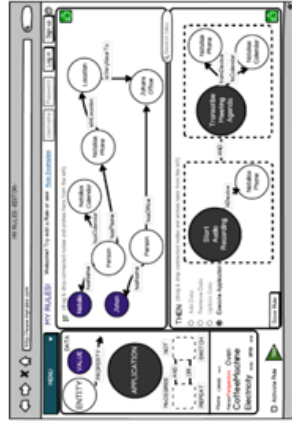
■ **Results:** An ontology model-based architecture for incremental action, activity and behavior

recognition.

- Applications of HAR: home automation, assisting people with special needs, active healthy ageing, remote rehabilitation monitoring, eHealth, process guidelines, etc.

- Publish/Subscribe architecture with Smart-M3.

- Dealing with uncertainty with fuzzyDL reasoner.



- Activity
- Clean
- Conference
- DoPresentation
- Exit
- GoHome
- GoShopping
- GoToWork
- Lecture
- AttendLecture
- GiveLecture
- MakeCoffee
- Meeting
- DimMeeting
- GroupMeeting
- LabMeeting
- Seminar
- SendEmail
- SendSMS
- TakeCoffee
- TalkByPhone
- Travel
- Videocall
- VisitLocation
- Work
- WorkBreak
- CenterBreak



Asociación de Investigadores Extranjeros

New approach: Exploitation of non-conventional water in irrigation

BOUALLA Nabila¹, Department Civil Engineering, Laboratory Materials, Soil and Thermal, Oran, 31000. Vice President of Association of Researchers Algerians email address for corresponding author: nibrasnabila@yahoo.fr, assochercheurs@gmail.com.
 BENZIANE Ahmed², Department Civil Engineering, Laboratory Materials, Soil and Thermal, Oran, 31000 email address for corresponding author: benziane@yahoo.fr.
 MOUSSA Kacem³, Department Earth Sciences, Laboratory Geodynamics basins and sediment budget, Oran, 31000. moussakacem@yahoo.fr, moussakacem@yahoo.fr.
 OUDI Brahim⁴, Department Civil Engineering, Laboratory Materials, Soil and Thermal, Oran, 31000 email address for corresponding author: assochercheurs@gmail.com.



University of Science and Technology of Oran

ABSTRACT

Among the most common problems and currently rocking the world, quoting the reuse of raw wastewater, particularly in agriculture, which consumes more than 80% of water resources exploited. The use in agriculture seems the solution to compensate for the need for irrigation because of the growing scarcity of water. The reuse of untreated wastewater in irrigation for plants provides a source of nutrients that can reduce the purchase of fertilizers and organic materials. But it poses serious risks to health such as untreated sewage is a factor of transmitting pathogens and hazardous chemicals in the human body. The main constraints are then posed about the health risks, adapting the proposed use and the psychological and cultural barriers attached to the water deemed to be dangerous. The main objective of this work is to characterize the urban wastewater of Oran and recommend an appropriate treatment for their future use and reducing their harmfulness to the workplace receptors. Theoretically in 1995 the 40 km³ year of water used for drinking water 70% of these waters is 28 km³/year could be recovered by Wastewater and we can consider that in 2020 this volume in wastewater will be 46 million m³. In addition septic systems represent 35% of the entire watershed. Unfortunately uncontrolled industrial activities have created serious pollution of many natural water resources significantly degrade the quality thereof. The physicochemical characterization of wastewater has the support of different treatment plants studied in the watershed revealed that the liquid waste loads are very organic matter in terms of DBO₅ with average of 146 mg O₂ / l, DCO averaged 300.25 mg O₂ / l pH 7.1, ammonium an average of 23.33 mg / l phosphate an average of 9.86 mg / l a nitrate average of 3.10 mg / l suspended solids averaging 111.06 g / l. We will attempt a principal component analysis (ACP) performed on three individuals (3 sewage plants) and 7 physical and chemical variables (pH, MES, NH₄⁺, PO₄²⁻, NO₃⁻, COD et BOD₅). The factorial plane F1, axis of pollution, represents 86.51% of the variance. A second axis F2 explains just 13.49%.

INTRODUCTION

Considering that the bulk of the world's water resources is used in agriculture and that demand for food requirements is increasing rapidly, the role of water resources management, through efficient irrigation systems and techniques, has recently assumed greater importance in increasing food production in order to achieve global food security. The efficient use of water resources in agriculture through improving irrigation systems and techniques is, therefore, one of the most urgent needs and prerequisites for sustainable food production, particularly in water-scarce regions. Water is a scarce resource in arid and semi-arid areas where most of those countries face severe pressures due to limited opportunities for the exploitation of new water resources. These pressures are expected to increase in the face of expanding populations and the increased per capita water use associated with economic development. In addition, with the recognition that climate change is a significant factor in water resource planning, there is a consensus that most of the arid and semiarid regions of the world can expect an increase in water stress. Oran is now among the poorest wilayas in terms of water potential. Its water resources are limited, vulnerable and unevenly distributed in space and time. Moreover, they have suffered of the drought, pollution and mismanagement.

MATERIALS AND METHODS

Sampling Stations



Figure 1. Localization of the Wastewater treatment plant.

Geographic context

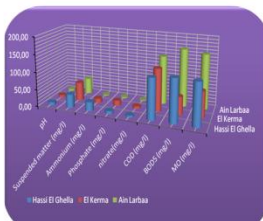


Figure 2. Demarcation of the zone of study.

Experimental protocol

Water samples were collected from three sampling stations (Hassi El Ghella, El Kerma et Ain Larbaa) in march 2012; the experimental work was based on the physico-chemical analyses of the polluting parameters carried out at the level of the laboratory LMST (Laboratory Materials Grounds Thermal USTO). These analyses were carried out on removed samples downstream of every Wastewater treatment plant functional established around the sebkha of Oran. The only measured parameter in situ is: pH-meter HANNA instrument HI 9811 as used for pH. To the laboratory, the treatment and the analysis have for object measures it: *suspended matter* (SM), additional parameters (NO₃⁻), (NH₄⁺) and (PO₄²⁻) by Spectrometry (Spectrometer Optizen 2120 UV), the chemical oxygen demand (COD) (Photometer WTW – Photolab S6), and the biochemical oxygen demand for five days (BOD₅) (DOB-meter WTW T 606-2/ IS 602). In our investigation the analytical results were compared with Algerian and European Norms.

RESULTS AND DISCUSSIONS



a lagoon treatment plant : Ain El Arbaa, Hassi El Ghella, Wastewater treatment plant to activated mud : El Kerma
 Figure 3. Variation spatio-temporelle of the polluting parameters of the effluents

Correlation	pH	MES	NH ₄ ⁺	PO ₄ ²⁻	NO ₃ ⁻	DCO	DBO ₅
pH	1,000	-,171	,914	,739	,893	-,998	-,666
MES	-,171	1,000	-,556	,538	,290	,234	-,621
NH ₄ ⁺	,914	-,556	1,000	,401	,634	-,938	-,305
PO ₄ ²⁻	,739	,538	,401	1,000	,963	-,693	-,995
NO ₃ ⁻	,893	,290	,634	,963	1,000	-,862	-,930
DCO	-,998	,234	-,938	-,693	-,862	1,000	,616
DBO ₅	-,666	-,621	-,305	-,995	-,930	,616	1,000

Table 1. Correlation between chemical elements.

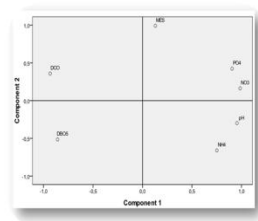


Figure 4. Projection of physico elements in the plan factorial (F1x F2).

CONCLUSION

The objective of this study is to highlight the reuse of the wastewater and to evaluate their aptitude to the agricultural irrigation. This study constitutes the first exhaustive description, but the limited number of sampling sites hardly constitutes an "exhaustive description", at best, it represents a preliminary study indicating that the waste waters contain relatively high concentrations of *suspended matter*, BOD₅, ammonium, and phosphates to, which can be harmful to water, to the ground and to aquatic life of the environment receiver. The findings of the analysis will prove to be quite informative. The usage of this new resource of water puts technical problems, sanitary problems and organizational. These problems must be treated with precaution, notably the aspects relating to the control of the quality of water treated. To the current state, the quality of waters does not reply, therefore, to the recommendations of the FAO of the WHO of waters used for irrigation.

ⁱ A.M. Bermejo, B. López de Abajo, C. Pereiro, M.J. Tabernero, « Investigación toxicológica en drogodependencias ». Colección de Drogodependencias, Vol. 14, Plan Autonómico sobre drogodependencias, Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia.

ⁱⁱ M. Wada, K. Nakashima, « Hair analysis : an excellent tool for confirmation of drug abuse », *Anal. Bioanal. Chem.* 2006; 385:413

ⁱⁱⁱ M.J. Tabernero Duque, A.M. Bermejo Barrera, *Boletín Galego de Medicina Lega e Forense*, nº 16 (2009)

^{iv} M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *J. Chromatogr. A* 2006; 1116:1-9

^v Strasburg, G. M.; Ludescher, R. D. *Trends in Food Science and Technology*. 1995:6, 69-75.

^{vi} Guilbault, G. G. In *Practical Fluorescence*; Guilbault, G.G. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., N.Y. 1990

^{vii} Parker, C.A. Apparatus and experimental methods. In: Parker, C.A. (Ed.), *Photoluminescence of Solutions with Applications to Photochemistry and Analytical Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1968; pp. 128–302

^{viii} Martens, H.; Naes, T. *Multivariate Calibration*; Wiley: Chichester, U.K., 1989

^{ix} Ley 1/1997 para la Reforma Política y Real Decreto-Ley 20/1977 sobre normas electorales.

^x Ley Orgánica 5/1985, de Régimen Electoral General.

^{xi} Frutos Balibrea, L. y García Escribano J.J. (1999), "Mujeres, hombres y participación política. Buscando las diferencias", *Revista Española de Investigaciones Sociológicas (REIS)*, N.º. 86, pp. 307-329.

^{xii} Ley Orgánica 3/2007, para la igualdad efectiva de mujeres y hombres.

^{xiii} Maravall, J.M. (1981), *La política de la Transición, 1975-1980*. Madrid. Taurus. Pp. 88-89.

^{xiv} Frutos Balibrea, L. y García Escribano, J.J. (1998), "La presencia de la mujer en la vida política de la Región de Murcia", en Frutos Balibrea, L. y Maurandi Guirado, R. (eds.), *Mujer e investigación. Encuentros de primavera del CEUMU*. Murcia. CEUMU, pp. 280.

^{xv} Unión de Centro Democrático.

^{xvi} Centro Democrático y Social.

^{xvii} Partido Demócrata Español.

^{xviii} Unión Progreso y Democracia.

^{xix} Baras M., Barberà O., Barrio A. y Rodríguez J. (2010), *Partidos de ámbito no estatal y gobernabilidad multinivel: el caso de España (1977-2008)*. Working Paper N.º 291. ICPS.

^{xx} Partido Regionalista Murciano.

^{xxi} BORM de 12 de mayo de 1987, 30 de abril de 1991, 2 de mayo de 1995, 18 de mayo de 1999, 29 de abril de 2003, 1 de mayo de 2007 y 26 de abril de 2011.

^{xxii} Clavero Mira E. y García Escribano J.J. (2011), "Las elecciones municipales en la Región de Murcia", en García Escribano J.J. (ed.), *Elecciones en la Región de Murcia*. Murcia. Editum.

^{xxiii} BORM de 20 de julio de 1987, 20 de julio de 1991, 21 de julio de 1995, 27 de julio de 1999, 3 de julio de 2007, 7 de julio de 2007 y 15, 25, 27 y 29 de julio de 2011.

^{xxiv} García Escribano, J.J. (dir.), (2000), *Atlas electoral de la Región de Murcia*. Murcia. Editum.

^{xxv} Frutos Balibrea, L. y García Escribano, J.J. (1998), "La presencia de la mujer en la vida política de la Región de Murcia", en Frutos Balibrea, L. y Maurandi Guirado, R. (eds.), *Mujer e investigación. Encuentros de primavera del CEUMU*. Murcia. CEUMU, pp. 289-290.

^{xxvi} Astelarra, J. (comp.) (1990), *Participación política de las mujeres*. Madrid. CIS, p.17.

^{xxvii} Frutos Balibrea, L. y García Escribano, J.J. (1998), "La presencia de la mujer en la vida política de la Región de Murcia", en Frutos Balibrea, L. y Maurandi Guirado, R. (eds.), *Mujer e investigación. Encuentros de primavera del CEUMU*. Murcia. CEUMU, p. 291.

^{xxviii} Tasa V. y Uribe A. (2013), *Consecuencias de la Ley Orgánica 3/2007 de igualdad entre mujeres y hombres sobre la representación parlamentaria en España*. Ponencia presentada al XI Congreso de la Asociación Española de Ciencia Política. Sevilla.