

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA



TESIS DOCTORAL

**“ESTUDIO DE PARTÍCULAS COLOIDALES CONSTITUIDAS POR
NÚCLEO MAGNÉTICO Y RECUBRIMIENTO POLIMÉRICO
BIODEGRADABLE COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN
MODIFICADA DE ANTINEOPLÁSICOS”**

Fernando Linares Molinero
Granada, 2007

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Fernando Linares Moliner
D.L.: Gr. 2710 - 2006
ISBN: 978-84-338-4208-4

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

CERTIFICAN:

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

**ESTUDIO DE PARTÍCULAS COLOIDALES CONSTITUIDAS POR NÚCLEO
MAGNÉTICO Y RECUBRIMIENTO POLIMÉRICO BIODEGRADABLE COMO
SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA DE ANTINEOPLÁSICOS**

ha sido realizado en los Departamentos de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y de Física Aplicada de la Universidad de Granada, bajo nuestra dirección, por el Licenciado D. Fernando Linares Molinero, y constituye su Tesis Doctoral.

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

Granada, 11 de Diciembre de 2006.

Fdo. Visitación Gallardo Lara.

Fdo. José Luis Arias Mediano.

Fdo.: Ángel V. Delgado Mora.

El doctorando,

Fernando Linares Molinero

A mis padres, Encarnación y Fernando
A mi hermana, Isabel
A mi abuela, Herminia

A María del Mar

*“Es grave mal para el cuerpo,
y frecuentemente para el alma,
hacer del día noche,
y contra toda razón natural,
convertir la noche en día”*

Séneca

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Visitación Gallardo Lara, Profesora Titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, la dedicada dirección de esta Tesis Doctoral así como su cariño y cercanía.

Del mismo modo deseo mostrar mi más sincera gratitud al Catedrático Ángel Delgado Mora por su generosa implicación en la realización del presente trabajo y por su cálida acogida en el Departamento de Física Aplicada de la Facultad de Ciencias.

Quisiera hacer mención especial a mi amigo y compañero, ahora “jefe”, el Dr. José Luis Arias Mediano, Profesor Ayudante del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, porque a él debo el impulso para adentrarme en el mundo de la investigación, así como la magistral guía que ha hecho posible este trabajo.

También quisiera agradecer a los Directores de los grupos de investigación “Farmacia Práctica”, Profesora M^a. Adólfina Ruiz Martínez, y “Física de Interfases y Sistemas Coloidales”, Profesor Fernando González Caballero, su inestimable colaboración para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Doy las gracias a mis compañeros de investigación, tanto de la Facultad de Farmacia (Margarita, Amparo, Gema, Cristina, Susana y Eva), como de la

Facultad de Ciencias (Cecilia, Julián, Modesto, Manuel, Silvia y Guillermo), por su paciencia y compañerismo en mis inicios como investigador y por la grata compañía que ha hecho más llevaderas las largas horas en el laboratorio.

No quisiera olvidarme en este capítulo de agradecimientos, de don José Manuel Santamaría López, Farmacéutico Comunitario, ni de mis compañeros de la Farmacia Santamaría, sin cuya complicidad hubiera resultado mucho más complicada la realización de esta Tesis Doctoral.

Por último, quiero agradecer a la Dra. María del Mar Ramos Tejada, su especial vinculación, en la cercanía y en la distancia, tanto a éste trabajo de investigación como a este investigador en particular.

◇ ◇ ◇ ◇ ◇ ◇ ◇

La financiación que ha hecho posible este trabajo procede del CICYT (España), bajo el proyecto MAT 2005 - 07746 - CO2 - 01, y de los fondos FEDER.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1. SISTEMAS DE DE LIBERACIÓN MODIFICADA DE FÁRMACOS	3
1.1.1. Vectorización de fármacos	3
1.1.2. Sistemas de transporte coloidales	5
1.1.2.1. Características	8
1.1.2.2. Mecanismo de acción del fármaco liberado	9
1.1.2.3. Tipos	9
1.1.2.4. Materiales constituyentes	11
1.1.2.5. Experiencia previa	11
1.1.2.6. Mecanismo físico de la vectorización .	13
1.1.2.7. Distribución en el organismo	14
1.2. ANTINEOPLÁSICOS	16
1.2.1. Cáncer y antineoplásicos	16
1.2.2. 5-Fluorouracilo y ftorafur	18
1.2.2.1. Mecanismo de acción	21
1.2.2.2. Relación estructura-actividad	25
2.- OBJETIVOS	27
2.1. OBJETIVOS	29
2.2. CONTRIBUCIÓN DEL TRABAJO PROPUESTO	32
2.3. PLAN DE TRABAJO	34
3.- SÍNTESIS Y ESTUDIO DE UN SISTEMA TRANSPORTADOR DE FÁRMACO	37
3.1. SÍNTESIS DE UN SISTEMA TRANSPORTADOR DE FÁRMACOS	39
3.1.1. Hierro carbonilo	39

3.1.2.	Microesferas de polibutilcianoacrilato (PBCA) .	40
3.1.3.	Partículas compuestas de hierro carbonilo y polibutilcianoacrilato	44
3.2.	CARACTERIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS COLOIDALES SINTETIZADAS	45
3.2.1.	Forma y tamaño	45
3.2.1.1.	Metodología experimental	45
3.2.1.2.	Resultados y discusión	45
3.2.2.	Superficie específica	50
3.2.2.1.	Fundamentos teóricos	51
3.2.2.2.	Metodología experimental	53
3.2.2.3.	Resultados y discusión	55
3.2.3.	Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier	55
3.2.3.1.	Fundamentos teóricos	55
3.2.3.2.	Metodología experimental	56
3.2.3.3.	Interpretación del espectro	57
3.2.3.4.	Resultados y discusión	58
3.2.4.	Resonancia magnética nuclear	60
3.2.4.1.	Fundamentos teóricos	60
3.2.4.2.	Metodología experimental	61
3.2.4.3.	Interpretación del espectro	63
3.2.4.4.	Resultados y discusión	64
3.3.	EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES MAGNÉTICAS	67
3.3.1.	Fundamentos teóricos	67
3.3.2.	Metodología experimental	69
3.3.3.	Resultados y discusión	73
3.4.	EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ELÉCTRICAS SUPERFICIALES POTENCIAL ZETA	75
3.4.1.	Generalidades	75
3.4.2.	Descripción clásica de la doble capa eléctrica	76
3.4.3.	Fenómenos electrocinéticos. Potencial zeta	83
3.4.3.1.	Electroforesis: teoría elemental	84

3.4.3.2. Electroforesis: tratamientos más elaborados	91
3.4.4. Metodología experimental	93
3.4.5. Resultados y discusión	93
3.5. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES TERMODINÁMICAS SUPERFICIALES	97
3.5.1. Generalidades	97
3.5.2. Interacciones superficiales	98
3.5.2.1. Interacciones dispersivas	98
3.5.2.2. Interacciones no-DLVO	101
3.5.2.3. Contribuciones de la energía libre superficial. Teoría de van Oss, Good y colaboradores	103
3.5.3. Metodología experimental	108
3.5.4. Resultados y discusión	112
3.5.4.1. Componentes de la energía libre Superficial	112
3.5.4.2. Análisis de la naturaleza hidrófila - Hidrófoba	114
3.6. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE FORMACIÓN DEL RECUBRIMIENTO POLIMÉRICO EN LAS PARTÍCULAS COMPUESTAS .	117

4.- CAPACIDAD DE TRANSPORTE Y LIBERACIÓN DE ANTINOPLÁSTICOS 119

4.1. INTRODUCCIÓN	121
4.2. DETERMINACIÓN ESPECTRAL DE LA ABSORCIÓN	124
4.2.1. Fundamentos teóricos	124
4.2.2. Absorbancia óptica de las disoluciones de 5-fluorouracilo y de ftorafur	126
4.2.3. Validación del método espectrofotométrico	123
4.2.4. Metodología de determinación de la incorporación de fármaco	141
4.3. INCORPORACIÓN DE LOS ANTINEOPLÁSTICOS EN LAS PARTÍCULAS RECUBIERTAS	144
4.3.1. Adsorción de 5-fluorouracilo y ftorafur	144
4.3.1.1. Análisis electrocinético de la adsorción	144

4.3.1.2. Determinación espectrofotométrica de La adsorción	147
4.3.2. Absorción de 5-fluorouracilo y ftorafur	150
4.3.2.1. Efecto de la concentración de butilcianoacrilato	151
4.3.2.2. Efecto de la concentración de dextrano-70	153
4.3.2.3. Efecto de la concentración de ácido clorhídrico	155
4.3.2.4. Efecto de la concentración de antineoplásico	158
4.4. LIBERACIÓN DE LOS ANTINEOPLÁSICOS DESDE LAS PARTÍCULAS RECUBIERTAS	161
4.4.1. Efecto del pH del medio de liberación y de la cantidad de fármaco vehiculizado sobre la cinética de liberación	162
5.- CONCLUSIONES	171
6.- BIBLIOGRAFÍA	179

1

INTRODUCCIÓN

1.1. SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA DE FÁRMACO.

La utilización de sistemas de liberación modificada de fármacos presenta en la actualidad una gran importancia, principalmente en el campo de la terapia contra el cáncer. Entre los distintos tipos de estos sistemas transportadores destacan, por sus posibilidades, los transportadores magnéticos coloidales.

Los principales beneficios de estos sistemas dentro del campo terapéutico son la eliminación de reacciones adversas que frecuentemente derivan de la distribución sistémica de los fármacos mediante la posibilidad de reducir la dosis precisa de un agente terapéutico por peso corporal, disminuyendo así, estos posibles efectos adversos provenientes de las dosis tradicionales. Además, se solucionan los problemas de inestabilidad en los fluidos biológicos o *in vivo* del fármaco.

1.1.1. Vectorización de fármacos.

La acción farmacológica de un principio activo depende principalmente de la naturaleza de la interacción entre éste y su lugar de acción. Sin embargo, para poder ejercer dicha acción, el fármaco debe estar presente en su tejido diana en cantidad suficiente como para provocar el efecto deseado. Por ello, es fundamental que sea liberado en el lugar adecuado del organismo a una velocidad apropiada, lo que puede controlarse mediante la forma en que el principio activo es formulado antes de su administración como medicamento.

La mayor parte de los fármacos son administrados por medio de formas farmacéuticas de dosificación convencionales (cápsulas, comprimidos, soluciones inyectables, etc.), no obstante, determinados tipos de fármacos

necesitan otras formas adecuadas a sus características. La necesidad de mantener una concentración de fármaco que garantice y mantenga un efecto terapéutico, implica la administración crónica de estas formas farmacéuticas de dosificación convencionales. Esta pauta de tratamiento puede constituir un inconveniente para el paciente y suele provocar un bajo índice de cumplimiento terapéutico. Por otro lado, la administración crónica puede provocar considerables fluctuaciones en las concentraciones sanguíneas de fármaco entre dosis, pudiendo originar efectos adversos tóxicos o una respuesta inapropiada cuando los niveles se encuentran en un máximo o en un mínimo, respectivamente. Una forma de resolver estos problemas es el desarrollo de sistemas de liberación modificada de fármacos que garanticen una velocidad de liberación constante (o prácticamente constante) durante un período de tiempo prolongado.

Por otro lado, no sólo se produce la difusión del fármaco dentro del tejido de interés, sino que una proporción importante pasa a la circulación sistémica actuando en regiones diferentes a las deseadas y aumentando así la probabilidad de aparición de reacciones adversas. Además, la concentración de fármaco en el lugar de acción será baja, debido a una distribución inapropiada o a una pobre absorción. Por ello, es preferible la concentración del fármaco en el tejido o células de interés antes que su libre distribución por el sistema circulatorio.

Un ejemplo de la importancia de lograr la localización de la acción de un principio activo es el tratamiento de tumores sólidos. Entre las diferentes formas de tratamiento, la farmacoterapia intenta explotar las diferencias existentes entre las células sanas y las cancerosas, además de permitir la selectividad tóxica frente a tumores. Sin embargo, debido a la similitud intrínseca entre estas células, a menudo es sólo posible explotar la rápida velocidad de división de estas células tumorales, si bien se comienza a investigar sobre las diferencias en cuanto a extravasación entre estos tejidos (1). Por otro lado un problema importante de los tumores sólidos es que el fármaco debe estar presente en una concentración suficientemente alta como para penetrar en el tumor. Por lo tanto, el desarrollo de sistemas que

maximicen la concentración de fármaco en las cercanías del tumor constituye una alternativa prometedora para solventar eficazmente estos problemas.

1.1.2. Sistemas de transporte coloidales.

El uso apropiado de sistemas transportadores de fármaco permite lograr la concentración de éste en una región específica del organismo y su liberación modificada. Los sistemas dispersos han sido extensamente utilizados con ambos fines, particularmente para lograr la localización específica. Estas formas de dosificación son sistemas coloidales, que están constituidos por suspensiones acuosas de partículas que contienen fármacos y que, generalmente, se administran mediante inyección. Las características que debe cumplir un sistema coloidal para poder ser utilizado son (2):

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

Tras su administración como sistema inyectable, el destino de las partículas coloidales en el sistema circulatorio dependerá de la vía de administración y del tamaño y características superficiales de las partículas (2).

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

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

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

retrasará su reconocimiento por el SFM y generará una estabilización estérica que reducirá la adhesión partícula-macrófago.

Otra dificultad a salvar es la necesidad que tienen las partículas de abandonar la circulación sanguínea para penetrar en el tejido diana. Esta salida de la circulación general se conoce como extravasación. No obstante, si las partículas son retenidas de forma física en la red capilar del órgano y se produce la liberación lenta del fármaco, la extravasación no es un problema, ya que el fármaco difundirá a través de los capilares mientras las partículas quedan atrapadas en esta red capilar.

Dentro de los diferentes sistemas coloidales diseñados para el transporte específico de fármacos destacan, por sus grandes posibilidades, los transportadores magnéticos coloidales. La tecnología de transportadores magnéticos se originó en la década de 1940 a partir de estudios sobre el tratamiento de aguas residuales, donde se pretendía absorber materia orgánica en pequeñas partículas de magnetita y separar magnéticamente la magnetita cargada de materia orgánica del resto de líquido procesado. Dentro de las aplicaciones biológicas de esta tecnología destacan el tratamiento de aguas residuales, la inmovilización enzimática, la separación magnética por afinidad de biomoléculas, la selección de un tipo de células entre una población celular, el transporte de fármacos, el catabolismo de tumores por hipertermia, la potenciación de agentes de contraste en resonancia magnética y los biosensores (3, 4).

Con el desarrollo de los métodos físicos y químicos para la caracterización del óxido de hierro coloidal durante la década de los 60, comenzaron a aparecer las primeras aplicaciones biomédicas de los "fluidos magnéticos" en radiodiagnóstico (5) y emboloterapia (6). La aparición de microcápsulas magnéticas como soportes de moléculas biológicas (7, 8) dio lugar al uso de matrices y de numerosos recubrimientos poliméricos biológicos (9) y sintéticos (10), para ser utilizados como transportadores magnéticos en dispositivos biomédicos, agentes de contraste superparamagnéticos orales (11) e intravenosos (12), y transportadores de fármaco (13-15).

1. Introducción.

Los principales beneficios de estos sistemas dentro del campo terapéutico (15) son la eliminación de reacciones adversas que frecuentemente derivan de la distribución sistémica de los fármacos y la posibilidad de reducir la dosis precisa de un agente terapéutico por peso corporal, disminuyendo los posibles efectos adversos derivados de las dosis tradicionales. Además, se solucionan los problemas de inestabilidad en los fluidos biológicos o *in vivo* del fármaco (16); podríamos pensar, por ejemplo, en la utilidad de estos sistemas en la terapia antiparkinsoniana, como vehículos que faciliten el paso de la levodopa a través de la barrera hematoencefálica para poder llegar a su lugar de acción en el cerebro y evitar la degradación de ésta en el resto del organismo. Por otro lado, el reconocimiento y eliminación del sistema coloidal por el SFM se verá retrasado, al estar concentradas las partículas en un lugar determinado del organismo por acción de un campo magnético, que impedirá su libre distribución. Así, las partículas verán retardada su llegada al hígado.

1.1.2.1. Características.

Las características que idealmente debe tener un transportador magnético de fármaco son (15):

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

6. Biodegradabilidad, con eliminación y toxicidad mínima de los productos de degradación.

A pesar de que muchos estudios *in vivo* muestran las posibilidades de estos sistemas, algunas dificultades deben todavía salvarse para su aplicación en humanos: i) la pobre respuesta de estos sistemas en niveles no tan superficiales del organismo (> 2 cm de profundidad); ii) la pobre retención en el lugar diana cuando el campo magnético es retirado; y iii) sus mejorables propiedades de vehiculización y liberación de fármaco. No obstante, cada vez hay un mayor número de ensayos clínicos prometedores sobre su utilidad y posibilidades en humanos (17, 18, 19).

1.1.2.2. Mecanismos de acción del fármaco liberado.

La acción del fármaco liberado de un transportador magnético en el lugar diana puede desarrollarse mediante varios mecanismos (20):

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

1.1.2.3. Tipos.

Los microtransportadores magnéticos de fármaco pueden diferenciarse en dos categorías principales según el origen de su recubrimiento (16):

- Celular: eritrocitos, neutrófilos y linfocitos.
- Sintético:

1. Introducción.

- Capsular: matriz de nanocápsulas, matriz de microcápsulas y microcápsulas reservorios.
- Vesicular: emulsiones y liposomas.

La utilización de microtransportadores celulares magnéticos fue sugerida inicialmente por Zimmerman (9); en este sentido los eritrocitos pueden comportarse como microrreservorios de un sistema de liberación lento (21) y la técnica preferida para su obtención es la diálisis hipotónica (22, 23).

Las nanocápsulas magnéticas pueden prepararse mediante la polimerización del correspondiente monómero [p.e.: alquilcianoacrilato (24) o glutaraldehído (25)] en presencia de las partículas magnéticas. La matriz de tipo microcápsula magnética se prepara mediante la adición de una mezcla acuosa caliente de albúmina (14) o almidón (26, 27), partículas de magnetita y el fármaco, en una fase oleosa en agitación continua, y enfriando a una temperatura de 20 °C o inferior. El tamaño de partícula puede controlarse en un intervalo amplio, y la ultrasonificación permite la preparación de microcápsulas en el rango de tamaño de 0.2 a 2 μm . La preparación de microcápsulas reservorios se realiza, entre otros métodos, mediante coacervación. De esta manera, se obtienen microcápsulas grandes (200 a 500 μm) y las partículas magnéticas presentes en la mezcla inicial pueden tener hasta 1.6 μm .

Las emulsiones magnéticas o/w se obtienen mediante la utilización de magnetita en ácido oleico (28) o en oleato de etilo (28-30) como fase dispersa. Proteínas como la caseína, la albúmina sérica bovina o la gelatina pueden utilizarse como estabilizadores en la fase continua acuosa. Los liposomas magnéticos (31, 32) se preparan mediante la evaporación de una dispersión en cloroformo o éter de un lípido y partículas de magnetita, y la hidratación de la capa lípido/magnetita con un buffer.

1.1.2.4. Materiales constituyentes.

Los materiales más utilizados como núcleos magnéticos son el hierro, la magnetita y la ferrita de bario, altamente dispersados.

La naturaleza de los fármacos utilizados en el transporte magnéticamente controlado es muy diversa y pueden clasificarse, según su peso molecular, en fármacos de peso molecular bajo (inferior a 1000 Da) y, en péptidos y proteínas (superior a 1000 Da). Los anticancerígenos que más han sido microencapsulados son la adriamicina (10, 33-37), la doxorubicina (38-40) y la plasmina (26, 27) en albúmina; la dactinomicina (24) y el conjugado poli-L-lisina-metotrexato (25) en poliglutaraldehído; la mitomicina C (41, 42) en etilcelulosa; la metilCCNu (30) en emulsiones; y la inulina (32) en liposomas. Los eritrocitos magnéticos también han sido utilizados para el transporte local de acetilsalicilato para prevenir la agregación plaquetaria (43), y para el transporte de diclofenaco sódico para tratar las articulaciones inflamadas y doloridas (23, 44). Entre los fármacos de elevado peso molecular en los que ha sido ensayado un guiado magnético destacan la insulina y, otros péptidos y proteínas con posible uso en endocrinología (45-47).

Los materiales más utilizados como recubrimiento son polímeros de alquilocianoacrilatos, polilactidas, polímeros de lactida-co-glicolida (48-53), carbón vegetal (13) y polímeros de ϵ -caprolactona (54, 55).

1.1.2.5. Experiencia previa.

La eficacia terapéutica de un sistema de liberación modificada depende del mecanismo y velocidad de liberación del fármaco en el lugar diana. Hasta ahora, la eficacia de los transportadores vesiculares y celulares está limitada por problemas relacionados con el pobre arrastre magnético, la

baja estabilidad y la rápida liberación *in vivo*. A pesar de que estos sistemas de transporte poseen algunas propiedades deseables como la biodegradabilidad y la no inmunogenicidad, su uso *in vivo* debe ser mejor estudiado. También, la reactividad química y la no degradabilidad de los componentes utilizados en la preparación de algunas nanocápsulas magnéticas, parecen complicar su aprobación para el transporte intravascular (14).

Se ha demostrado el potencial de las microcápsulas magnéticas en el tratamiento experimental en pacientes con carcinomas (56-61), tumor de vejiga (62) y hepatomas (63). Las microcápsulas de albúmina magnéticas han resultado ser eficaces en el tratamiento del sarcoma de Yoshida trasplantado en ratas (39, 64, 65).

Por otro lado, la oclusión de los vasos sanguíneos de un tumor mediante embolización permite la eliminación de este sin necesidad de intervención quirúrgica. Entre los diferentes agentes oclusivos, se ha investigado la utilización de micropartículas magnéticas para el tratamiento de los aneurismas intracraneales (6) y de los hipernefromas (66). Se ha demostrado que los coloides magnéticos son superiores a otros agentes que, principalmente, obliteran los vasos sanguíneos principales y producen una circulación colateral (67). Para alcanzar la diminuta red vascular pueden utilizarse pequeñas partículas, pero éstas pasarán más fácilmente a través de las desviaciones arteriovenosas dando lugar a una embolización pulmonar o de otro tipo, indeseables (67). La administración magnéticamente controlada de partículas de hierro carbonilo (68), microesferas de ferropolisacárido (67) y microcápsulas de etilcelulosa magnética (41), representa una alternativa eficaz para confinar las partículas magnéticas en los vasos sanguíneos diana. El efecto terapéutico de los preparados coloidales para embolización puede potenciarse mediante un calentamiento inducido de las partículas magnéticas, para calentar selectivamente el tumor (63); a este proceso se le denomina "hipertermia".

En cuanto al campo magnético aplicado, se cree que posee unas propiedades biotrópicas responsables de una acción antiinflamatoria,

analgésica e hipotensora y de unos efectos positivos sobre la homeostasis, el metabolismo y la reparación de los tejidos dañados (20, 65).

Las microcápsulas magnéticas también permiten el transporte rítmico de péptidos mediante el control de la difusión desde el transportador. El desarrollo de microcápsulas para la liberación controlada de moléculas grandes ($M_R > 1000$ Da) es aún un objetivo primordial en el transporte de fármacos. Se ha demostrado que la velocidad de liberación puede incrementarse más de 30 veces mediante sistemas poliméricos de fármaco que contienen nanopartículas magnéticas expuestas a un campo magnético externo oscilatorio (45). El mecanismo puede implicar el desplazamiento de las cadenas poliméricas con (46), o sin (47) la entrada de agua, la cual induce una mayor disolución del fármaco.

1.1.2.6. Mecanismo físico de la vectorización.

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

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

Cuanto mayor sea la imanación de saturación (M_s) de las partículas, menor será el campo magnético precisado para la retención del microtransportador magnético, y mayor será la eficacia del guiado magnético. A pesar de que el comportamiento de las partículas magnéticas en los líquidos viene dado por ecuaciones ferrohodinámicas (69), diversos factores biológicos pueden afectar a las características farmacodinámicas del

transportador *in vivo*. En particular, el reconocimiento de las partículas por las células del sistema reticuloendotelial generalmente provoca la localización no específica del fármaco en el hígado y otros órganos de este sistema.

En el transporte magnéticamente controlado de fármaco y la emboloterapia, el transportador magnético puede ser retenido en el órgano diana si las fuerzas magnéticas contrarrestan las velocidades de flujo lineal de la sangre en el tejido vascular (> 10 cm/s en las arterias, > 0.05 cm/s en los capilares) (14). Se ha sugerido que a velocidades de flujo sanguíneo arteriocapilar de $0.05 - 0.1$ cm/s, un campo magnético aplicado de 0.8 T es suficiente para permitir la localización deseada del 100 % de un transportador magnético que contenga un 20 % de magnetita (15). Generalmente, el campo magnético es aplicado directamente sobre el tumor o el tejido diana durante al menos 10 minutos.

1.1.2.7. Distribución en el organismo.

Diversos factores influyen en la distribución tisular de este tipo de transportadores (70, 71). Parámetros como el tamaño, que afecta a la biodistribución de transportadores de fármaco no magnéticos, influyen igualmente en el guiado de transportadores magnéticos. El tamaño parece ser un factor crítico en la localización de las microcápsulas magnéticas de $3 \mu\text{m}$ en el pulmón, y la distribución de las partículas de $1 \mu\text{m}$ en el hígado, el bazo y los riñones no se ve afectada por la intensidad del campo magnético (72). Otros estudios (10, 41) sugieren que los transportadores magnéticos pueden ser dirigidos mediante campos magnéticos inferiores a 0.8 T.

Otra forma de incrementar la respuesta magnética es aumentar el contenido magnético de las microcápsulas. Sin embargo, esta aproximación está limitada por la reducción proporcional en contenido de fármaco (33) y,

en el caso de los eritrocitos y otras células sanguíneas, por la resistencia al choque osmótico y la turbulencia (44).

La evaluación experimental de la distribución tisular de este tipo de transportadores ha sido fundamentalmente documentada mediante la utilización de microcápsulas de albúmina que contienen en torno a un 20 % de partículas de magnetita (14). Por ejemplo, comparado con la disolución de adriamicina de administración intravenosa, se ha demostrado que la administración intrarterial de un 1 % de la dosis normal de este fármaco mediante microcápsulas magnéticas de albúmina en presencia de un campo de 0.8 T logra la misma concentración de fármaco en el lugar diana (10). A excepción de los polímeros bioadhesivos y de las microcápsulas de etilcelulosa, todos los experimentos han sido realizados con campos externos inferiores a 0.4 T y se han observado diferentes perfiles farmacocinéticos y de distribución según el tamaño de partícula, el tipo de campo magnético y la profundidad y permeabilidad del lugar diana (14, 73).

Se ha demostrado que se puede lograr un incremento de entre 8 y 25 veces en la concentración de fármaco en el tejido diana con un tercio de la dosis convencional administrada. Sin embargo, el uso de transportadores magnéticos está restringido por la necesidad de un campo magnético (con intensidad de campo apropiada, gradientes de campo constantes y con la geometría adecuada), y por las dificultades propias del acceso al lugar diana (14, 74).

1.2. ANTINEOPLÁSICOS.

1.2.1. Cáncer y antineoplásicos.

El cáncer es en la actualidad, en el entorno occidental, la segunda causa de muerte por detrás de los accidentes cardiovasculares. En España unas 150.000 personas son víctimas del cáncer cada año y en el mundo son más de ocho millones (75).

Se trata de una enfermedad en la que el organismo pierde el control sobre la capacidad de regulación del crecimiento celular, lo que se traduce en una neoplasia o formación de un gran número de células. Se suele formar una masa sólida de células o tumor primario que obstruye vasos y órganos. Este tumor puede extenderse a otros lugares del organismo (metástasis) lo que suele ser la causa de la muerte del paciente. Por ello el objetivo de la terapéutica anticancerosa es la eliminación completa de toda célula cancerosa mediante métodos quirúrgicos, radioterápicos y farmacológicos.

El mecanismo que causa el descontrol de la proliferación celular en el cáncer es un cambio de la información o de la expresión de los genes. Este cambio es consecuencia de factores internos y externos:

1. Los factores internos consisten en mutaciones puntuales que afectan a una base, traslocaciones y adición o eliminación de una base durante el proceso de reparación celular. Esto provoca una alteración en la estructura de proteínas relevantes como por ejemplo el factor de crecimiento.
2. Los factores externos son los virus, radiaciones (rompen el ADN mediante la formación de radicales libres) y compuestos químicos (se unen covalentemente al ADN).

De forma general los fármacos antineoplásicos actúan frenando la proliferación y el crecimiento celular por lo que su diana son los ácidos

nucleicos, ADN ó ARN, o la división mitótica y excepcionalmente su acción es inhibir la síntesis de proteínas. Los antineoplásicos no muestran especificidad por células tumorales sin embargo debido a que estas son las que más rápido se multiplican es por lo que actúan mayoritariamente sobre estas; por ello mismo sus efectos secundarios se centran en células sanas de crecimiento rápido.

Los primeros antitumorales que se utilizaron, las mostazas nitrogenadas, provenían del gas mostaza, utilizado como arma química durante la Primera Guerra Mundial y otros, como el cisplatino, se descubrieron por casualidad. La acción citotóxica de las mostazas nitrogenadas en el tejido linfoide (leucopenia) fue estudiada por Gilman, Goodman y Dougherty en el linfosarcoma en ratones y a partir de los años 40 se comenzó a estudiar en humanos naciendo así la era de la quimioterapia antineoplásica moderna a partir de los 60's. Los primeros antimetabolitos en producir remisiones notables fueron los antifolatos (finales de los 40's) y también los primeros en curar un tumor sólido (metotrexato) en los 60's (76).

El desarrollo de fármacos antitumorales es uno de los campos que más ha aportado a la terapéutica en los últimos treinta años.

Aunque la diana sea casi siempre la misma el mecanismo de acción difiere entre los distintos antineoplásicos. Por esto se clasifican en varios grupos:

1. **Antimetabolitos.** Interfieren la fase de síntesis del ciclo celular interfiriendo en la síntesis de ADN y ARN. Son análogos estructurales de los metabolitos que normalmente intervienen en los procesos de crecimiento y división.
2. **Productos naturales.** Dentro de este grupo están los inhibidores de la mitosis, los inhibidores de topoisomerasas, antibióticos y enzimas. Los inhibidores de la mitosis se unen a la tubulina, bien inhibiendo la formación de microtúbulos (alcaloides de la *Vinca*) o bien exagerándola y haciéndola poco funcional (taxanos); hacen cesar el ciclo celular en la metafase. Los inhibidores de la topoisomerasa I son el alcaloide de la planta camptotecina y sus análogos

(topotecán e irinotecán); los que inhiben la topoisomerasa II son los derivados de la podofilotoxina (etósido y tenipósido) y los antibióticos antraciclínicos (rubicinas). Los antibióticos tienen varios mecanismos de acción debido a su diversidad estructural: intercalantes entre cadenas de ADN, inhibidores de topoisomerasas y alterantes de la membrana celular; no suelen ser específicos del ciclo celular. Los enzimas actúan rompiendo aminoácidos como la L-asparagina que rompe la asparragina.

3. **Agentes alquilantes.** Tienen gran afinidad por el ADN y las proteínas. Adicionan a ellos sus radicales que son muy reactivos. Enlazan cadenas de ADN impidiendo su replicación y la transcripción de ARN. Actúan en cualquier fase del ciclo celular.
4. **Otros compuestos.** En tumores hormonodependientes son útiles diversas hormonas y sus antagonistas.

1.2.2. 5-Fluorouracilo y fluorafur.

El 5-fluorouracilo se comenzó a tener en cuenta como posible terapia antineoplásica a partir de 1957 cuando Waisman (77) lo ensayó en ratas para tratar la leucemia. Fue en 1958 cuando Chaudhuri lo ensayó in vivo. Ese mismo año Currei *et al* llevaron a cabo los primeros ensayos clínicos (78). También en 1958 Cranston experimentó con 5-fluorouracilo en ratones contra el cáncer de mama (79) y en 1959 Liebling hizo lo propio contra la leucemia (80).

A partir de 1960 se utiliza en tumores sólidos después de los estudios que realizó Wilson en el carcinoma de vejiga (81). Ya en los años 60 se intenta reducir la toxicidad del 5-fluorouracilo (82).

En la década de los 70 se utilizaba combinado con otros fármacos como citoxano o adriamicina en cáncer avanzado de próstata (83) y con metotrexato en adenocarcinoma mamario (84).

En los 80's se utiliza contra el cáncer de ovario combinado también combinado con metotrexato y cisplatino (85). También en esta década se estudia su utilización en los cánceres de cabeza y cuello (86), en el colon-rectal (87), en el de glándulas salivares (88).

Durante los 90's se extiende su uso en combinación con otros fármacos contra los cánceres de pecho y en los del tracto gastrointestinal (89).

El 5-fluorouracilo se utiliza en la actualidad como monoterapia o como terapia combinada en (75, 90, 91):

1. Tratamiento paliativo en forma parenteral en cánceres de mama, esófago, estómago, hígado, recto, cabeza y cuello, vejiga, riñón, próstata, cérvix, endometrio y ovario. En pacientes con cáncer de páncreas no curados por cirugía o radioterapia se utiliza como tratamiento paliativo o como tratamiento coadyuvante a cirugía y/o radioterapia.
2. Tratamiento en forma tópica en alteraciones cutáneas precancerosas o cancerosas como queratosis solar y senil, enfermedad de Bowen, y epitelomas malignos superficiales simples o múltiples.

En terapia combinada se puede utilizar por ejemplo junto a ácido polínico en cáncer gastrointestinal o con ciclofosfamida y metotrexato o doxorubicina en cáncer de mama (75, 90, 91).

Del 5-fluorouracilo hay que reseñar como negativo su toxicidad y su alta capacidad de generar resistencias. Es por ello que el empleo de un sistema de liberación modificada de fármaco, que podría lograr el transporte guiado del 5-fluorouracilo hasta el órgano diana de interés, permitiría una reducción de las dosis neta administrada y con esto sus efectos tóxicos. También se solucionaría la posible aparición de resistencias al localizarse el fármaco en elevada concentración en las cercanías de la célula tumoral.

1. Introducción.

El 5-fluorouracilo pertenece al grupo de prioridad 1 en la clasificación que establece la Organización Mundial de la Salud (92) para los antineoplásicos, en función de criterios avalados científicamente, según su utilidad en el tratamiento de tumores y según la incidencia global de los tumores que responden a la terapia. El 5-fluorouracilo se muestra eficaz (tabla 1) en el tratamiento de los diez tipos de tumores de mayor incidencia: pulmón, estómago, mama, colorrectal, cerviz, cabeza y cuello, linfoma hepatobiliar, esofágico y próstata.

Tabla 1. Fármacos anticancerígenos de prioridad 1 y su actividad sobre los tumores más frecuentes.

	Actividad sobre los diez tipos de cáncer con mayor incidencia	Actividad sobre las categorías 1 y 2 de cáncer
Bleomicina	+	+
Clorambucilo	+	+
Cisplatino	+	+
Ciclofosfamida	+	+
Doxorrubicina	+	+
Etopósido	+	+
5-Fluorouracilo	+	+
Metotrexato	+	+
Prednisona	+	+
Procarbacin	-	+
Tamoxifeno	+	+
Vincristina	+	+
Vinblastina	+	+
Citarabina	-	+
Dactinomicina	-	+
Daunorrubicina	-	+
6-Mercaptopurina	-	+

El 5-fluorouracilo también es eficaz, en función de la clasificación de los tipos de cáncer de la OMS, en las categorías 1 y 2 (Tabla 1). La primera incluye

tumores para los que existe evidencia de que un fármaco o una combinación, utilizada en solitario o con otras modalidades terapéuticas, da lugar a una curación total en algunos pacientes o a una prolongación de la supervivencia de la mayoría. Los tumores incluidos en la categoría 1 son: cáncer de células germinales, trofoblástico, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia promielocítica aguda, linfoma de enfermedad de Hodgkin y no Kodgkin. En la categoría 2 se engloban tumores en los que la supervivencia media se prolonga cuando la quimioterapia es utilizada como coadyuvante de la cirugía local o la radioterapia en los estados iniciales de la enfermedad. Éstos son: cáncer colorrectal, mama, ovario, osteosarcoma, sarcoma de Swing, neuroblastoma, retinoblastoma y tumor de Wilms.

El ftorafur, también llamado tegafur, se utiliza en el tratamiento de los cánceres de estómago, de páncreas, colorrectal, de mama y de vejiga, así como en los cánceres de cabeza y cuello avanzados (91).

1.2.21. Mecanismo de acción.

El 5-fluorouracilo y su profármaco, el ftorafur, como antineoplásicos antimetabolitos, actúan en la fase de síntesis del ciclo celular interfiriendo en la síntesis de ADN y ARN. Son análogos estructurales de la uridina, que interviene en procesos de crecimiento y división celular. Actúan como falso sustrato en el proceso de síntesis (fase S del ciclo celular) de los constituyentes esenciales de los ácidos nucleicos provocando la síntesis de un ADN anómalo o incluso la detención del proceso de síntesis de ácidos nucleicos.

Los antineoplásicos antimetabolitos se dividen en análogos de ácido fólico (metotrexato, raltitrexed, lometrexol, pemetrexed, trimetrexato), de bases pirimidínicas (5-fluorouracilo, floxuridina, ftorafur, capecitabina, 5-yododesoxiuridina, citarabina, gemcitabina, fluorocitosina), de bases púricas (6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, fludarabina, vidarabina, pentostatina, cladiribina) y de la urea (hidroxiurea).

1. Introducción.

El más sencillo de los análogos de la base pirimidínica uracilo es el 5-fluorouracilo. Incorpora un átomo de flúor en posición 5 en lugar del hidrógeno. Su profármaco ftorafur, que muestra menos toxicidad, incorpora un anillo de oxolano.

El 5-fluorouracilo actúa mediante dos mecanismos (Fig. 1): i) inhibición de la timidilato-sintetasa e ii) incorporación al ARN, (76). Para ello el 5-fluorouracilo tiene que convertirse antes en desoxiribonucleótido (ácido 5-fluorodesoxiuridílico ó 5-FdUMP).

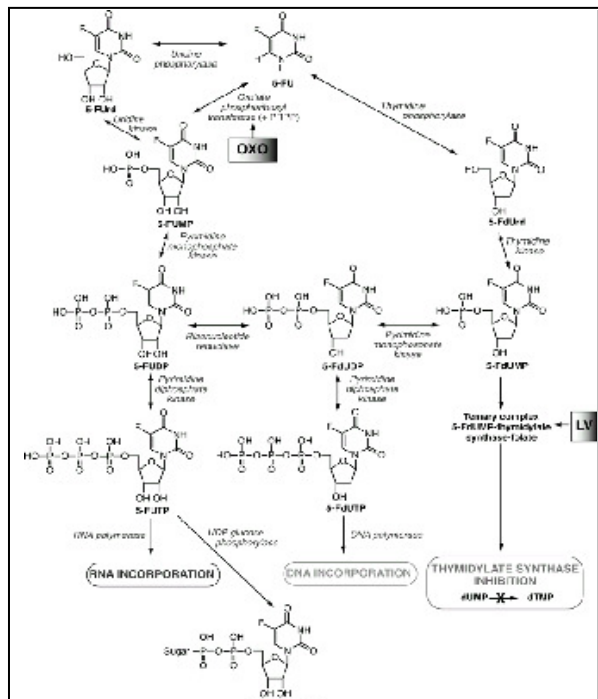


Fig. 1. Mecanismo de acción del 5-fluorouracilo.

Para ejercer su acción citotóxica el 5-fluorouracilo necesita sufrir una conversión enzimática (ribosilarse y fosforilarse) hasta nucleótido. Existen varios mecanismos para la formación del nucleótido de 5'-monofosfato (F-UMP) en células animales. El 5-fluorouracilo puede ser transformado en fluoridina por la uridilato-fosforilasa, para seguir hasta F-UMP mediante la uridilato-quinasa o bien reaccionar directamente con 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), en una reacción catalizada por la orotilato-fosforribosil-transferasa hasta dar lugar a F-UMP. Para este último compuesto se cuenta con varias vías metabólicas, incluidas la incorporación de ARN. Una secuencia reactiva que es crucial para

la actividad antineoplásica incluye la reducción del nucleótido difosfato por la reductasa de difosfato de ribonucleótido hasta el nivel de desoxinucleótido y la formación final de 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-fosfato (F-dUMP). El 5 - fluorouracilo también puede ser convertido directamente en 5-FUdR por la timidín-fosforilasa y en el siguiente paso a F-dUMP, que es un potente inhibidor de la síntesis de timidilato por acción de la timidín-quinasa. Esta vía metabólica compleja para la formación de F-dUMP puede ser esquivada mediante el complejo de desoxirribonucleósido de fluorouracilo y floxuridina (fluorodesoxiuridina o FUdR) que es convertido directamente en FdUMP por la timidín-quinasa.

La interacción entre F-dUMP y la enzima sintetasa de timidilato ocasiona delección de TTP, un constituyente necesario del ADN. El cofactor de folato, 5,19-metilentetrahidrofolato y F-dUMP, forman un complejo ternario de enlace covalente con el enzima; dicho complejo inhibidor se asemeja al estado de transición que se forma durante la reacción enzimática normal cuando se transforma dUMP en timidilato. El complejo fisiológico evoluciona hasta la síntesis de timidilato por transferencia del grupo metileno y dos átomos de hidrógeno tomados del folato para formar dUMP, pero esta reacción es bloqueada por el complejo inhibidor, por estabilización del enlace de flúor y carbono en F-dUMP; por ello hay una inhibición sostenida del enzima.

El 5-fluorouracilo también es incorporado en ARN y ADN. En células tratadas con éste, F-dUTP y dUTP (el sustrato que se acumula después de bloquear la reacción de timidilato-sintetasa), se incorporan en ADN en lugar del TTP fisiológico agotado. No se ha precisado la importancia de la incorporación de F-dUTP y dUTP en el ácido desoxirribonucleico. Es probable que la incorporación del desoxiuridilato, el fluorodesoxiuridilato o ambos compuestos en el ADN pongan en marcha un proceso de separación y reparación; dicho proceso puede ocasionar rotura del filamento de ADN, porque para la reparación de este ácido se necesita TTP, pero falta este sustrato a consecuencia de la inhibición de la timidilato-sintetasa. La incorporación de 5-fluorouracilo en el ARN también ocasiona toxicidad, como

consecuencia de los efectos principales en el procesamiento y las funciones de ARN.

Existen mecanismos bioquímicos que originan resistencia a los efectos citotóxicos del 5-fluorouracilo. Estos mecanismos incluyen pérdida de la actividad de las enzimas (o actividad menor) necesarias para activar el 5-fluorouracilo, disminución del nivel de la quinasa de pirimidin-monofosfato (que disminuye la incorporación en el ARN), amplificación de la timidilato-sintetasa y alteración de la propia timidilato-sintetasa que nos es inhibida por F-dUMP. La respuesta al 5-fluorouracilo muestra una importante correlación con bajas cifras de las enzimas deshidrogenasa de dihidrouracilo y timidin-fosforilasa. El nivel de la timidilato-sintetasa es controlado de forma estricta por un mecanismo de retroalimentación autorreguladora por el cual el enzima interactúa con su propio ARN mensajero y controla su eficiencia de traducción; este mecanismo permite la modulación rápida del nivel de timidilato-sintetasa para la división celular y también puede ser un medio importante por el cual las células cancerosas se vuelvan rápidamente insensibles a los efectos del 5-fluorouracilo. Al parecer, algunas células cancerosas poseen concentraciones insuficientes de 5,10-metilentetrahidrofolato, por lo que no forman niveles máximos del complejo ternario inhibido, con la timidilato-sintetasa. La adición de folato exógeno en la forma de 5-formil-tetrahidrofolato (o leucovorina) intensifica la formación del complejo en experimentos de laboratorio y clínicos, y muestra una mayor respuesta al 5-fluorouracilo en estudios con seres humanos. Excepto los fondos comunes insuficientes de folato intracelular, no se conoce cuál de los demás mecanismos (si existen) conllevan resistencia clínica al 5-fluorouracilo y sus derivados.

Además de la leucovorina, otros agentes se han combinado con 5-fluorouracilo en intentos por intensificar la actividad citotóxica por medio de modulación bioquímica. Las combinaciones más interesantes en clínica con el 5-fluorouracilo incluyen metotrexato, interferón, leucovorina o cisplatino. Existe interacción sinérgica con 5-fluorouracilo, de agentes que inhiben las primeras fases de la biosíntesis de pirimidina, como el N-fosfonoacetil-L-aspartato

(PALA), inhibidor de la transcarnilasa de aspartato (esto no ha sido demostrado en seres humanos). El metotrexato, al inhibir la síntesis de purina y agrandar los fondos comunes de PRPP, incrementa la actividad antitumoral de 5-fluorouracilo, cuando utiliza antes pero no después del mismo. La combinación con cisplatino y 5-fluorouracilo ha producido respuestas impresionantes en tumores de vías aerodigestivas superiores, pero no se conoce en detalle la base molecular de dicha interacción.

1.2.2.2. Relación estructura-actividad.

El 5-fluorouracilo es un bioisómero del uracilo que tiene en posición 5 un átomo de flúor en lugar del hidrógeno. El flúor tiene un tamaño similar al hidrógeno por lo que encaja perfectamente en el hueco del enzima timidilato-sintetasa pero siendo mucho más electronegativo por lo que se forma un enlace covalente con el cofactor N^{5,10}-metilen-tetrahidrofolato (siendo éste un complejo ternario muy estable). De este forma el flúor, al no ser grupo saliente como sí es el hidrógeno en el uracilo, no es desplazado para metilar la posición 5 y formar la timidina (Fig. 2).

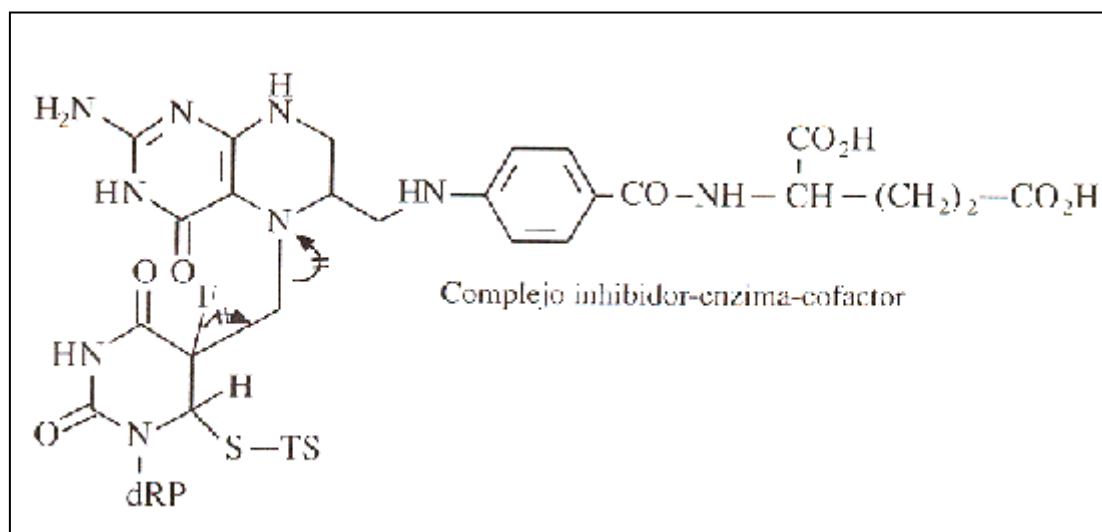


Fig.2. Inhibición del enzima timidilato-sintetasa.

1. Introducción.

Los derivados del 5-fluorouracilo están todos halogenados en la posición 5 (Fig. 3) la posición clave para que la molécula actúe como falso sustrato suicida. La floxuridina, el ftorafur y la doxifluridina contienen un flúor mientras que la broxuridina posee un átomo de bromo.

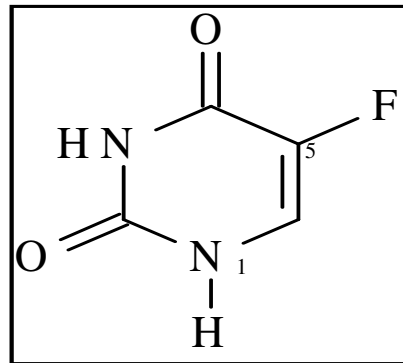


Fig.3. 5-Fluorouracilo.

En posición N¹ (Fig. 3) si se introduce un resto azucarado, derivado de ribosa, se obtienen profármacos como el ftorafur (Fig. 4), la floxuridina, la broxuridina o la doxifluridina. Esto proporciona mayor liposolubilidad a la molécula (92).

De todos los derivados del 5-fluorouracilo los más interesantes son la floxuridina y el ftorafur.

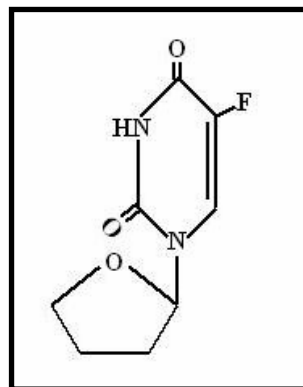


Fig.4. Ftorafur.

Otras modificaciones más novedosas consisten en la reacción de 5-fluorouracilo con derivados salicílicos y acetálicos dando lugar a compuestos con una acción antitumoral más específica (pendiente de evaluación clínica; Ref. 93).

2

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS.

En la presente Tesis Doctoral hemos pretendido realizar un estudio exhaustivo de las condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas constituidas por un núcleo magnético (hierro carbonilo) y un recubrimiento polimérico biodegradable (cianoacrilato de butilo polimérico o polibutilcianoacrilato), con el objeto de diseñar un vehículo coloidal eficaz que posibilite el transporte y la liberación modificada de dos fármacos antineoplásicos (5-fluorouracilo y ftorafur) en un lugar de acción determinado. La eficacia del recubrimiento y las ventajas que aporta a la capacidad de estas partículas para transportar fármaco se determinarán tras un análisis comparativo de la estructura y composición química de los tres tipos de materiales (hierro carbonilo, polibutilcianoacrilato y partículas mixtas), así como de las propiedades eléctricas y termodinámicas superficiales de éstos.

Para completar el trabajo hemos determinado mediante métodos espectrofotométricos y electrocinéticos la capacidad de adsorción superficial y de absorción en matriz por las partículas recubiertas de los antineoplásicos 5-fluorouracilo y ftorafur, a concentraciones crecientes de éstos. De esta manera, desarrollaremos un método óptimo de vehiculización de los anticancerígenos por las partículas compuestas.

Finalmente, se ha realizado un análisis de la cinética de liberación in vitro de los fármacos objeto de estudio desde las partículas recubiertas, determinando espectrofotométricamente la cantidad liberada y los principales factores que afectan su liberación (efecto del pH del medio de liberación, tipo de unión de fármaco por las partículas y concentración de fármaco cargado).

En concreto, en este trabajo de investigación pretendemos alcanzar los siguientes objetivos:

1. Síntesis de las partículas compuestas de un núcleo magnético (hierro carbonilo) y de un recubrimiento polimérico biodegradable (polibutílcianoacrilato). Nos basaremos en el método de polimerización en emulsión utilizado en la obtención del polímero. Caracterización de su forma, tamaño, propiedades magnéticas, composición química y estructura. Se analizarán las condiciones (composición del medio de polimerización) en las que se obtenga el mejor recubrimiento y la máxima homogeneidad en tamaño de los transportadores.
2. Estudio comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de partículas (hierro carbonilo, polímero y partículas mixtas) mediante electroforesis. Uso de modelos teóricos para evaluar su carga eléctrica superficial. Control de la misma en función de las características iónicas del medio de suspensión. Estudio de la estabilidad de las propiedades eléctricas superficiales.
3. Análisis comparativo de las propiedades termodinámicas superficiales de los tres tipos de partículas, mediante la determinación del ángulo de contacto de líquidos seleccionados. Uso de modelos teóricos para evaluar dichas propiedades. Estudio de la naturaleza hidrofílica/hidrofóbica de las partículas.
4. Determinación de la capacidad de incorporación de los antineoplásicos 5-fluorouracilo y fluorouracilo, por las partículas compuestas mediante métodos espectrofotométricos y electrocinéticos.
5. Evaluación de las cinéticas de liberación modificada de los antineoplásicos por las partículas compuestas. Análisis de los mecanismos implicados.

El presente trabajo está englobado dentro de la línea de investigación "Aplicaciones Biofarmacéuticas de los Fluidos Magnetorreológicos", del grupo

de investigación "Farmacia Práctica" (CTS-205), y se encuentra publicado de forma parcial en la revista "*Journal of Colloid an Interface Science*" (94).

2.2. CONTRIBUCIÓN DEL TRABAJO PROPUESTO.

Dentro del campo de la investigación y del desarrollo de los transportadores magnéticos coloidales, la aportación principal de esta Tesis Doctoral se centra en el diseño de un sistema de liberación modificada de fármacos constituido por un núcleo magnético (hierro carbonilo) y un recubrimiento polimérico biodegradable (cianoacrilato de butilo polimérico), con el que se podrá lograr el guiado de los principios activos anticancerígenos 5-fluorouracilo y ftorafur mediante control magnético hasta el tejido diana de interés y/o su retención en dicho lugar. Cabe esperar, utilizando este tipo de transporte que se reducirán las reacciones adversas consecuentes de la distribución a nivel sistémico y de la poca especificidad del principio activo, y que se necesitarán dosis netamente inferiores para conseguir la misma acción terapéutica. Este campo de investigación es extenso y se encuentra en constante crecimiento, por lo que el trabajo que proponemos se centra en algunos aspectos muy concretos del mismo. Especialmente, pensamos que nuestra investigación podría contribuir en los siguientes aspectos:

1. Síntesis y estudio morfológico de las partículas compuestas de núcleo magnético (hierro carbonilo) y recubrimiento polimérico biodegradable (polibutilcianoacrilato). En el procedimiento a seguir se aplica por primera vez, que sepamos, al sistema hierro carbonilo-polibutilcianoacrilato.
2. Determinación de la estructura y composición química de este tipo de partículas, y caracterización eléctrica y termodinámica superficial de la superficie de las mismas. Pretendemos mostrar que los métodos de análisis fisicoquímico de superficies son muy sensibles a las transformaciones experimentadas por las partículas al recubrirlas o al cargarlas de fármaco.
3. Análisis de la capacidad de las partículas recubiertas como transportadores de fármaco, en concreto de los antineoplásicos 5-fluorouracilo y ftorafur. Esta es una contribución esencial de nuestro

trabajo, dado que las partículas sintetizadas podrían ser excelentes vehículos de fármacos por su carácter de respuesta a campos externos, y adecuadas igualmente como sistema de liberación basado en la descomposición de un polímero biodegradable.

2.3. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO.

El presente trabajo de investigación constará, principalmente, de las siguientes etapas:

1. Síntesis de partículas compuestas por un recubrimiento polimérico biodegradable (polibutilcianoacrilato) y un núcleo magnético (hierro carbonilo). El método seguido es totalmente original: consiste en definitiva en la realización de una polimerización en emulsión en fase acuosa, en un medio en el que se encuentran en suspensión los núcleos magnéticos.
2. Evaluación de la efectividad del recubrimiento. Dadas las diferencias en carga superficial (y, especialmente, en cuanto a la dependencia de ésta con el pH) entre el hierro carbonilo y el polímero, la determinación del potencial zeta de los tres tipos de partículas en función del pH y la fuerza iónica debe ser un excelente procedimiento de evaluación de la calidad del recubrimiento conseguido. Lo mismo puede decirse de las propiedades termodinámicas superficiales de los materiales sintetizados. La determinación de los ángulos de contacto de determinados líquidos patrón permitirá evaluar el carácter hidrofílico o hidrofóbico de las partículas: este debe cambiar de los núcleos a las partículas mixtas, dado que el hierro carbonilo es hidrofílico y el polímero tiene carácter hidrofóbico.
3. Evaluación de la capacidad de vehiculización de fármaco. Se realizará un estudio de la absorbancia óptica de disoluciones de ftorafur y 5-fluorouracilo con objeto de encontrar las condiciones óptimas de trabajo y determinar el coeficiente de absorción molar mediante la obtención de una curva de calibrado. Además, se realizará una validación del método espectrofotométrico utilizado. Esto permitirá determinar espectrofotométricamente la capacidad de absorción de fármaco por las partículas mixtas. Igualmente, se determinará la posibilidad de adsorción superficial de fármaco en las

partículas ya formadas. La determinación del potencial zeta puede ser una herramienta útil en este estudio.

4. Ensayos de liberación in vitro. Se determinará la cantidad de fluorouracilo liberada y la cinética de liberación por parte de partículas mixtas. Se ensayará el efecto de los principales factores que presumiblemente afectarán a la liberación, incluyendo: características del medio de liberación, influencia del tipo de incorporación de fármaco por las partículas y de la cantidad de fármaco cargada.

3

SÍNTESIS Y ESTUDIO DE UN SISTEMA TRANSPORTADOR DE FÁRMACO

3.1. SÍNTESIS DE UN SISTEMA TRANSPORTADOR DE FÁRMACOS.

3.1.1. Hierro carbonilo.

El hierro carbonilo (Fe^0) es un material muy estudiado, una especie única de hierro elemental (a causa de su pequeño tamaño de partícula), que fue seleccionado para servir como núcleo magnético, por ajustarse al tamaño de partícula adecuado para formar parte de un sistema transportador de fármacos y por su óptima imanación de saturación (95).

El hierro carbonilo se obtiene mediante el tratamiento del hierro con monóxido de carbono (CO), bajo calor y presión. El hierro pentacarbonilo [$\text{Fe}(\text{CO})_5$] obtenido es entonces descompuesto bajo condiciones controladas, produciéndose CO y polvo de hierro extremadamente puro en forma de esferas casi perfectas con un rango de tamaño de partícula entre 5 y 6 μm (96). Su escasa toxicidad (DL_{50} : 50 g/Kg, ver Ref. 96) ha sido corroborada por diversos estudios (97-99). Con respecto a la biodegradación del hierro carbonilo utilizado en el presente trabajo de investigación, por su diámetro medio de 470 ± 180 nm (ver más adelante), la mayoría de las partículas permanecerán en el organismo, hasta ser eliminadas principalmente por filtración glomerular (100).

Para la selección de las nanopartículas de hierro carbonilo suministradas (BASF, Alemania) se estudiaron varios métodos con objeto de reducir la heterogeneidad de tamaños y el número de partículas con un diámetro mayor a 1 μm . Se sometieron distintas suspensiones de hierro carbonilo [0.3 % (p/v)] a los siguientes procesos: i) filtración y agitación en una célula de filtración con una membrana de 1 μm ; ii) ultracentrifugación con una velocidad mínima de centrifugación de 100 rpm; iii) separación magnética con un imán permanente y; iv) separación por gravedad. Sólo el último método ofreció resultados razonables. Brevemente, este método implica la

sonicación de suspensiones de hierro carbonilo al 0.3 % (p/v) durante 5 minutos antes de dejarlas bajo la acción de la gravedad. La conductividad del sobrenadante fue aproximadamente 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$, sin que hubiera ningún otro sólido, más que el hierro carbonilo, en la suspensión. Las partículas se secaron a 60 °C en un horno de vacío y fueron almacenadas hasta su uso en recipientes de polietileno, dentro de un desecador para evitar la exposición de las partículas a la humedad.

La optimización del método implica el estudio de la influencia del tiempo de sedimentación y la cantidad de sobrenadante tomado de la suspensión. De esta forma, los experimentos se realizaron empleando tiempos de sedimentación de entre 0 y 90 minutos con la extracción de 100 mL de sobrenadante, por un lado, para analizar el efecto del tiempo de sedimentación; y retirando volúmenes de sobrenadante entre 100 mL y 300 mL después de 60 minutos de sedimentación, por otro, para analizar el efecto del volumen del sobrenadante retirado. Estos experimentos fueron repetidos, al menos tres veces, con muestras independientes en todos los casos.

3.1.2. Microesferas de polibutilcianoacrilato (PBCA).

El polímero polibutilcianoacrilato o PBCA pertenece a la familia de los polialquilcianoacrilatos, muy utilizados como sustratos poliméricos en la elaboración de nanopartículas para su aplicación como sistemas transportadores inyectables de fármaco, por sus propiedades mecánicas, su biodegradabilidad, su alta biocompatibilidad y su compatibilidad con fármacos de diversa naturaleza (48, 49). Una de las más prometedoras aplicaciones de los miembros de esta familia es la terapia antineoplásica, donde mejoran los resultados farmacoterapéuticos (debido a su capacidad para revertir *in vitro* los fenómenos de multirresistencia a fármacos antitumorales desarrollados por las células cancerígenas; Refs. 50, 51 y 52) obtenidos por otros polímeros biodegradables tales como el alginato, la polilactida, la polilactida-co-glicolida (53). La toxicidad de los

miembros de esta familia de polímeros, aunque baja [DL₅₀ en ratas del poliisobutilcianoacrilato (PIBCA): 242 mg/Kg; DL₅₀ en ratas del polihexilcianoacrilato (PHCA): 585 mg/Kg, ver Refs. 24, 101], incluso tras exámenes histológicos (102), puede ser importante debido a su rápida degradación comparada con otros polímeros usados para el transporte de fármacos, tal como la polilactida (PLA) y sus copolímeros con la glicolida (PLA/GA), los cuales presentan una degradación *in vivo* relativamente lenta. Además, sus productos de biodegradación (alcohol y ácido policianoacrílico) pueden ser más tóxicos que los del PLA y PLA/GA. Sin embargo, en el caso de tratamientos de larga duración o crónicos, el uso de transportadores de cianoacrilato de una rápida biodegradación es más apropiado para evitar la sobrecarga de las células con poliésteres de degradación lenta (103).

El método seguido para la síntesis de nanosferas coloidales de PBCA fue el conocido como método de emulsión/polimerización, cuyo mecanismo de polimerización es un proceso aniónico iniciado por bases covalentes presentes en el medio (48). En detalle (104, 105), el monómero (1 % p/v) se añadió gota a gota a 50 mL de una solución acuosa 10⁻⁴ N de HCl que contenía un 1 % (p/v) del tensioactivo dextrano-70 (Dextran-70, grado clínico, Sigma, EE.UU.). Este medio se mantuvo bajo agitación mecánica a 1000 rpm durante 2 horas en las que transcurrió la reacción de polimerización, la cual terminó añadiendo 1 mL de solución de KOH 0.1 N. De esta manera, se obtuvo una suspensión blanquecina que fue sometida a un procedimiento de limpieza consistente en repetidos ciclos de centrifugación (20.000 rpm, con la centrífuga de alta velocidad Centrikon T-124, Kontron, Francia) y redispersión en agua ultrapura (calidad Milli-Q). Para asegurar que la suspensión estaba lo suficientemente limpia, se midió la conductividad del sobrenadante. Las partículas de polímero se secaron a 35 °C en una estufa con circulación forzada de aire (Digitronic, J.P. Selecta, S.A.). En el proceso de secado se observó la formación de una lámina compacta de polímero, atribuible al carácter adhesivo de éste, que da lugar a la agregación de las partículas poliméricas; esto volverá a apreciarse en las partículas compuestas. Finalmente, el almacenamiento se realizó en recipientes de polietileno conservados en un desecador.

A continuación analizaremos las diferentes fases del proceso de síntesis de las microesferas de polibutílcianoacrilato:

1. Polimerización.

Puede realizarse mediante el mecanismo del radical libre (106) y mediante el mecanismo aniónico/anfótero (107-109), cuyos esquemas se recogen en la Fig. 5.

- **Mecanismo de polimerización de radical libre:** está determinado por una alta energía de activación (125 KJ/mol). Se trata de una polimerización muy lenta, cuya velocidad de reacción depende fuertemente de la temperatura y de la cantidad de radicales libres.
- **Mecanismo de polimerización aniónica/anfótera:** tiene mayor interés por ser más rápido y fácil de realizar, además de ser apropiado para las aplicaciones biomédicas. Incluso bases muy débiles como los iones OH^- derivados de la disociación del agua son capaces de iniciarla. Los iniciadores clásicos son compuestos iónicos (I^- , CH_3COO^- , Br^- , OH^- , etc.) pero también los compuestos nucleofílicos pueden iniciarla (bases terciarias: piridina, fosfina). Presumiblemente, estos generan zwitteriones (ion híbrido con carga negativa y positiva), más que especies iónicas cargadas capaces de realizar una propagación aniónica. En nuestro caso, los iones OH^- de la disociación del agua y las porciones OH^- del dextrano-70 son los encargados de actuar como iniciadores de la reacción de polimerización.

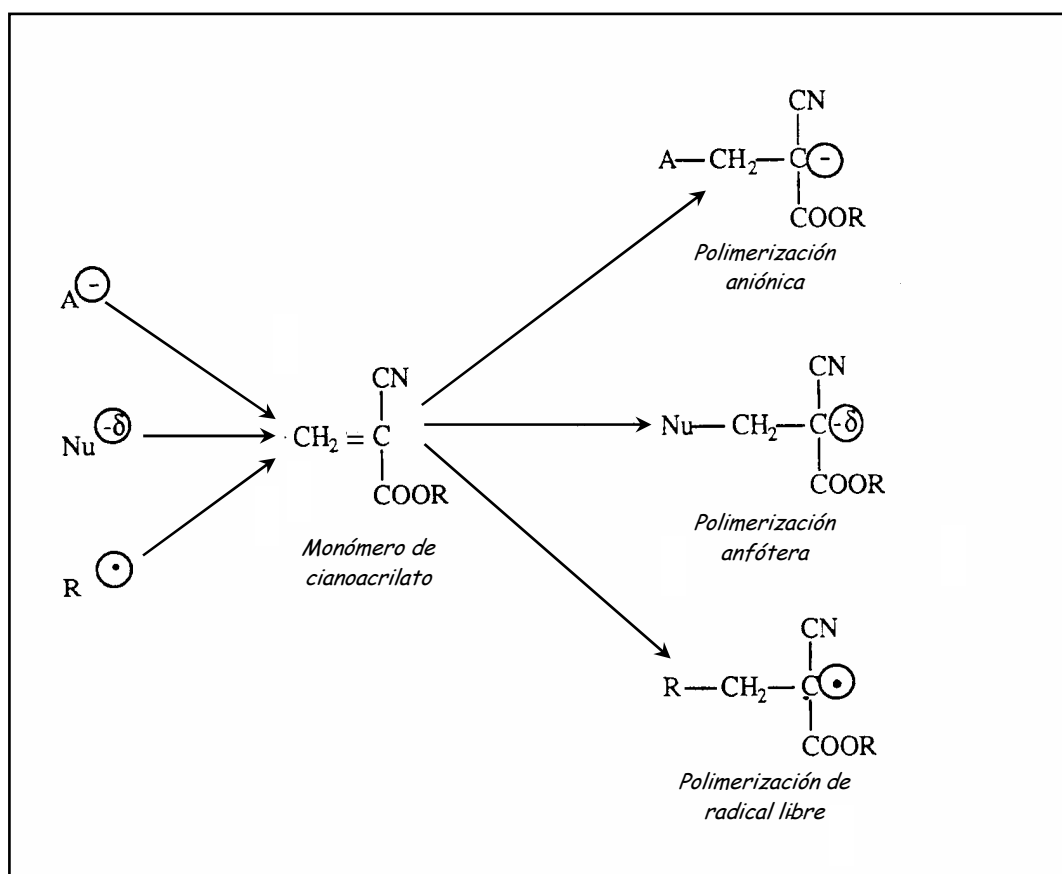


Fig. 5. Representación esquemática de los posibles mecanismos de polimerización del monómero alquilcianoacrilato: aniónico, anfótero y de radical libre. A⁻: anión; Nu^{δ-}: nucleófilo; R[•]: radical libre.

2. Propagación.

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

3. Terminación.

La presencia de un catión provoca el final de la polimerización. Sólo los ácidos fuertes son capaces de finalizar la polimerización. Sin embargo, el agua también es capaz de finalizarla mediante el ácido conjugado H_3O^+ . La polimerización aniónica da lugar a una sal polimérica del catión responsable de la terminación. La terminación de una polimerización anfótera, generalmente se produce por la formación de enlaces intramoleculares que provocan la duplicación de la longitud de la cadena polimérica. El witterion

parece ser estable e insensible a los terminadores aniónicos de las cadenas (como H_2O_2 y CO_2), dando lugar a la formación de polímeros de elevado peso molecular.

3.1.3. Partículas compuestas de hierro carbonilo y polibutílicoacrilato.

La aplicación de los miembros de la familia de los polialquiloacrilatos como recubrimiento polimérico de núcleos magnéticos ya ha suscitado interés científico, observándose que la incorporación de magnetita al polímero no modifica la toxicidad de este último (LD_{50} en ratas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PIBCA}$: 245 mg/Kg; Ref. 24).

El procedimiento seguido para obtener las nanopartículas compuestas es muy similar al descrito para las esferas de polímero, con la excepción de que el medio de polimerización contiene una suspensión de hierro carbonilo al 0,75 % (p/v) en una solución 10^{-4} N de HCl (102, 103, 105). La limpieza se consiguió mediante repetidas separaciones magnéticas y redispersiones en agua ultrapura (calidad Milli-Q). Después de aproximadamente tres ciclos, la conductividad de los sobrenadantes indicó que las suspensiones estaban limpias, tanto de compuestos químicos no reactivos, como de partículas poliméricas no magnéticas. Para analizar la influencia de las proporciones relativas iniciales de monómero con respecto al hierro carbonilo en las características del material (número de núcleos magnéticos recubiertos y grosor de este recubrimiento), la síntesis fue repetida en un rango de proporciones monómero/núcleo entre 4/3 y 4/1, sin que se utilizaran menores proporciones de monómero debido a que los resultados obtenidos en otro estudio revelaron la obtención de muchas partículas magnéticas no recubiertas y una capa de cubierta polimérica muy fina, principalmente localizada en las regiones colindantes entre las partículas (104).

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS PARTÍCULAS COLOIDALES SINTETIZADAS.

3.2.1. Forma y tamaño.

3.2.1.1. Metodología experimental.

El tamaño y la forma de los tres tipos partículas (hierro carbonilo, polibutilcianoacrilato y partículas compuestas) se dedujo a partir de fotografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM), obtenidas en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, utilizando un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 902 (Alemania) con un voltaje de aceleración de 80 kV. Previamente a la observación, se sonicó durante 5 minutos una suspensión diluida [aproximadamente 0,1 % (p/v)] de las partículas, tras lo cual se colocaron unas gotas de la suspensión en unas rejillas de cobre con película formvar. Las rejillas se secaron a 40 °C en un horno de convección.

3.2.1.2. Resultados y discusión.

La Figura 6a muestra las fotografías de microscopía electrónica de transmisión (T.E.M.), de las partículas de hierro carbonilo obtenidas utilizando el método optimizado, ya descrito, para lograr la mínima heterogeneidad de tamaños y el máximo número de partículas magnéticas con un diámetro inferior a 1µm (60 minutos de sedimentación y 100 mL de sobrenadante tomado).

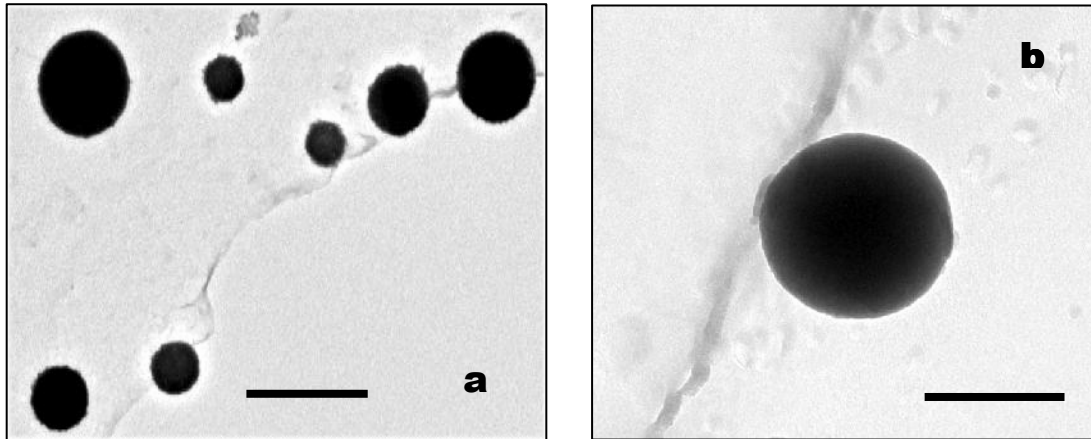


Figura 6. Microfotografías electrónicas de transmisión: a) hierro carbonilo, b) polibutilcianoacrilato. Longitud de las barras: 1 μm (a) y 500 nm (b).

Para la determinación del tamaño se realizaron medidas sobre 100 partículas de hierro carbonilo, obteniéndose un histograma al que se ajustó una distribución logarítmica cuyo resultado fue $\bar{d}_p = 470 \pm 180$ nm. Como se observa, las partículas son esféricas y presentan una distribución de tamaños no muy amplia. El análisis cualitativo del efecto del cambio del tiempo de sedimentación y la cantidad de sobrenadante tomado de la suspensión se muestra en la Tabla 2. Como se puede ver, el diámetro promedio y el porcentaje de partículas magnéticas mayores de 1 μm se reduce cuando el tiempo de sedimentación se incrementa, a pesar de la pérdida de rendimiento, hasta que ninguna partícula de este tamaño o superior es obtenida por encima de 60 minutos. Por otro lado, el tamaño medio, el porcentaje de rendimiento y el porcentaje de partículas magnéticas por encima de 1 μm crece con el volumen del sobrenadante tomado.

Tabla 2. Porcentaje de partículas con un diámetro por encima de 1 μm , diámetro medio y porcentaje de partículas de hierro carbonilo obtenidas, utilizando diferentes tiempos de sedimentación y tomando diferentes cantidades de sobrenadante de la suspensión.

Tiempo de sedimentación (min.)/Volumen de sobrenadante tomado (mL)	Cantidad de hierro carbonilo de tamaño > 1 μm (%)	Diámetro medio (nm)	Rendimiento (%)
No Tratado	22.4 \pm 2.3	720 \pm 390	-
30/100	2.4 \pm 0.7	460 \pm 230	5.7 \pm 1.5
60/100	0 \pm 0	470 \pm 180	0.6 \pm 0.2
90/100	0 \pm 0	430 \pm 180	0.4 \pm 0.1
60/200	5.2 \pm 0.3	520 \pm 255	4.2 \pm 1.0
60/300	5.6 \pm 0.6	560 \pm 250	6.5 \pm 1.2

La Figura 6b recoge la microfotografía electrónica de transmisión de una partícula de PBCA y nos permite determinar su morfología como esférica. Respecto al tamaño, se realizaron medidas sobre 100 partículas de polímero obteniéndose un histograma al que se ajustó una distribución logarítmica cuyo resultado de diámetro medio y desviación típica fue $\bar{d}_p = 550 \pm 120 \text{ nm}$.

Finalmente, se realizó mediante microfotografías T.E.M. un análisis cualitativo del efecto de la variación de las cantidades relativas de monómero e hierro carbonilo en el medio de dispersión sobre la estructura de las partículas. La Figura 7 muestra las partículas sintetizadas cuando la proporción de peso inicial es 4/3. Su diámetro medio y desviación estándar (520 \pm 210 nm), calculados según el procedimiento ya descrito, indican nuevamente que se trata de un sistema moderadamente polidisperso y la fotografía muestra claramente cómo las partículas de hierro carbonilo están recubiertas por una capa de polímero de aproximadamente 25 nm de grosor. Se observa claramente cómo son los núcleos de hierro carbonilo los encargados de determinar la forma de las partículas compuestas (esférica). Además, puede apreciarse que todos los núcleos de hierro carbonilo aparecían recubiertos, cuando la cantidad inicial de monómero está en exceso respecto a éste.

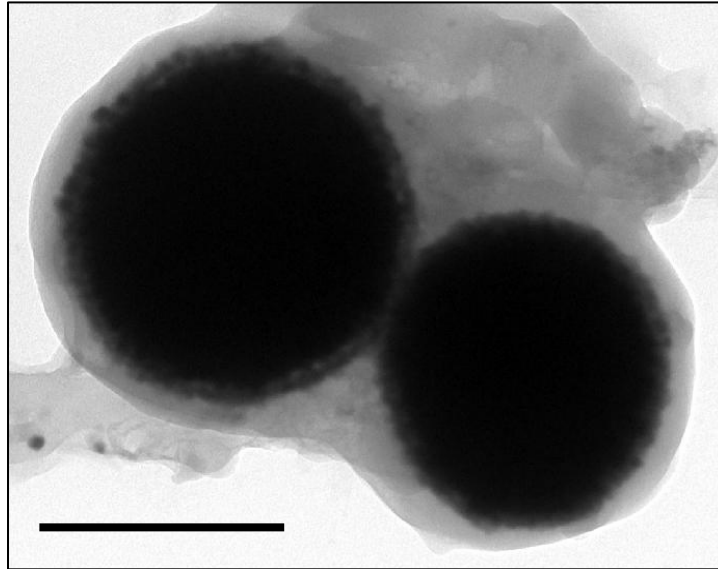


Figura 7. Microfotografía electrónica de transmisión de las partículas compuestas de hierro carbonilo y polibutílicoacrilato. Longitud de la barra: 400 nm.

En la Tabla 3, la cantidad de polímero unido a las partículas se obtuvo por diferencia de pesada entre las partículas de hierro carbonilo recubiertas y las partículas de hierro carbonilo desnudas; el grosor del recubrimiento polimérico se dedujo de las microfotografías T.E.M. Finalmente, el ensayo de redispersabilidad fue realizado cualitativamente, mediante observación visual simple de la turbidez tras la sonicación de la suspensión sedimentada. Como se observa, la cantidad de PBCA incorporada a las partículas se incrementa cuando aumenta la relación inicial monómero/núcleo magnético. Respecto al espesor del recubrimiento polimérico, debemos señalar que un exceso del monómero adicionado inicialmente no necesariamente conduce a un recubrimiento más eficiente del hierro carbonilo. La pobre redispersabilidad lograda cuando la relación inicial monómero/núcleo magnético está por encima de 4/3 es indicativa de la formación de películas de polímero, que son virtualmente imposibles de destruir mediante métodos no químicos.

Tabla 3. Características de las diferentes partículas compuestas obtenidas.

Proporción de peso inicial monómero/núcleo magnético	Peso relativo del recubrimiento polimérico	Grosor del recubrimiento (nm)	Redispersabilidad
4/3	0.714 ± 0.002	25 ± 12	Buena
4/2	1.437 ± 0.004	47 ± 24	Regular
4/1	0.193 ± 0.006	35 ± 10	Difícil

Con respecto al uso potencial final de este tipo de partículas, es importante comentar la significación biológica de los tamaños obtenidos en las partículas recubiertas. En primer lugar, la capacidad de respuesta a campos magnéticos externos será mayor cuanto mayor sea el tamaño (y por tanto, su momento magnético). Sin embargo, el tamaño no sólo afecta a las propiedades magnéticas (u otras propiedades físicas), sino lo que es más importante, al destino biológico de las partículas una vez que han sido inyectadas en el organismo. Las partículas de diámetro por encima de 200 nm serán fácilmente secuestradas por el bazo y retiradas por las células del sistema fagocítico mononuclear (110). Por el contrario, aquellos transportadores muy pequeños (de menos de 10 nm) serán rápidamente "aclerados" tras sufrir una extensa extravasación. Por lo tanto, el rango de tamaños ideal para que transportadores de fármaco coloidales se distribuyan sistémicamente se encuentra entre 10 y 100 nm. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la acción terapéutica podrá producirse con sólo que las partículas sean retenidas mediante un campo magnético aplicado externamente sobre los capilares que alimentan el tumor (tomando como ejemplo la terapia antineoplásica), y liberen el principio activo, el cual difundirá desde la pared capilar hacia el interior del tejido u órgano diana. Teniendo en cuenta este mecanismo, no sólo es importante el tamaño de las partículas, sino que el peso molecular del fármaco adquiere igual importancia en el conjunto del proceso (1). En cualquier caso, si la acción del transportador de fármaco requiere de su extravasación, algunos autores han indicado que tamaños de partícula inferiores a 1 µm son adecuados para este proceso (1, 110). Además, Goodwin y cols. (111) identificaron la existencia de extravasación tras la retirada del campo magnético externo, en partículas con una distribución de tamaños entre 0.5 y 5 µm.

3.2.2. Superficie específica.

Las áreas de superficie específica de nuestros tres tipos de materiales secos, se obtuvieron mediante la técnica B.E.T. multipunto de adsorción de nitrógeno mezclado con helio.

3.2.2.1. Fundamentos teóricos.

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

Las medidas más reproducibles del área superficial se obtienen mediante la adsorción en monocapa de un gas inerte sobre la superficie de un sólido a temperatura reducida y la subsiguiente desorción de este gas a temperatura ambiente. Las isothermas de adsorción obtenidas mediante esta técnica se interpretan utilizando las ecuaciones desarrolladas por Brunauer, Emmett y Teller, lo que se conoce con el nombre de método B.E.T. (112).

Todo gas inerte condensable puede utilizarse en las medidas B.E.T., aunque se prefieren el nitrógeno y el criptón. El nitrógeno se utiliza como gas adsorbato en la mayoría de las muestras que poseen un área superficial de aproximadamente 1.0 m²/g o más, mientras que los materiales con áreas superficiales menores deben ser analizados utilizando criptón. La menor presión de vapor del criptón provoca la adsorción de una mayor cantidad de gas en

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

El modo en el que un material adsorbe un gas se asemeja a una isoterma de adsorción. El tipo de isoterma más común y útil para las medidas B.E.T. es la isoterma tipo II (Fig. 8). El punto de inflexión de esta isoterma generalmente indica el recubrimiento monocapa del adsorbato.

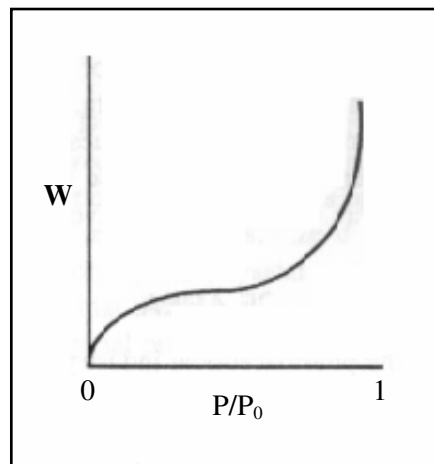


Fig. 8. *Isoterma de adsorción tipo II. W: Peso adsorbido; P/P₀: Presión relativa. La saturación se produce a P/P₀ ≥ 1.*

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

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

3. Síntesis y estudio de un sistema transportador de fármaco.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2.2.2. Metodología experimental.

Antes de medir la superficie específica de nuestras partículas, es conveniente lograr la limpieza de los gases y vapores preadsorbidos en la superficie del sólido, utilizando para ello una corriente de gas nitrógeno. En el caso del hierro carbonilo, con objeto de minimizar el tiempo necesario para la eliminación de impurezas de la superficie utilizamos temperaturas elevadas (80 °C). Sin embargo, para evitar la alteración del polímero y de las partículas compuestas a altas temperaturas, se empleó el método de la repetición de ciclos (113), que implica la adsorción y desorción repetida de un adsorbato a una presión relativa de aproximadamente 0.3. Generalmente, con la realización de 3 a 6 ciclos obtenemos una superficie limpia. No hay que olvidar que la utilización de temperaturas elevadas puede modificar las propiedades del producto (p.e.: deshidratación, conversión en otras formas farmacéuticas y descomposición).

3. Síntesis y estudio de un sistema transportador de fármaco.

La medida de la superficie específica se realizó empleando el aparato Quantasorb Jr. de Quantachrome (U.S.A.), que posee un detector de conductividad térmica para determinar la cantidad de gas desorbido de la muestra. El gas adsorbato utilizado se mezcla con helio como gas transportador inerte no condensable en las concentraciones requeridas para el análisis. Para nuestras medidas disponíamos de tres tanques de concentraciones del 10 %, 20 % y 30 % de nitrógeno en helio. La masa de muestra empleada fue 0.5 g (polímero), 0.4 g (hierro carbonilo) y 0.6 g (partículas compuestas). Los experimentos se repitieron al menos tres veces con muestras diferentes en todos los casos.

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

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

3.2.2.3. Resultados y discusión.

La superficie específica obtenida para el hierro carbonilo fue $1.37 \pm 0.16 \text{ m}^2/\text{g}$, mucho mayor que la del polímero ($0.47 \pm 0.19 \text{ m}^2/\text{g}$) y la de las partículas compuestas ($0.62 \pm 0.13 \text{ m}^2/\text{g}$).

La similitud entre las áreas superficiales del polímero y de las partículas compuestas indica un recubrimiento eficiente de los núcleos de hierro carbonilo, teniendo en cuenta que los tres tipos de partículas tienen tamaños similares. Además, los cambios apreciados en el área superficial del núcleo tras el recubrimiento polimérico deben reflejar un verdadero cambio en las propiedades físicas de la superficie del núcleo de hierro tras un recubrimiento adecuado por el polímero. Por otro lado, los valores bajos de superficie específica correspondientes al polímero y a las partículas compuestas, en comparación con los valores teóricos, pueden explicarse porque existe una tendencia a la agregación tras el secado preciso para la realización de esta determinación. Como consecuencia de esto, decrece la superficie específica expuesta a la adsorción de nitrógeno y los valores son inferiores a los esperados. Otra explicación para estos resultados es la naturaleza menos porosa del polímero.

3.2.3. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier.

3.2.3.1. Fundamentos teóricos.

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

3. Síntesis y estudio de un sistema transportador de fármaco.

del número de ondas (κ), y las intensidades de las bandas pueden expresarse como transmitancia (T) o absorbancia (A).

Hay dos tipos de vibraciones moleculares (114): La vibración de elongación y la vibración de flexión. Sólo aquellas vibraciones que provocan un cambio rítmico en el momento dipolar de la molécula se observan en el infrarrojo. Esto es debido a que la alternancia del campo eléctrico, producido por el cambio en la distribución de cargas que acompaña a una vibración, acopla la vibración de la molécula con el campo eléctrico oscilante de la radiación electromagnética. En general, los grupos funcionales que tienen un dipolo intenso dan lugar a absorciones fuertes en el infrarrojo.

El conjunto de vibraciones fundamentales (frecuencias de absorción) raramente se observará debido a la existencia de factores que aumentan el número de bandas (la presencia de armónicos y los tonos de combinación) y factores que reducen el número de bandas (frecuencias fundamentales fuera de la región de 400 a 4000 cm^{-1} , bandas fundamentales demasiado débiles para ser observadas, ausencia de un cambio en el momento dipolar, etc.).

3.2.3.2. Metodología experimental.

Para la preparación de la muestra, tomamos una pequeña cantidad de ésta (0.5 – 1.0 mg) y la mezclamos con aproximadamente 100 mg de bromuro potásico pulverizado y seco. Realizamos la mezcla en un mortero de ágata y la prensamos a 10000 – 15000 kPa para obtener un disco transparente. Como consecuencia de esta manipulación, es de esperar la aparición de bandas a 3448 cm^{-1} y 1639 cm^{-1} debidas a la humedad (114).

Para la obtención del interferograma se utilizó un espectrómetro de infrarrojos (Nicolet 20 SXB, USA), con una resolución de 2 cm^{-1} . La técnica

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

3.2.3.3. Interpretación del espectro.

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

No hay reglas establecidas para la interpretación de espectros de infrarrojos. Sin embargo, existen ciertos requisitos previos a la interpretación del espectro (114):

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

La frecuencia o longitud de onda de absorción depende de las masas relativas de los átomos, de las constantes de fuerza de los enlaces, de la geometría de los átomos y del entorno. Una molécula por simple que sea puede generar un espectro extremadamente complejo, que es

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

En un espectro de IR se distinguen 3 zonas características (114):

- La región de los grupos funcionales (4000 cm^{-1} a 1300 cm^{-1}). De forma general, si no hay absorción en esta zona puede considerarse que la molécula carece de grupos funcionales.
- La zona de la "huella dactilar" (1300 cm^{-1} a 900 cm^{-1}). La absorción en esta región es única para toda especie molecular.
- La región entre 900 cm^{-1} y 650 cm^{-1} . La ausencia de absorción en esta zona generalmente indica una estructura no aromática.

3.2.3.4. Resultados y discusión.

La Figura 9 muestra el espectro de infrarrojos de los tres tipos de partículas. Su análisis constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento, dado que permite la identificación de los grupos funcionales del polímero en las partículas compuestas, lo que claramente demuestra que el recubrimiento observado en la Figura 7 pertenece al PBCA. Sin embargo, las bandas son menos intensas como consecuencia de la menor cantidad de

polímero presente en las partículas mixtas. Las bandas más representativas han sido identificadas por comparación con los datos de las Refs. 104 y 114, las cuales son:

- A: Banda debida a la humedad que adquieren las muestras como consecuencia de su proceso de manipulación.
- B: Grupo de tres bandas que corresponden a la vibración de estiramiento del enlace C-H.
- C: Banda perteneciente a la vibración molecular del enlace $C\equiv N$.
- D: Banda que corresponde a la vibración molecular del enlace $C=O$ del polímero.
- E: Banda debida a la humedad adquirida durante el proceso de manipulación de la muestra.
- F: Grupo de tres bandas que corresponden a la vibración molecular de flexión del CH_3 .
- G: Banda correspondiente a la vibración de flexión y elongación del grupo C-CO-C, la cual confirma que la banda D corresponde a un éster.
- H: Pareja de bandas que corresponde a la vibración de elongación y flexión del grupo C-CO-C, y que resulta de la vibración de elongación y flexión de la cadena C-C-C presente en este grupo.
- I: Banda correspondiente a un éster del alcohol primario.
- J: En las muestras que contienen polímero, aparece una banda media característica de un alcano.
- K: Banda perteneciente a la vibración de oscilación del CH_2 , propia de una cadena larga de CH_2 .

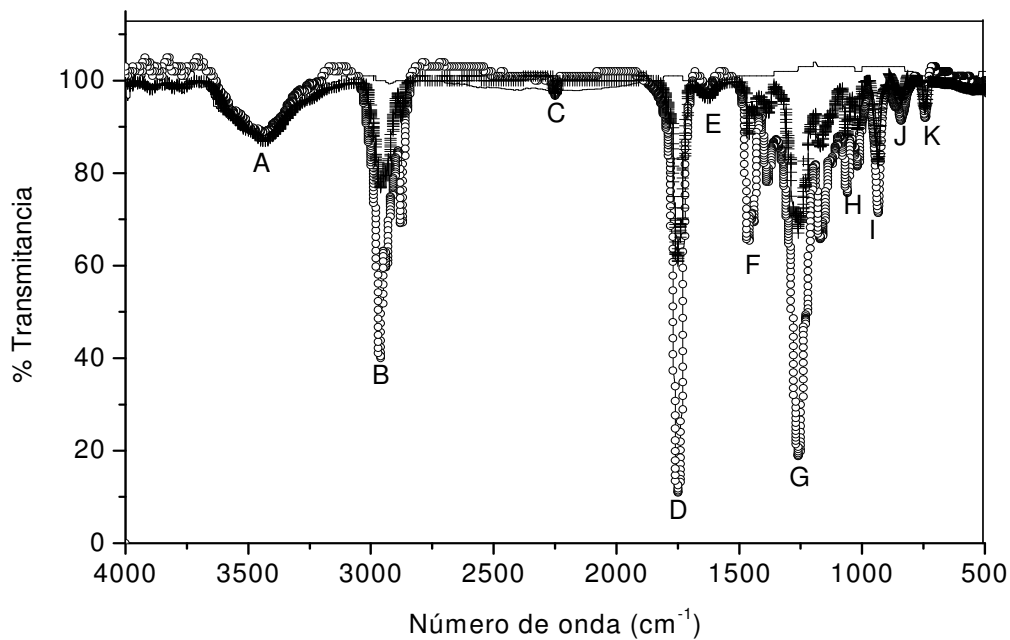


Figura 9. Espectro de infrarrojos del hierro carbonilo (\square), de las partículas compuestas (+) y de las partículas poliméricas (\circ).

3.2.4. Resonancia magnética nuclear.

3.2.4.1. Fundamentos teóricos.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) se basa en la medida de la absorción de la radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias, aproximadamente de 4 a 900 MHz. En contraste con la absorción ultravioleta, visible e infrarroja, en el proceso de absorción están implicados los núcleos de determinados isótopos en vez de los electrones exteriores. Además, es necesario colocar el analito en un intenso campo magnético, con el fin de que aparezcan los estados de energía de los núcleos que hagan posible la absorción. La frecuencia de radiación requerida para la absorción en espectroscopía de RMN depende del isótopo y de su entorno químico; el número de picos de absorción para un núcleo en un determinado entorno químico está determinado por las posiciones espaciales de los núcleos vecinos, y la

intensidad de los picos de absorción es proporcional al número de núcleos (115).

La RMN es una técnica útil en la determinación de la estructura molecular. En algunos casos basta con el espectro de RMN para la identificación de la estructura de un compuesto desconocido, mientras que en otras aplicaciones la información estructural obtenida de la RMN complementa a otros métodos estructurales o químicos. La RMN es también una herramienta útil para el estudio de las cinéticas de reacción y el equilibrio químico, y para el análisis cualitativo de mezclas de compuestos orgánicos. En la investigación farmacéutica (116) ha sido utilizada para la determinación de la estructura de los compuestos, la investigación de la quiralidad de los principios activos, la determinación del metabolismo celular y el estudio de proteínas.

3.2.4.2. Metodología experimental.

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

El análisis de la muestra de partículas poliméricas no lo realizamos en estado sólido, para evitar que la interacción dipolo-dipolo produzca un ensanchamiento de las líneas y la pérdida de resolución. La preparación rutinaria de una muestra para ^1H -RMN (115) en un instrumento de 300 MHz implica la disolución de 2 mg del compuesto en 0.4 mL de disolvente en un tubo cilíndrico de 5 mm de diámetro externo. El disolvente ideal no poseerá protones y será inerte, de bajo punto de ebullición y barato. Hemos utilizado como disolvente el cloroformo deuterado (CDCl_3), el cual no tiene resonancias en la región de interés, aunque da lugar a un pequeño pico puntiagudo a $\delta = 7.26$ ppm que no interferirá seriamente.

En nuestro análisis hemos utilizado un espectrómetro de impulsos o de transformada de Fourier (BRUKER AM-300) que permite la obtención de espectros de alta resolución. En este aparato la muestra se coloca en el

campo magnético de un imán superconductor y se irradia con impulsos periódicos de energía de radiofrecuencia que atraviesan la muestra perpendicularmente al campo magnético. Esta excitación con impulsos provoca una señal en el dominio del tiempo que decae en el intervalo entre impulsos. Esta señal se convierte entonces en una señal en el dominio de la frecuencia mediante una transformación de Fourier.

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

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

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

En relación con la capacidad para dilucidar estructuras orgánicas y bioquímicas, la ^{13}C -RMN tiene algunas ventajas sobre la de protón (^1H). En primer lugar, la ^{13}C -RMN proporciona información acerca del esqueleto de las moléculas más que sobre su periferia. Además, el intervalo de desplazamiento químico para el ^{13}C en la mayor parte de los compuestos orgánicos es alrededor de 200 ppm, comparado con las 10 a 15 ppm para el protón. Como consecuencia, hay menos solapamiento de picos en los espectros de ^{13}C que en los espectros de protones. No se observa el desacoplamiento homonuclear espín-espín entre átomos de carbono, debido a que en muestras con abundancia isotópica natural la probabilidad de que dos átomos de ^{13}C sean adyacentes es pequeña. Además, no ocurre el acoplamiento de espín heteronuclear entre ^{13}C y ^{12}C , debido a que el número cuántico de espín de éste último es cero. Por último, existen excelentes métodos para el acoplamiento de la interacción entre los átomos de ^{13}C y los protones. Con el desacoplamiento, el espectro para un tipo particular de carbono, por lo general, presenta una sola línea.

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

3.2.4.3. Interpretación del espectro.

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

El espectro de RMN de protones de un compuesto es su huella dactilar y la identificación se logra mediante comparación con espectros simples o con los desplazamientos químicos aproximados de protones de determinados grupos funcionales asociados al tetrametilsilano (TMS) (117).

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

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

Para la interpretación del espectro hemos seguido la misma rutina que en la interpretación del espectro de protones, por lo que hemos utilizado recopilaciones de espectros de ^{13}C -RMN y una tabla que relacionaba la estructura a la que pertenecía el átomo de carbono que originaba el pico con el desplazamiento químico observado (118).

3.2.4.4. Resultados y discusión.

Los datos de la resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN) (Fig. 10a) muestran cinco picos bien definidos que se interpretan como sigue:

- La banda A (0.97 ppm) corresponde a los protones del carbono adyacente localizado en posición α con respecto al grupo éster de la molécula.
- Las bandas B y D (1.46 y 2.56 ppm, respectivamente) son generadas por los hidrógenos de los grupos metilenos que constituyen la cadena principal del polímero.
- La banda C (1.74 ppm) corresponde a los protones localizados en posición β respecto al grupo éster.

- La banda E (4.27 ppm) es producida por el grupo metileno localizado en la cadena de sustitución del polímero (posición γ respecto al grupo γ éster).
- La banda F (7.26 ppm) es generada por el disolvente.

Nuestros resultados son muy similares a los obtenidos con otros polímeros de la misma familia [poli(etil-2-cianoacrilato) y poli(isobutilcianoacrilato)] (105, 111).

En la Figura 10b se representa el espectro de ^{13}C -RMN de las partículas de polímero: este espectro es de nuevo similar al correspondiente al poliisobutilcianoacrilato (111):

- La Banda A (18.96 ppm) pertenece al carbono presente en el grupo metilo de la cadena lateral del polímero.
- Las Bandas B y E (29.81 y 68.32 ppm, respectivamente) corresponde a los grupos metileno de la cadena lateral.
- La banda C (43.24 ppm) pertenece al carbono tetra sustituido de la columna lateral del polímero, de la cuál el carbono metilénico da lugar a la banda D (44.80 ppm).
- La banda F es característica del disolvente (77.09 ppm).
- La banda G, observada a 114.72 ppm, pertenece al carbono presente en el grupo ciano.
- La banda H (165.68 ppm) es característica del carbono presente en el grupo éster.

3. Síntesis y estudio de un sistema transportador de fármaco.

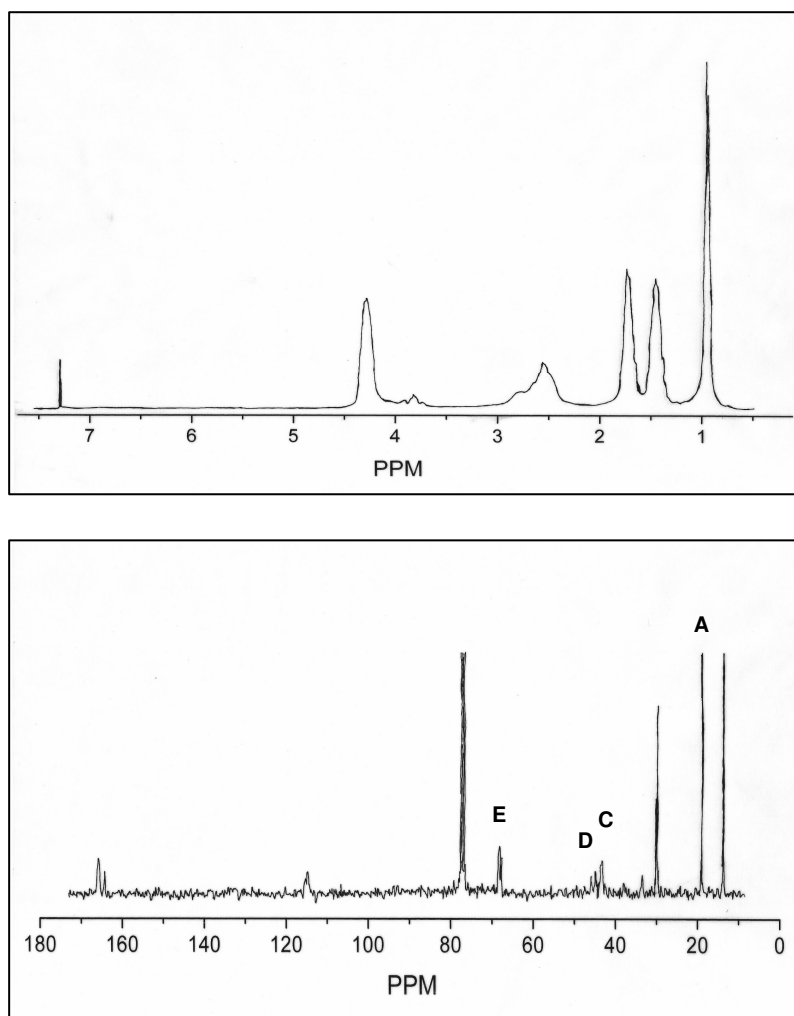


Figura 10. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (a) y espectro $^{13}\text{C-NMR}$ (b) del polibutilcianoacrilato.

3.3. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES MAGNÉTICAS.

3.3.1. Fundamentos teóricos.

Las propiedades magnéticas macroscópicas de los materiales son consecuencia de los momentos magnéticos asociados con sus átomos individuales. En un átomo, cada electrón tiene momentos magnéticos que se originan de dos fuentes distintas. Una de estas fuentes está relacionada con el movimiento orbital del electrón alrededor del núcleo; el electrón, siendo una carga en movimiento, puede ser considerado como una pequeña espira de corriente que genera un campo magnético muy pequeño y tiene un momento magnético a lo largo de su eje de rotación. El otro momento magnético se origina del espín del electrón y, por tanto, el momento magnético neto de un átomo es justamente la suma de los momentos magnéticos de cada uno de los electrones constituyentes, incluyendo tanto las contribuciones orbitales como de espín y tomando en consideración la cancelación de los momentos. Entre los distintos tipos de magnetismo se incluyen el diamagnetismo, el paramagnetismo y el ferromagnetismo; junto a éstos, el antiferromagnetismo y el ferrimagnetismo son considerados subclases del ferromagnetismo (119).

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

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

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

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

imanado es:

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

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

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

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

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

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

- **Antiferromagnetismo:** fenómeno de acoplamiento entre los momentos magnéticos que produce un alineamiento antiparalelo, de modo que no mostrarán imanación espontánea distinta de cero. Estos materiales tienen: $\mu_r > 1$ y χ_m positiva.
- **Ferrimagnetismo:** la interacción de intercambio entre momentos magnéticos en estos materiales favorece también la alineación antiparalela, pero los momentos no son idénticos en módulo, por lo que no se cancelan completamente. Su comportamiento será por ello parecido al de los ferromagnéticos.

3.3.2. Metodología experimental

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

Cualquier material ferromagnético o ferrimagnético (119, 120) a temperaturas inferiores a la temperatura de Curie está formado por pequeñas regiones tridimensionales en las cuales todos los momentos magnéticos están alineados en la misma dirección. Estas regiones se denominan dominios y cada uno está magnetizado hasta la saturación. Los dominios adyacentes están separados por paredes de dominio, a través de las cuales la dirección de imanación cambia gradualmente. La densidad de flujo (B) y la intensidad

3. Síntesis y estudio de un sistema transportador de fármaco.

del campo magnético (H) no son proporcionales en el caso de los materiales ferromagnéticos y ferrimagnéticos. Si el material está inicialmente no imanado, entonces B varía en función de H según se muestra en la Fig. 11. La curva empieza en el origen, y a medida que aumenta H , la inducción B empieza a aumentar lentamente y después más rápidamente hasta que al final alcanza un nivel determinado y se hace independiente de H . Este valor máximo de B es la densidad de flujo de saturación (B_s) y la imanación correspondiente es la imanación de saturación (M_s). Según la ecuación $B = \mu \cdot H$, la permeabilidad (μ) es la pendiente de la curva B frente a H , y se puede apreciar en la Fig. 11 que cambia con H . En algunas ocasiones, la pendiente de B frente a H (a $H = 0$) se especifica como una propiedad del material, denominada permeabilidad inicial (μ_i), tal como se indica en la Fig. 11.

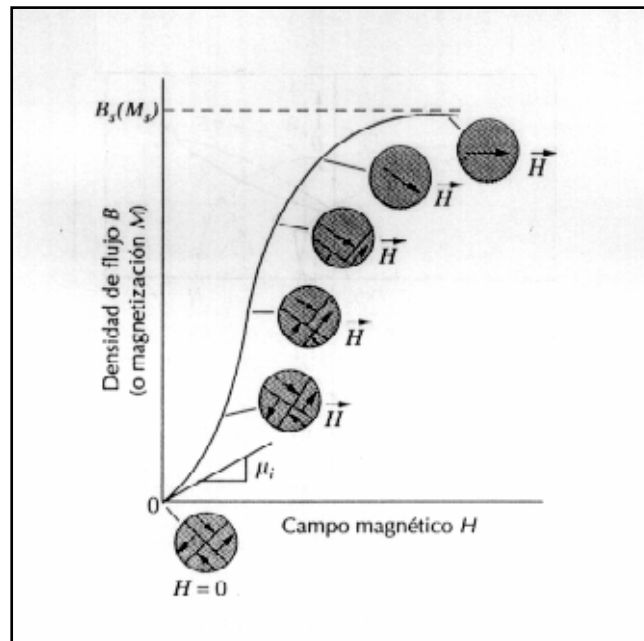


Fig. 11. Comportamiento de B frente a H de un material ferromagnético o ferrimagnético que estaba inicialmente desmagnetizado. Se representan las configuraciones de los dominios durante varios estadios de la imanación.

A medida que se aplica el campo H , los dominios cambian de forma y tamaño debido al movimiento de los límites de dominio. Las estructuras típicas de los dominios están representadas de forma esquemática en varios puntos de la curva de la Fig. 11. Inicialmente, los momentos de los dominios constituyentes están orientados al azar de tal manera que no existe un campo

de momento neto B (o M). A medida que se aplica el campo externo, los dominios que están orientados en direcciones favorables al campo aplicado (o casi alineados con él) crecen a expensas de aquellos que no están favorablemente orientados. Este proceso continúa al aumentar la intensidad del campo hasta que la muestra macroscópica se convierte en un solo dominio, el cual está casi completamente alineado con el campo. La saturación se alcanza cuando este dominio gira y se orienta con el campo H .

La determinación del modo de variación de la imanación de la muestra con el campo externo aplicado es la herramienta adecuada para caracterizar (a nivel macroscópico) el comportamiento magnético de nuestras partículas. Esta determinación se llevó a cabo a temperatura ambiente (25°C), ya que a esta temperatura se realizó la preparación de las suspensiones.

A partir de la saturación, punto S de la Fig. 12, a medida que el campo H se reduce, la curva no invierte su camino original, sino que se produce un efecto de histéresis en el que el campo B va retrasado con respecto al campo aplicado H , es decir, disminuye más lentamente. Cuando el campo H es cero (punto R de la curva), existe un campo residual B que se denomina remanencia, o densidad de flujo remanente, B_r ; el material permanece imanado en ausencia de un campo externo H .

El comportamiento de histéresis y la imanación permanente pueden explicarse por el movimiento de las paredes de los dominios. Al invertir la dirección del campo desde la saturación (punto S de la Fig. 12), el proceso mediante el cual cambia la estructura de los dominios se invierte. En primer lugar, existe rotación del dominio único con el campo invertido. Más tarde, los dominios con los momentos magnéticos alineados con el nuevo campo crecen a expensas de los primeros. Para esta explicación es crucial la resistencia al movimiento de las paredes de los dominios que ocurre en respuesta al aumento del campo magnético en la dirección opuesta; esto explica el desfase entre B y H , es decir, la histéresis. Cuando el campo

3. Síntesis y estudio de un sistema transportador de fármaco.

aplicado se hace nulo, todavía existe una fracción neta de dominios orientados en la dirección inicial, lo cual explica la existencia de la remanencia B_r .

Para reducir a cero el campo B dentro de la muestra (punto C de la Fig. 12), se debe aplicar un campo H de magnitud a $-H_c$ en la dirección opuesta a la del campo original; H_c se denomina coercitividad, o bien, algunas veces fuerza coercitiva. Al continuar aplicando el campo en la dirección contraria a la del campo original, tal como se indica en la figura, finalmente se alcanza la saturación en la dirección opuesta, correspondiendo al punto S' . Una segunda inversión del campo hasta el punto de la saturación inicial (punto S) completa el ciclo de histéresis simétrico y también produce una remanencia negativa ($-B_r$) y una coercitividad positiva ($+H_c$). La curva B frente a H de la Fig. 12 representa un ciclo de histéresis hasta saturación. Desde luego, no es necesario aumentar el campo H hasta la saturación antes de invertir su dirección; además, es posible invertir la dirección del campo en cualquier punto a lo largo de la curva y generar otros ciclos de histéresis.

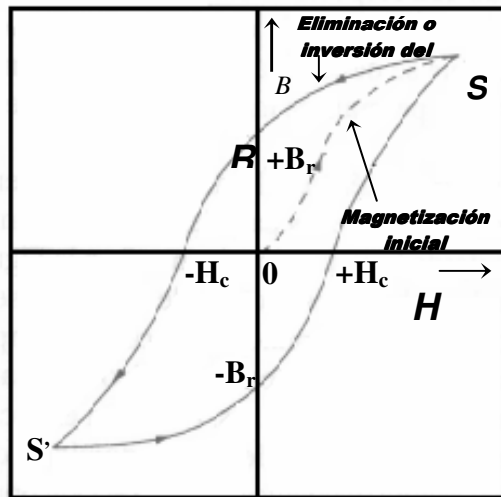


Fig. 12. Densidad de flujo magnético frente a la intensidad del campo magnético de un material ferromagnético para la saturación en ambas direcciones (puntos S y S'). La curva de histéresis viene representada por la curva sólida; la curva discontinua indica la primera imanación. La remanencia B_r y la fuerza coercitiva H_c también se indican.

La obtención del ciclo de histéresis de nuestra muestra es la herramienta adecuada para completar la caracterización (a nivel macroscópico) del comportamiento magnético de las partículas. Esta determinación se realizó en idénticas condiciones que la experiencia anterior (a 25 °C).

3.3.3. Resultados y discusión.

En la Fig. 13 representamos la curva de primera imanación o curva $M-H$ de las partículas de hierro carbonilo y de las partículas compuestas. Como se puede observar, el recubrimiento polimérico reduce la imanación de la muestra, aunque el comportamiento del hierro carbonilo y de las partículas compuestas es muy similar. Así, la susceptibilidad inicial es $\chi = 20.46 \pm 0.19$ para el hierro carbonilo y $\chi = 2.33 \pm 0.11$ para las partículas compuestas. La permeabilidad inicial es $\mu_i = 24.27 \pm 0.19$ para el hierro carbonilo y $\mu_i = 6.15 \pm 0.11$ para las compuestas. Es también significativa la reducción de la imanación de saturación provocada por el recubrimiento polimérico: 1582 ± 5 kA/m para el hierro carbonilo (similar al observado en partículas de 6 μm ; Ref. 121), y 223.7 ± 1.1 kA/m para las partículas compuestas.

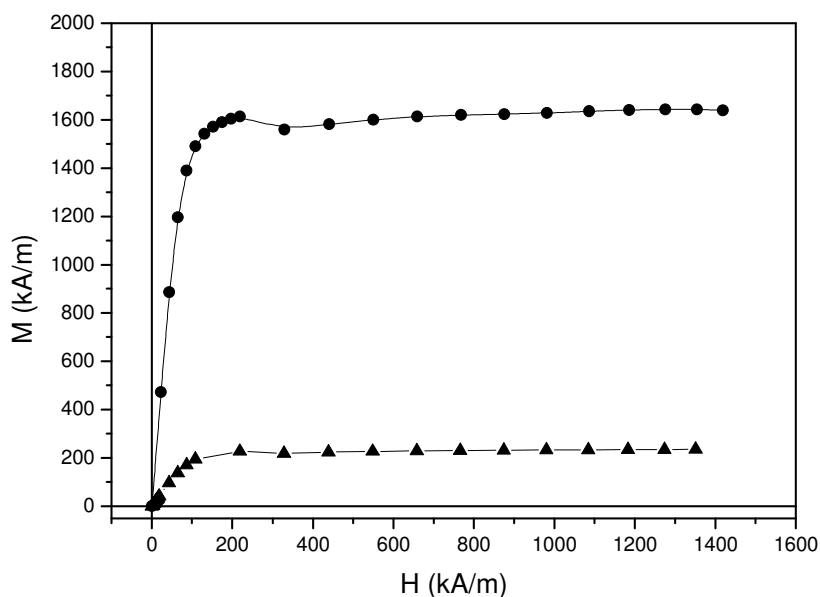


Fig. 13. Curva de primera imanación de las partículas de hierro carbonilo (●) y de las partículas compuestas (▲).

3. Síntesis y estudio de un sistema transportador de fármaco.

En la Figura 14 representamos la curva de histéresis de las partículas de hierro carbonilo y de las partículas compuestas. Las características de histéresis determinan el carácter marcadamente blando de nuestros materiales, no pudiéndose observar el área relativa del ciclo de histéresis debido a la insuficiente sensibilidad del aparato utilizado. Los materiales magnéticos blandos se caracterizan por tener una alta permeabilidad inicial y una baja fuerza coercitiva, pudiendo alcanzar la saturación con un campo aplicado relativamente pequeño (es decir, son fácilmente magnetizables y desmagnetizables) y con pérdidas de energía pequeñas. Nuevamente se observa que el recubrimiento polimérico reduce las propiedades magnéticas de la muestra, aunque el comportamiento del hierro carbonilo y de las partículas compuestas es muy similar. Nuestras partículas compuestas cumplen pues con el requisito que buscábamos: su superficie es comparable a la del polímero, pero tienen la propiedad de ser imanables, con lo que constituyen un vehículo ideal para el transporte de fármacos.

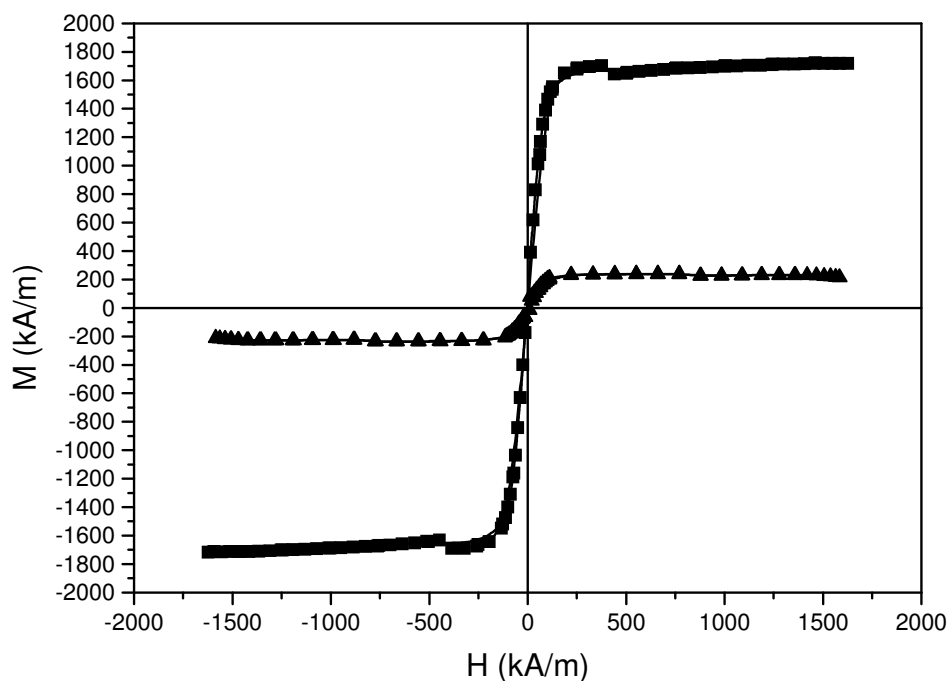


Fig. 14. Curva de histéresis de las partículas de hierro carbonilo (■) y de las partículas compuestas (▲).

3.4. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ELÉCTRICAS SUPERFICIALES: POTENCIAL ZETA.

3.4.1. Generalidades.

Consideremos una partícula sólida esférica de 1 cm de diámetro. Su superficie S y su volumen V son, respectivamente, $3.14 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ y $5.24 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3$, y la relación superficie/volumen será $S/V \approx 600 \text{ m}^{-1}$. La división de la partícula en N partículas esféricas de radio 100 nm tal que su volumen total sea igual al de la esfera original, sin embargo, provocará que la superficie sea de 15.7 m^2 y la relación $S/V \approx 3 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1}$. Este sencillo ejemplo explica que la principal contribución a las propiedades de un sistema, formado mediante la dispersión de esas N partículas en 1 L de agua, vendrá dada por las superficies e interfases de las partículas. En particular, el estado eléctrico de la superficie de las partículas puede ser determinante: si cada una de ellas tiene un potencial superficial de 100 mV (en torno al orden de magnitud típico de las partículas coloidales en medio acuoso), la fuerza electrostática repulsiva entre dos de estas partículas dispersas en agua y localizadas a una distancia entre superficies de 10 nm es $F^{EL} \approx 2.12 \cdot 10^{-12} \text{ N}$. Esta fuerza tiene que compararse con la fuerza de otras interacciones que deben o pueden existir entre ellas. Así, su atracción gravitatoria a la misma distancia será $F^G \approx 6.3 \cdot 10^{-15} \text{ N}$, si su densidad es 10^3 kg/m^3 ; y la atracción de van der Waals $F^{LW} \approx 8 \cdot 10^{-13} \text{ N}$, utilizando los valores típicos de la constante de Hamaker (122). Estos ejemplos muestran que, en la mayoría de los casos, las interacciones electrostáticas son las principales responsables de las propiedades macroscópicas de las suspensiones.

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

muchos casos) de estas propiedades eléctricas, por poder ser determinadas experimentalmente.

Como describiremos, la electroforesis (como los demás fenómenos electrocinéticos) constituye una poderosa técnica para obtener información directa sobre el estado eléctrico de la interfase. En este trabajo hemos investigado la movilidad electroforética (μ_e) de los tres tipos de partículas, como método de evaluación de la calidad y eficiencia del recubrimiento. Esto es posible dado que el comportamiento eléctrico superficial del hierro carbonilo y del polímero polibutilcianoacrilato son claramente diferentes, como veremos. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que una partícula del hierro carbonilo recubierta adecuadamente de polímero se pueda diferenciar de una no recubierta, analizando su comportamiento en electroforesis. Idealmente, la partícula compuesta debería incluso mostrar un potencial zeta idéntico al del polímero. Asimismo, esta técnica nos será de elevada utilidad para confirmar la eficacia del recubrimiento para las diferentes proporciones iniciales monómero/hierro carbonilo (4/3 a 4/1).

3.4.2. Descripción clásica de la doble capa eléctrica.

Admitiremos como un hecho experimental que la mayoría de los sólidos adquieren una carga eléctrica superficial cuando se dispersan en un disolvente polar, en particular, en una disolución de electrolito. Los orígenes de esta carga son diversos (122-125):

1. Adsorción preferente de iones en disolución. Este es el caso de la adsorción de tensioactivo iónico. Las entidades cargadas deben tener una elevada afinidad por la superficie, para evitar la repulsión electrostática por los iones ya adsorbidos.
2. Adsorción/desorción de iones de la red. Un ejemplo típico son las partículas de yoduro de plata en disoluciones Ag^+ o I^- : los iones de la red cristalina pueden encontrar fácilmente un camino entre los

espacios del cristal y pasar a formar parte de la superficie. Por ello, se denominan *iones determinantes del potencial*.

3. Disociación o ionización de grupos superficiales. Este es el mecanismo mediante el cual la mayoría de los polímeros de látex adquieren carga. Así, los grupos ácidos como el sulfato o el carboxilo son responsables de la carga negativa de las redes de polímero aniónico. Cuando el pH está por encima del pK_a de disociación de estos grupos, la mayoría de ellos estarán ionizados, generando la carga negativa. En el caso de los óxidos, los grupos superficiales anfóteros MOH pueden generar carga positiva o negativa, dependiendo del pH; los iones H^+ y OH^- serán, por lo tanto, los *iones determinantes del potencial* para los óxidos.
4. Red de carga incompleta: sustitución isomórfica. Este es el mecanismo típico, casi exclusivo, de adquisición de carga por los minerales de arcilla: parte de los cationes Si^{4+} y Al^{3+} de la estructura ideal son sustituidos por otros iones de menor carga y, prácticamente, el mismo tamaño. Como consecuencia de esto, el cristal podrá estar cargado negativamente y esta carga estructural habrá de ser compensada por cationes superficiales, fácilmente intercambiables en disolución (126).

Cualquiera que sea el mecanismo (y hay situaciones en las que participa más de uno de ellos), la carga neta superficial debe estar compensada por iones en torno a la partícula de modo que se mantenga la electroneutralidad del sistema. La carga superficial y su contracarga compensadora en disolución forman la doble carga eléctrica (DCE). A pesar de utilizarse la palabra "doble", su estructura puede ser muy compleja, no totalmente resuelta en la mayoría de los casos, y puede contener tres o más capas, que se extienden a lo largo de distancias variables desde la superficie del sólido.

Cerca de la superficie o sobre ella, se pueden encontrar cargas responsables de la carga superficial σ_0 . En su proximidad inmediata, podrán localizarse los iones capaces de sufrir adsorción específica: la distancia al sólido será del orden de un radio iónico, dado que se puede suponer que han perdido su capa de hidratación, al menos en la dirección de la superficie del sólido. Llamemos β_i a la carga superficial en un determinado plano de átomos, localizados a una distancia β_i desde el sólido (Fig. 15). Si aceptamos que la interfase tiene una geometría plana, y que x es la distancia externa normal a esta, podemos decir que la región entre $x = 0$ y $x = \beta_i$ está libre de carga, y podemos identificar un condensador cuyas placas son la superficie y el plano β_i . Si C_i es su capacidad específica (por unidad de área):

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

donde ψ_0 es el potencial en la superficie del sólido. Los iones responsables de ψ_i no sólo desarrollarán interacciones electrostáticas con la superficie: de hecho, a menudo superan la repulsión eléctrica y son capaces, por ejemplo, de aumentar la carga positiva de una superficie de carácter ya positivo. Es habitual decir que las interacciones desconocidas son de naturaleza química, a pesar de que este no es, estrictamente hablando, siempre el caso. Hay una amplia variedad de situaciones, desde la formación de uniones químicas (covalentes) a interacciones más débiles como la atracción de van der Waals, los enlaces por puentes de hidrógeno, las fuerzas hidrófobas-hidrófilas, etc. (124). Debido a la ausencia habitual de información sobre la parte más interna de la atmósfera iónica, el tratamiento a menudo no está exento de hipótesis y suposiciones más o menos realistas.

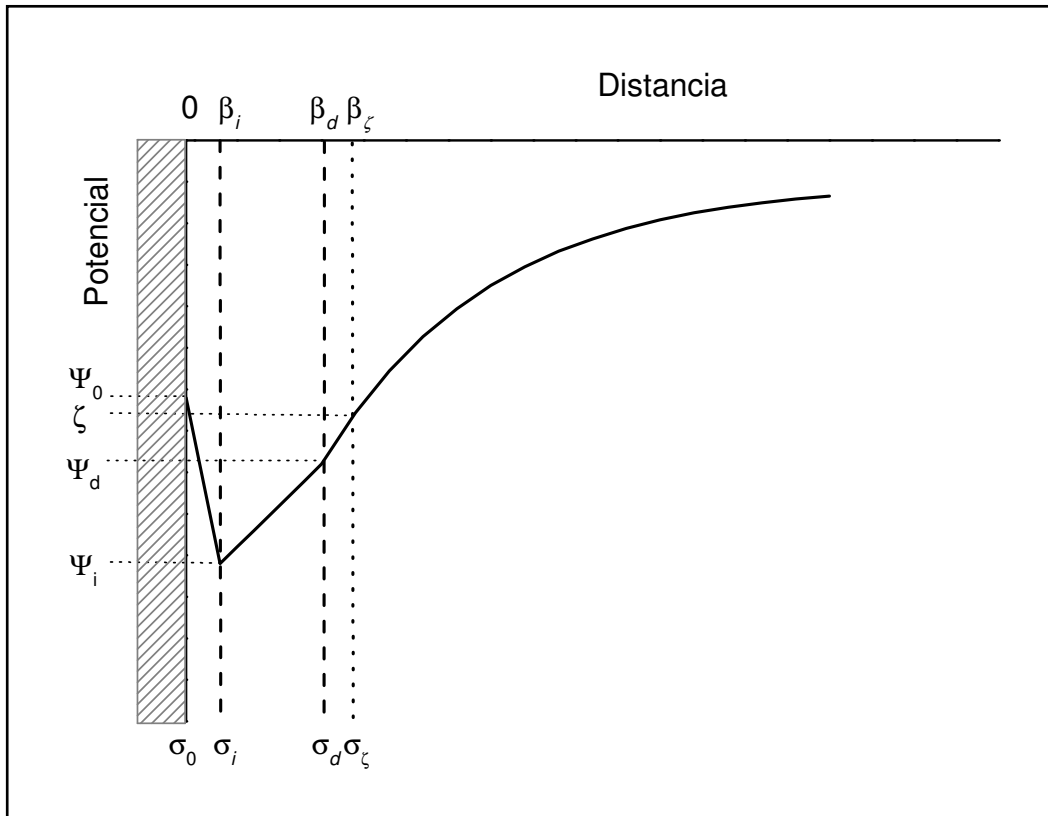


Fig. 15. Representación esquemática de la distribución de potencial en una interfase cargada negativamente.

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

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

para una interfase plana, o:

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

3. Síntesis y estudio de un sistema transportador de fármaco.

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

Debido a la electroneutralidad:

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

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

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

La capa difusa puede describirse matemáticamente de una manera simple: la condición de equilibrio para los iones en esta capa puede escribirse (125):

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

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

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

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

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

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

Debe estar claro que no hay una solución general a esta ecuación en derivadas parciales, excepto en determinados casos, tales como (127, 128):

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

$$\Psi = \Psi_d e^{-\kappa x} \quad (19)$$

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

$$\kappa^{-1} = \left\{ \frac{\epsilon_{rs}\epsilon_0 k_B T}{\sum_{i=1}^N e^2 z_i^2 n_i^0(\infty)} \right\}^{1/2} \quad (20)$$

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

3. Síntesis y estudio de un sistema transportador de fármaco.

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

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

donde y es el potencial adimensional:

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

y puede darse una expresión similar para y_d .

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

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

mientras que deben aplicarse soluciones numéricas o expresiones analíticas aproximadas en otros casos. Esto se ilustra en la Fig. 16, donde se comparan las Ecs. 19 y 21 para la interfase plana; y en la Fig. 17, donde la solución aproximada (Ec. 21), se representa junto a resultados numéricos (129).

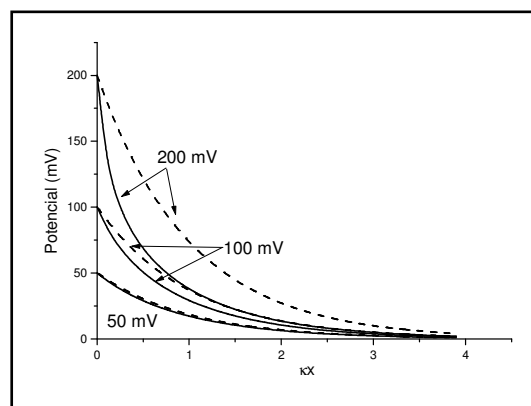


Fig. 16. Distribución del potencial en una interfase plana, calculado mediante la fórmula aproximada de Debye-Hückel [Ec. 19, (---)] y el cálculo completo [Ec. 21, (-)], para los valores de ψ_d indicados. Electrolitos monovalentes.

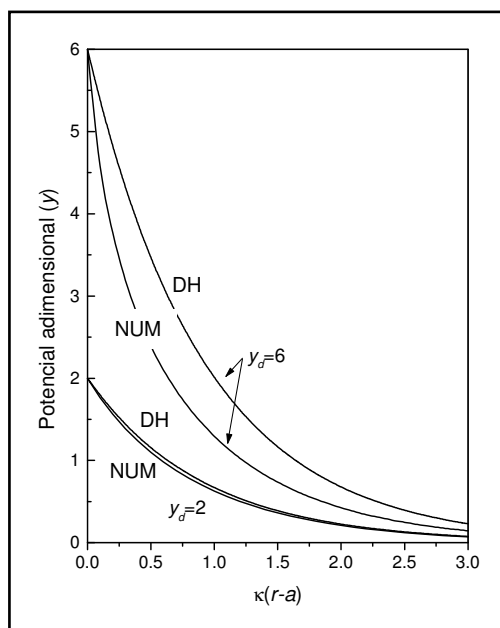


Fig. 17. Potencial adimensional en torno a una partícula esférica en función de la distancia reducida a la superficie, para electrolitos monovalentes. DH: aproximación de Debye-Hückel; NUM: cálculo totalmente numérico (127).

3.4.3. Fenómenos electrocinéticos. Potencial zeta.

Supongamos que se aplica un campo eléctrico paralelamente a la interfase sólido/disolución de la Fig. 15, y que la superficie sólida está fija en nuestro sistema de coordenadas. De lo expuesto anteriormente, debe haber quedado claro que el líquido adyacente al sólido tiene una carga eléctrica neta, opuesta a la de la superficie. Parte de los iones de este líquido probablemente estarán unidos fuertemente a la superficie mediante fuerzas atractivas de corto alcance y pueden considerarse inmóviles (esto es una aproximación; tales iones pueden ser móviles y, en tal caso, no es raro que su movilidad tenga un valor próximo al del núcleo de la disolución); lo mismo se admitirá con respecto al líquido en esta región. Sin embargo, los iones y el líquido externo podrán ser desplazados por el campo externo: de hecho la fuerza eléctrica actuará sobre los iones (principalmente, contraiones) y arrastrará líquido en su movimiento. Se producirá un movimiento relativo entre el sólido y el líquido: este es el fundamento del fenómeno electrocinético.

El potencial existente en el límite entre las fases móvil e inmóvil es conocido como potencial electrocinético o potencial zeta (ζ). La localización exacta (distancia β_ζ en la Fig. 15) del también llamado plano de cizalladura o plano de deslizamiento es un tema de investigación y, de hecho, incluso la existencia de este plano y del mismo potencial zeta son estrictamente una abstracción (130), ya que se basan en la aceptación de que la viscosidad del medio líquido varía discontinuamente desde infinito en la capa de Stern, a un valor finito en la atmósfera difusa. Una posible forma de salvar, al menos formalmente, esta incertidumbre es suponer una variación gradual de la viscosidad η desde la superficie hasta el inicio de la parte difusa (128, 130), pero la verificación experimental cuantitativa de tal variación no es accesible. Como todos los tratamientos del fenómeno electrocinético se basan en la existencia del potencial zeta, admitiremos el modelo de la variación de la viscosidad como razonablemente aceptable. Esto significa que las técnicas electrocinéticas nos darán información sobre el potencial zeta, donde quiera que este localizado. Tratar de extraer más información es peligroso y muy dependiente del modelo de doble capa elegido (128).

Los avances recientes de la teoría de los fenómenos electrocinéticos (131-136) nos han permitido relacionar los efectos electrocinéticos observados no sólo con el potencial zeta, sino también con otros parámetros de la doble capa y con la existencia de una capa de Stern con iones capaces de moverse bajo la acción de campos externos. Este número creciente de parámetros a determinar requiere para su estimación una investigación experimental bien planificada y, a menudo, experimentos utilizando diferentes técnicas electrocinéticas.

3.4.3.1. Electroforesis: teoría elemental.

Los diferentes fenómenos electrocinéticos pueden distinguirse mediante las fases móvil-inmóvil, la naturaleza del campo aplicado y la magnitud que debe ser determinada experimentalmente. Comentaremos

brevemente la técnica de la electroforesis, por ser la que hemos empleado en nuestra investigación.

Sea una partícula esférica de radio a en presencia de un campo eléctrico que, lejos de la partícula, es \vec{E}_∞ . Se considera que la partícula no es conductora y tiene una permitividad eléctrica mucho menor que la del medio de dispersión. Por el momento, también aceptaremos que la concentración de electrolito es muy baja y que a es también muy pequeño, por lo que se da la siguiente desigualdad entre el grosor de la doble capa (Ec. 20) y el radio:

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

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

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

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

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

3. Síntesis y estudio de un sistema transportador de fármaco.

Si recordamos que el potencial en la superficie (137), bajo la condición de la Ec. 24, es:

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

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

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

o la movilidad electroforética (μ_e):

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

a la que se conoce como fórmula de Hückel.

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

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

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

Hasta el momento seguimos aceptando una partícula esférica con un potencial superficial constante (ζ); otra suposición importante es que la conductividad superficial de la doble capa eléctrica es lo suficientemente pequeña como para tener una influencia despreciable en la distribución del potencial inducido por el campo. El problema se resuelve mejor si se

utiliza un sistema de referencia centrado en la esfera. Como en el laboratorio, el líquido no se mueve lejos de la partícula, la utilización de un sistema de coordenadas fijo a la partícula generará una velocidad del líquido igual a $-\vec{v}_e$ a grandes distancias.

La Fig. 18 es un esquema de la situación descrita. Admitiendo la situación de doble capa, la velocidad tangencial del líquido a una distancia r de la superficie de la partícula [lo suficientemente grande cuando se compara con el grosor de la doble capa, pero pequeña cuando se compara con el radio de la partícula ($a \gg r - a \gg \kappa^{-1}$)], puede estimarse si se conoce para una interfase plana, y además es mucho más sencillo que el problema general. De hecho, la distribución de la velocidad tangencial del líquido con respecto a una interfase sólida plana con un potencial igual a ζ , bajo la acción de un campo tangencial E_t (123, 125, 131) es:

$$v_t(x) = -\frac{\epsilon_{rs}\epsilon_0}{\eta} [\zeta - \psi(x)] E_t \quad (31)$$

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

$$\vec{v}_s = -\frac{\epsilon_{rs}\epsilon_0}{\eta} \zeta \vec{E}_t \quad (32)$$

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

$$\vec{v}_s(\theta) = -\frac{\epsilon_{rs}\epsilon_0}{\eta} \zeta \vec{E}_t(\theta) \quad (33)$$

3. Síntesis y estudio de un sistema transportador de fármaco.

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

Teniendo en cuenta que el potencial $\delta\psi(\vec{r})$ debido al campo externo en torno a la esfera viene dado por (137, 138):

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

el campo tangencial será:

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

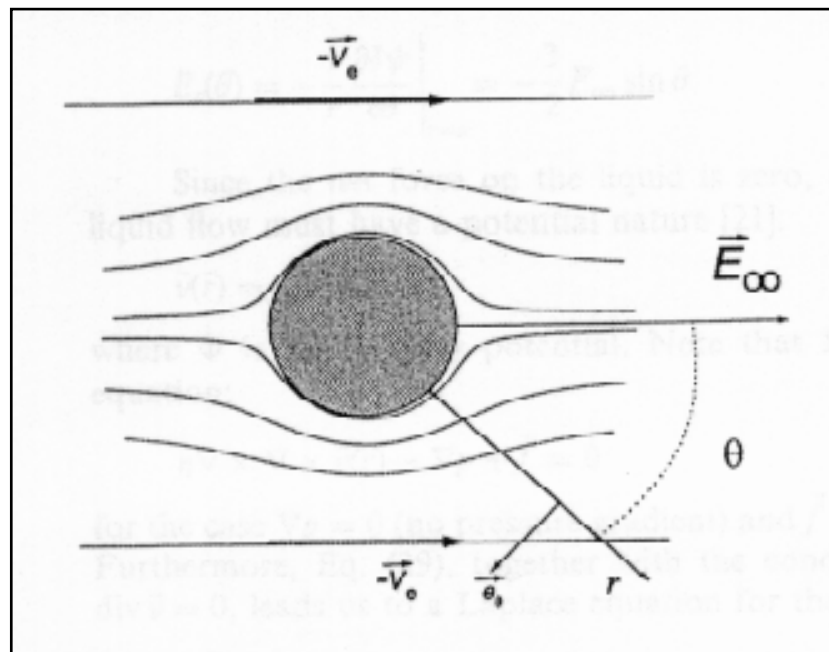


Fig. 18. Esquema del flujo de líquido en torno a una partícula esférica cargada negativamente. Lejos de la interfase, el líquido se mueve con una velocidad constante $-\vec{v}_e$.

Por otro lado, fuera de la doble capa, la fuerza eléctrica neta sobre el líquido es cero y, como no se aplica gradiente de presión, el flujo de líquido debe tener una naturaleza potencial (139):

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Síntesis y estudio de un sistema transportador de fármaco.

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

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

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

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

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

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

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

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

A partir de toda esta deducción, estará claro que la Ec. 43b es válida para cualquier geometría a condición de que (140, 141):

1. La partícula dispersa adquiera carga superficial, que se compensa mediante un exceso de carga de signo opuesto en el medio.
2. La partícula sea rígida y de forma arbitraria, con potencial eléctrico superficial uniforme (ζ) con respecto al líquido lejos de la interfase.
3. Las dimensiones de la partícula sean tales que el radio de curvatura de la interfase en cualquier posición sea mucho mayor que el grosor de la doble capa.

4. La partícula no sea conductora.
5. Los efectos de la conductancia superficial sean despreciables.
6. La constante dieléctrica y la viscosidad del medio sean independientes de la posición (ver, sin embargo, las Refs. 141-144).
7. El campo aplicado, a pesar de estar deformado por la presencia de la partícula, se suma vectorialmente al campo local en equilibrio de la doble capa.

3.4.3.2. Electroforesis: tratamientos más elaborados.

Henry (145) fue el primer autor que eliminó la restricción 3 anterior, y resolvió el problema para esferas (también para cilindros infinitos) de cualquier radio a , es decir, cualquier valor κa , aunque para pequeños potenciales zeta, ya que se acepta que la Ec. 23 determina la distribución de potencial en la doble capa en equilibrio. Restringiéndonos al caso de la esfera, la ecuación de Henry para partículas no conductoras es:

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

donde:

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

Una fórmula aproximada para $f(\kappa a)$ ha sido publicada por Ohshima (138).

Una contribución crucial para entender y evaluar la movilidad electroforética y, en general, la física del fenómeno electrocinético se debió a Overbeek (141, 146); Booth (147-149) también elaboró una teoría que siguió líneas similares, para esferas en ambos casos. Estos autores, fueron los primeros en considerar que durante la migración electroforética

3. Síntesis y estudio de un sistema transportador de fármaco.

la doble capa pierde su simetría original, y se polariza: la distribución del potencial fuera del equilibrio no es la simple adición del creado por el campo externo en torno a la esfera no conductora y el de la doble capa eléctrica en equilibrio (150). El problema matemático es mucho más complejo, y hasta la aparición de los ordenadores sólo estaban disponibles teorías aproximadas (bajo ζ , gran κa ; Refs.: 141, 146-149). Los primeros tratamientos (numéricos) del problema, válidos para valores arbitrarios del radio, el potencial zeta, o las concentraciones iónicas, fueron elaborados por Wiersema y cols. (151) O'Brien y White (121).

Como no es relevante describir estos tratamientos, simplemente mostraremos algunos resultados en la Fig. 19. La validez de la fórmula de Smoluchowski para valores elevados κa y potenciales zeta de bajos a moderados es claramente apreciable; también es evidente que el tratamiento de Henry es válido para ζ bajo, independientemente del grosor de la doble capa.

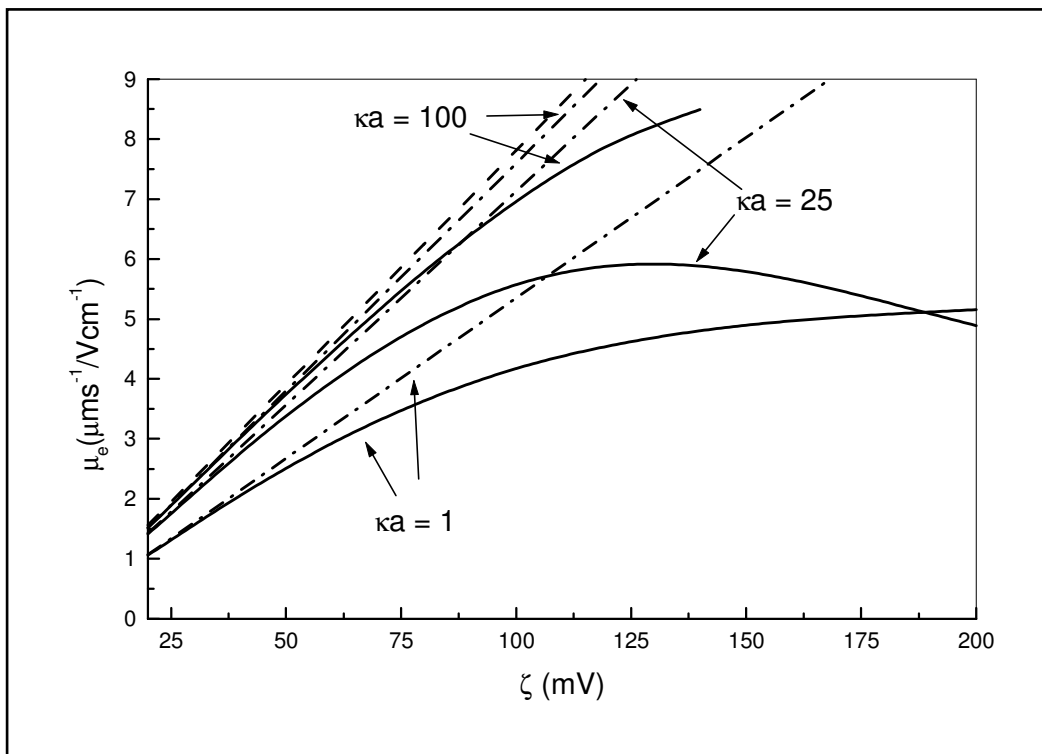


Fig.19. Movilidad electroforética vs. potencial zeta para partículas esféricas de radio $a = 100$ nm y para $\kappa a = 1, 25$ y 100 en disoluciones de KCl. Línea discontinua (---): ecuación de Smoluchowski; líneas discontinuas-punteadas (-.-): fórmula de Henry (145); líneas continuas (-): teoría de O'Brien y White (121).

3.4.4. Metodología experimental.

La determinación de las movilidades electroforéticas de los distintos tipos de partículas se llevó a cabo utilizando un dispositivo Malvern Zetasizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido), basado en el análisis de la autocorrelación de la luz láser dispersada por las partículas en movimiento. Este aparato permite determinar μ_e con errores del 5 % o menores, y la temperatura es mantenida constante (hasta ± 0.2 °C) utilizando un módulo Peltier.

Las suspensiones estudiadas tenían una concentración de partículas aproximada del 0.1 %. Antes de preparar la suspensión se fijaba la concentración de electrolito deseada y se ajustaba, en su caso, el pH con HNO₃ o KOH. Debido a la laboriosidad del ajuste de ciertos pH, la preparación de las suspensiones se realizó cuando estos eran estables, ya que las diferentes partículas habrían estado demasiado tiempo en disolución antes de medir, con el consiguiente riesgo (fenómenos de oxidación y de degradación, principalmente) para la estabilidad de sus propiedades eléctricas superficiales (104) . Las medidas se realizaron a 25 °C, 24 horas después (excepto en los estudios de estabilidad), comprobando y reajustando, si procedía, previamente el pH. Los datos presentados son el promedio de 9 determinaciones, cambiando la muestra cada tres.

3.4.5. Resultados y discusión.

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

La Figura 20 muestra ambos parámetros en función del pH bajo una fuerza iónica constante (KNO_3 10^{-3} M), para las partículas con una relación monómero/núcleo magnético 4/3. La teoría de O'Brien y White (121) se utilizó para convertir los valores de μ_e a ζ . Como puede observarse, las partículas de hierro carbonilo presentan un punto isoeléctrico o pH de potencial zeta zero bien definido en las proximidades del $\text{pH} = 4.5$. Debemos realizar una breve reflexión sobre el origen de la carga superficial de las partículas metálicas y su dependencia con el pH. En un exhaustivo estudio sobre los puntos isoeléctricos de diversos metales, Kallay y cols. (152) demostraron las similitudes existentes entre los puntos isoeléctricos de metales y los de sus correspondientes óxidos. Estas similitudes se basan en que la carga superficial de la interfase metal/solución es originada por una delgada capa anfotérica de óxido cuya formación no puede evitarse en ambientes oxidantes. En particular, el punto isoeléctrico del hierro es similar al de la hematites ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Como es bien sabido que este óxido tiene un potencial zeta cero, para un punto isoeléctrico entre 7 y 8 (153), puede esperarse que las partículas de hierro presenten una carga superficial positiva al pH de la síntesis de las partículas compuestas ($\text{pH} \sim 4$).

Este comportamiento no se aprecia en las partículas de polímero, las cuales presentan una carga superficial neta negativa en todo el intervalo de pH estudiado. Sólo a pH inferiores a 3 los datos revelan la presencia del pH de potencial zeta cero. Esto es debido al menor grado de disociación de los grupos acrílicos libres a este pH (154). Estas grandes diferencias entre el comportamiento electrocinético de los núcleos y el polímero convierten a la electroforesis en una herramienta muy útil para comprobar cualitativamente la eficacia del recubrimiento. De hecho, la Fig. 20 muestra claramente que las partículas compuestas de cualquier composición presentan un comportamiento casi idéntico a las de polímero puro. El recubrimiento polimérico oculta muy eficazmente el núcleo magnético, haciendo que la superficie de las partículas compuestas sea indistinguible de la de las partículas de polímero, hecho que se ha observado en otros trabajos de nuestro grupo de investigación (104).

Para confirmar los resultados descritos, realizamos la determinación de la movilidad electroforética de nuestros tres tipos de partículas en función de la concentración de KNO_3 a $\text{pH} = 5$ constante, siguiendo la misma metodología. Los resultados de este análisis se representan en la Fig. 21, y de nuevo la similitud entre la electrocinética del polímero y de las partículas compuestas, y las diferencias respecto al hierro carbonilo se observan claramente, al igual que ha ocurrido en otros trabajos de nuestro grupo de investigación (104).

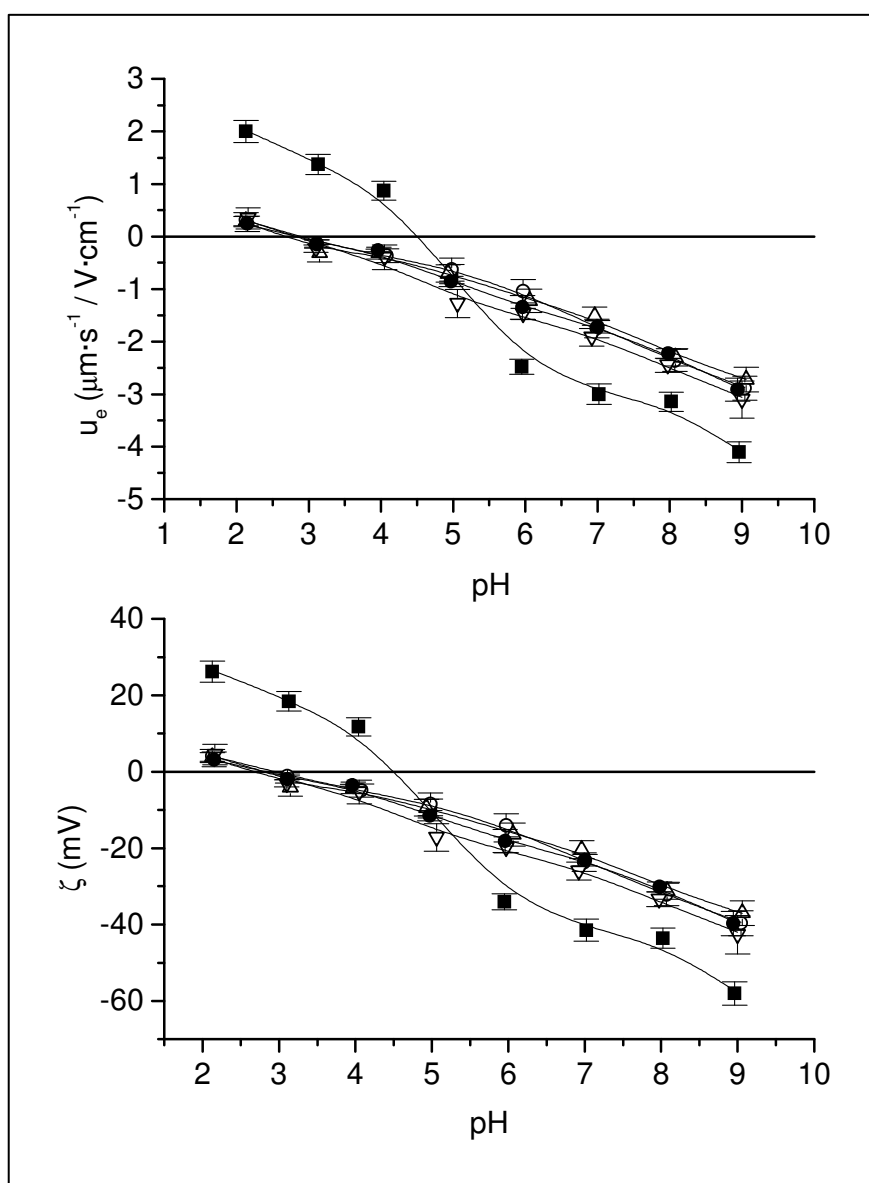


Figura 20. Movilidad electroforética (a) y potencial zeta (b) del hierro carbonilo (■), del polibutilcianoacrilato (○) y de las partículas compuestas [de diferentes proporciones de peso inicial monómero/hierro carbonilo: 4/3 (▽), 4/2 (Δ) y 4/1 (◇)] en función del pH, y en presencia de KNO_3 10^{-3} M.

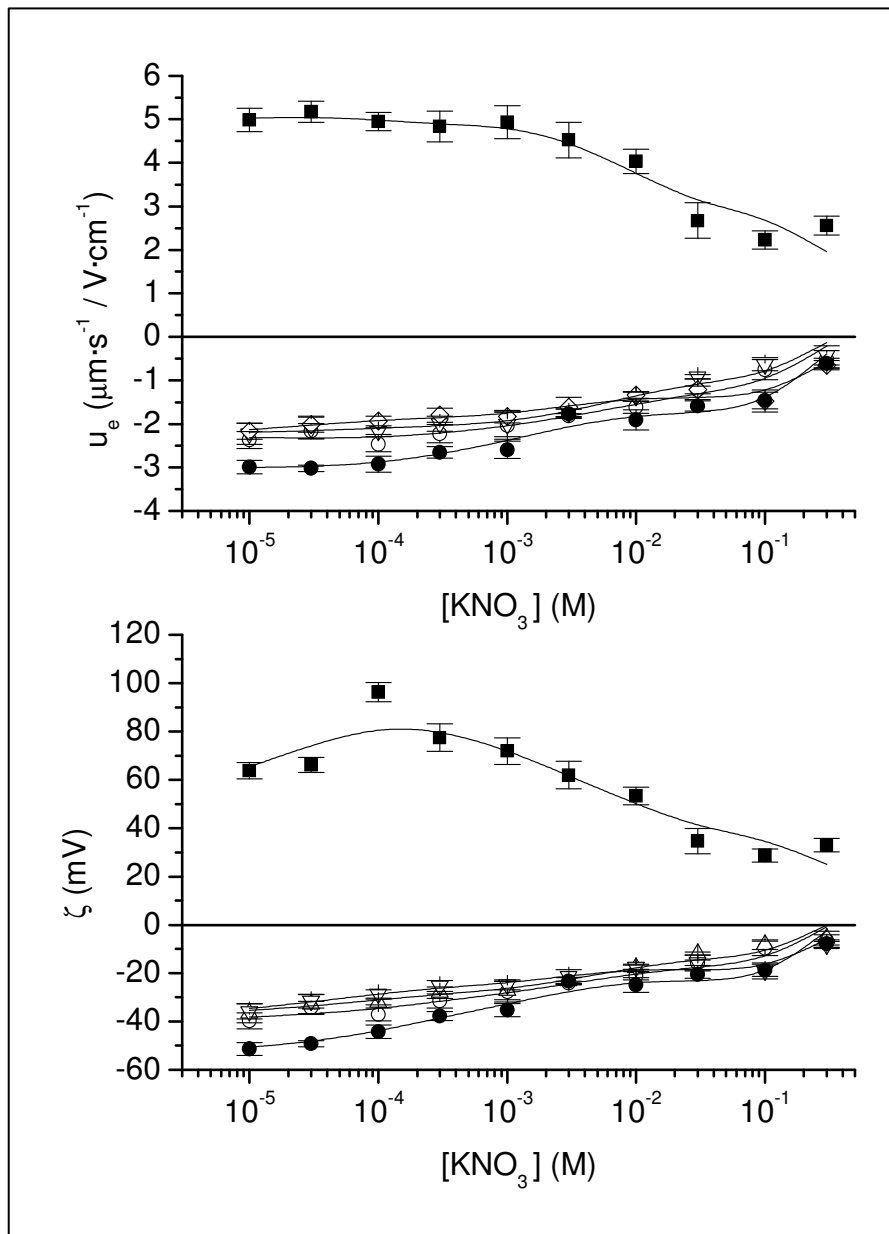


Figura 21. Movilidad electroforética (a) y potencial zeta (b) del hierro carbonilo (■), del polibutilcianoacrilato (·) y de las partículas compuestas [de diferentes proporciones de peso inicial monómero/hierro carbonilo: 4/3 (▽), 4/2 (Δ) y 4/1 (○)] en función de la concentración de KNO_3 y a pH 5.

3.5. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES TERMODINÁMICAS SUPERFICIALES.

3.5.1. Generalidades.

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

Se estimará así la importancia de las contribuciones no electrostáticas al balance total de la energía de interacción entre las partículas de los sistemas analizados. Para llevar a cabo esta estimación, se utilizarán datos experimentales de los ángulos de contacto formados por líquidos seleccionados con nuestros tres tipos de sistemas (núcleo magnético, recubrimiento polimérico y partícula compuesta). Además, la caracterización termodinámica superficial será de utilidad en la confirmación de la eficacia del recubrimiento para las diferentes proporciones iniciales monómero/hierro carbonilo (4/3 a 4/1).

3.5.2. Interacciones superficiales.

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

- Las interacciones dispersivas, denominadas así debido a su relación con fenómenos de dispersión de luz en el visible y ultravioleta. Son también conocidas como interacciones electrodinámicas o Lifshitz-van der Waals (LW) y estarán siempre presentes, al igual que sucede con la interacción gravitatoria. El modelo clásico DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) las considera, junto con la interacción electrostática, responsables de la energía total de interacción entre partículas.
- Otras interacciones no dispersivas (fuerzas de solvatación, estructurales y de hidratación) denominadas en general, interacciones no-DLVO: electrón-donante/electrón-aceptor, o ácido-base de Lewis (AB). El modelo teórico que nos permitirá analizarlas es el desarrollado por van Oss y cols. (155).

3.5.2.1. Interacciones dispersivas.

Van der Waals fue el primer autor que sugirió que en los líquidos y gases no ideales, existe entre átomos y moléculas una interacción de naturaleza diferente de la electrostática, a la que posteriormente se denominó interacción de van der Waals. Más adelante, numerosos investigadores analizaron la naturaleza de esta forma de interacción: Keesom (156), Debye (157) y London (158). Según estos autores, cuando dos átomos o moléculas se

encuentran en el vacío, se pueden considerar tres contribuciones diferentes a la interacción de van der Waals:

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

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

siendo k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y l la distancia interatómica (159).

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

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

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

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

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

Las interacciones de London son universales y aparecen entre cualquier par de átomos o moléculas en fase condensada, siendo en este caso su contribución muy superior (160) a las de Keesom y Debye, que requieren que haya dipolos permanentes (161, 162). En efecto, Chaudhury (163) demostró que, macroscópicamente, las interacciones en fase condensada son principalmente de dispersión (London-van der Waals), siendo la contribución neta de las otras dos formas del orden del 2-3 % del total de la energía de interacción dispersiva. En todo caso, se ha demostrado, usando el planteamiento de Lifshitz (164), que para sistemas macroscópicos, las interacciones van der Waals-Keesom y van der Waals-Debye se pueden tratar de igual forma que las interacciones van der Waals-London (162). Por eso, todas ellas se pueden agrupar dentro del conjunto de interacciones electrodinámicas, denominadas genéricamente interacciones Lifshitz-van der Waals (LW).

Debe recordarse que aunque las interacciones dispersivas son débiles en comparación con las electrostáticas responsables del alcance iónico o del covalente, se ha podido comprobar que afectan de forma considerable a un variado conjunto de fenómenos relacionados con los sistemas de partículas coloidales, tales como adhesión, adsorción, agregación de partículas en suspensión o estructura de macromoléculas condensadas, como polímeros o proteínas (165). Resumiendo, las características esenciales de estas interacciones son:

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

Matemáticamente, es posible obtener mediante un término global, la contribución a la tensión superficial de todas las interacciones de tipo dispersivo. Se realiza mediante la teoría de Lifshitz de la atracción entre sistemas macroscópicos (166, 167) y se denomina componente LW o Lifshitz-

van der Waals (γ^W) a la componente de la tensión superficial o energía libre superficial asociada a estas interacciones.

3.5.2.2. Interacciones no-DLVO.

Hay una serie de fenómenos, relacionados con la estabilidad coloidal, que no se pueden explicar sólo mediante la interacción electrostática entre dobles capas eléctricas y las fuerzas de van der Waals. Así, por ejemplo, el hinchamiento espontáneo de arcillas secas cuando están en contacto con agua (168). Tampoco se explica por qué las dispersiones de sílice no coagulan en el punto isoeléctrico en el seno de disoluciones salinas concentradas (169). En nuestro grupo de investigación se han encontrado comportamientos similares en suspensiones ZnS (170) o de látex de etilcelulosa (171), y en general aparecen en la bibliografía numerosas observaciones de esta naturaleza en los últimos años (172, 173).

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

A diferencia de las teorías sobre las fuerzas de van der Waals y de interacción entre dobles capas, que son teorías del continuo basadas en las propiedades macroscópicas del medio líquido (por ejemplo, su constante dieléctrica, densidad o índice de refracción), las fuerzas no-DLVO actúan a pequeñas distancias de la interfase, y los valores de estas magnitudes son

diferentes de los que adquieren en el seno del líquido. Por tanto, el potencial de interacción entre moléculas situadas a esas distancias, puede ser muy distinto del esperado en teorías del continuo [así, la densidad en el caso de los líquidos contenidos entre dos paredes muy próximas entre sí es oscilatoria, con una periodicidad del orden de magnitud del tamaño molecular (165)].

Si consideramos un modelo líquido formado por moléculas esféricas, su solvatación (o estructuración) en torno a una molécula de soluto o incluso del propio disolvente vendrá determinada, principalmente, por la geometría de las moléculas y su capacidad de empaquetamiento. Cuando las interfases presentes son líquido-líquido o sólido-líquido, se presentan claras oscilaciones de densidad, pero en el caso de una interfase líquido-vapor, tales oscilaciones no existen, como ha demostrado Israelachvili (165).

Si se trata de dos interfases separadas una distancia determinada, el efecto es aún más notable. Sólo con consideraciones geométricas, sin tener en cuenta interacciones atractivas entre las moléculas de disolvente y las paredes, las moléculas se ven forzadas a acomodarse entre las dos superficies, siguiendo un cierto ordenamiento, que origina la fuerza oscilatoria de solvatación. Este comportamiento ha sido estudiado en los trabajos del grupo de Israelachvili (174-176).

La situación es mucho más compleja en los sistemas físicos reales, pues las moléculas de líquido no son esféricas; interaccionan mediante potenciales anisótropos y, además, las interfases no son estrictamente lisas (desde un punto de vista atómico). En el caso de existir interacción atractiva entre la superficie y las moléculas de líquido adyacentes, el empaquetamiento molecular descrito será más denso, y la fuerza resultante entre las fases sólidas, aunque oscilatoria, tiene una componente repulsiva de largo alcance. Si, por el contrario, la interacción superficie-líquido es más débil que la interacción líquido-líquido, la fuerza de solvatación oscilatoria tiene una componente monótona atractiva.

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

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

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

a) Tensión superficial.

Para poder predecir el valor que adquieren las interacciones ya descritas en este capítulo [Lifshitz-van der Waals (LW) y ácido-base (AB)] es necesario hacer previamente una caracterización termodinámica de la superficie. Para ello, consideraremos el proceso reversible de acercar dos sistemas físicos en el vacío, formados por un sólido o líquido, 1 , hasta formar una fase continua (entran en contacto superficies iguales unitarias) (177). Se denomina *energía libre de cohesión* ($\Delta G_{C,1}$) a la variación de energía libre que tiene lugar en el proceso, y *trabajo de cohesión* al opuesto de esta magnitud; a partir de ella podremos definir la tensión superficial (o energía libre superficial) del material 1 (γ) de la forma:

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

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

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

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

conocida como ecuación de Dupré (178).

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

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

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

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

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

La energía libre interfacial está relacionada con las fuerzas de interacción que las superficies de las fases 1 y 2 se ejercen entre sí (cohesión) o con la otra fase (adhesión). La caracterización

termodinámica superficial de nuestros sistemas físicos, nos permitirá determinar los valores de energía libre superficial e interfacial y, a partir de ellos, evaluar la naturaleza y alcance de las interacciones de origen no electrostático en la interfase.

b) Modelo de van Oss, Good y Chaudhury.

Las investigaciones más recientes acerca de la tensión superficial y sus componentes, han sido realizadas por van Oss (179, 180), van Oss y Good (181), van Oss y cols. (155, 182-185). La ecuación que constituye la base para el desarrollo de su modelo es la que expresa la tensión superficial total de cualquier fase, como suma de dos contribuciones o componentes, que son las asociadas a interacciones Lifshitz-van der Waals (LW) y ácido-base (AB):

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

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

La Ec. 53 se puede hacer extensiva a la energía libre de la interfase 1/2:

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

A continuación, se expresará matemáticamente cada uno de los dos sumandos de la tensión superficial de la Ec. 54. Utilizando la regla de Good-Girifalco (159, 186), el primer término γ_{12}^{LW} queda de la forma:

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

3. Síntesis y estudio de un sistema transportador de fármaco.

La obtención del segundo sumando (γ_{12}^{AB}) no puede hacerse mediante la regla anterior, pues como ya indicó Fowkes (180) no es aplicable a las interacciones AB, que son esencialmente asimétricas. Se postula entonces (y esta es la contribución esencial de estos autores) la siguiente regla de combinación para la componente AB de la tensión interfacial:

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

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

$$\gamma_1^{AB} = 2\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_1^-} \quad (57)$$

Sustituyendo la Ec. 57 en la Ec. 53:

$$\gamma_1 = \gamma_1^{LW} + 2\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_1^-} \quad (58)$$

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

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

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

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

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

Ambas interacciones LW y AB entre dos cuerpos idénticos o entre dos diferentes en el vacío, son siempre atractivas. No obstante, cuando están inmersos en un líquido, puede surgir una interacción repulsiva. Con respecto a la interacción LW , solamente aquella que tiene lugar entre dos materiales diferentes 1 y 3, inmersos en un líquido 2, puede ser repulsiva (160, 187-189), siempre que la componente apolar del líquido (γ_2^{LW}), cumpla: $\gamma_1^{LW} < \gamma_2^{LW} < \gamma_3^{LW}$ (184, 190).

En cuanto a la componente AB , la interacción neta entre dos cuerpos polares en un medio líquido puede ser repulsiva, siempre y cuando los dos cuerpos sean del mismo material (180) y se verifique que los valores de γ^+ y γ^- del líquido estén comprendidos entre los valores de γ^+ y γ^- del material polar.

El punto importante que queremos resaltar por su significación en la determinación de la energía total de interacción entre dos partículas coloidales, es que el conocimiento de γ_1^{LW} y γ_i^\pm para las fases implicadas permite calcular dicha energía. En efecto, la energía libre de interacción (por unidad de superficie) entre dos partículas de material 1 inmersas en la fase 2 será:

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

Nótese que un valor positivo de ΔG_{121} implicaría una repulsión neta entre las superficies (*presión de hidratación* o interacción *hidrófila*). Teniendo en cuenta que ΔG_{121}^{LW} es siempre negativo, el carácter atractivo o repulsivo de la interacción, representado por el valor de ΔG_{121} , dependerá

de la contribución ácido-base ΔG_{121}^{AB} . En medio acuoso, la componente AB de la energía de cohesión del agua, debido a sus enlaces por puentes de hidrógeno es 102 mJ/m^2 , valor lo suficientemente elevado como para imponer un efecto atractivo neto entre superficies de partículas apolares o débilmente polares (efecto *hidrófobo*).

En otras ocasiones, como sucede en especial con las superficies *monopolares* (184) ($\gamma = \gamma^LW$; $\gamma^{AB} = 0$, usualmente $\gamma^* = 0$ y $\gamma \neq 0$), el elevado valor del carácter básico de estas superficies las hace muy *hidrófilas*, existiendo fuertes interacciones repulsivas (*presión de hidratación*), por la presencia del factor $(\gamma^- \gamma^{2+})^{1/2}$, y por tanto se verifica que $|\Delta G_{121}^{AB}| > |\Delta G_{121}^{LW}|$.

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

3.5.3. Metodología experimental.

La tensión superficial de un líquido y la tensión interfacial entre dos líquidos son dos magnitudes a las que se puede tener acceso experimental de forma directa. Sin embargo, en el caso de los sólidos, es necesario recurrir a medidas de otras magnitudes para poder obtener a partir de ellas los valores de las tensiones superficiales. Junto con la técnica de penetración de líquidos en capa fina, la técnica de medida de ángulos de contacto es la más importante y habitual. Ambas han sido descritas con detalle en trabajos anteriores (170, 191, 192). Sin embargo, nos centraremos en una breve descripción de la técnica de medida de

ángulos de contacto, ya que es la que hemos utilizado en nuestra investigación.

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

La definición termodinámica del ángulo de contacto viene dada por la ecuación de Young. Para una superficie sólida, de las características mencionadas, sobre la que se deposita una gota de líquido puro, el ángulo de contacto de equilibrio es una magnitud única (193) que cumple la ecuación de Young:

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

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

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

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

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

esto es, la presión bidimensional que ejerce el vapor adsorbido sobre la superficie sólida. En el caso de que γ_S sea superior a γ_L , esta adsorción provoca una disminución de la tensión superficial del sólido, hasta

alcanzar, en caso de saturación, el valor de la tensión superficial del líquido (194, 195).

Bajo estas condiciones límite, $\pi_e = \gamma_s - \gamma_l$ (196). En el caso contrario, que corresponde generalmente a sólidos de poca energía superficial, como los utilizados en este trabajo, π_e es despreciable y la ecuación de Young se puede escribir:

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

Un factor importante a considerar, en las medidas de ángulo de contacto, es el fenómeno de histéresis. Cuando una gota de líquido se deposita sobre la superficie de un sólido, se puede producir (dependiendo del método utilizado) un avance (la gota se deposita sobre una superficie seca) o una regresión (una vez depositada la gota, se retrae, desplazándose sobre zonas ya mojadas) de la gota, siendo los respectivos ángulos de contacto θ_a (avance) y θ (retroceso). Se verifica que θ es siempre inferior a θ_a . Este fenómeno puede dificultar la estimación del verdadero ángulo de contacto, pues existe una gran dependencia entre la amplitud de la histéresis y el volumen de la gota utilizado. Este efecto se puede minimizar disminuyendo el volumen de la gota de líquido. Nuestras medidas experimentales se han realizado sobre el ángulo de avance.

Good (197), justifica el fenómeno de la histéresis como una consecuencia de las heterogeneidades de la superficie (los ángulos de avance supondrían una interacción preferente del líquido con las zonas de menor energía superficial y viceversa). No obstante, un trabajo más reciente (198) explica los valores de los ángulos de retroceso como consecuencia de la disminución de la energía superficial del sólido, causada por la presión superficial asociada a la adsorción del vapor del líquido utilizado.

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

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

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

El análisis termodinámico superficial se ha efectuado en los tres tipos de partículas sintetizadas: núcleo magnético (hierro carbonilo), recubrimiento polimérico (polibutilcianoacrilato) y partículas compuestas. Los líquidos empleados son: agua doblemente destilada y desionizada de calidad Milli-Q (Milli-Q Academic, Millipore, Francia), formamida (Carlo Erba, Italia) y diiodometano (Merck, Alemania). En la aplicación del modelo de van Oss, se utilizaron los datos bibliográficos recogidos en la Tabla 4, donde se especifican los valores de las componentes de la tensión superficial de los líquidos de prueba utilizados (181).

Tabla 4. Componentes de la tensión superficial de los líquidos utilizados en el experimento de medida del ángulo de contacto en mJ/m^2 y a 20°C (181).

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

La medida de los ángulos de contacto se ha realizado mediante un telegoniómetro Ramé-Hart 100-0.7-00 (USA), que permite observar las gotas de líquido depositadas sobre un sólido. Este aparato dispone de un conjunto de

tornillos micrométricos que permiten los desplazamientos verticales y horizontales del sustrato, así como de un limbo graduado para la medida del ángulo con una precisión de $\pm 1^\circ$. El uso de una microjeringa Gilson permite controlar el volumen de la gota depositada entre 2 y 4 μL .

La superficie del sólido a estudiar se obtuvo por compresión del material seco en una prensa hidráulica Spepac a una presión fijada de 148 MPa durante 5 minutos. Los comprimidos obtenidos presentaron un radio de 1.3 cm.

3.5.4. Resultados y discusión.

3.5.4.1. Componentes de la energía libre superficial.

Los componentes de la energía libre superficial (γ_s^{LW} , γ_s^+ , γ_s^-) de los tres tipos de partículas constituyen un grupo de magnitudes físicas que pueden también ser analizadas para discernir la eficiencia del recubrimiento con PBCA. Los resultados se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Ángulos de contacto (grados) de los líquidos utilizados en las determinaciones en comprimido con hierro carbonilo, polibutilacrilato (PBCA), y partículas compuestas obtenidas con diferentes proporciones de peso inicial monómero/hierro carbonilo.

Sólido	Agua	Diiodometano	Formamida
Hierro carbonilo	27.1 ± 1.7	17.2 ± 0.7	21.5 ± 1.9
PBCA	73.1 ± 1.8	43.6 ± 2.3	56.9 ± 2.4
PBCA/Fe ⁰ (4/1)	83 ± 3	46 ± 3	58 ± 4
PBCA/Fe ⁰ (4/2)	84 ± 3	47.9 ± 2.9	57 ± 3
PBCA/Fe ⁰ (4/3)	80.3 ± 2.2	44.2 ± 1.8	58.0 ± 2.3

Estos datos de ángulo de contacto ya denotan que existen diferencias significativas entre los tres tipos de partículas. Pero es la evaluación de las componentes γ_s , recogidos en la Tabla 6, la que proporciona una información física vez sobre las propiedades termodinámicas de los tres tipos de superficies.

Tabla 6. Componentes de la energía libre superficial del hierro carbonilo, del PBCA y de las partículas compuestas obtenidas con diferentes proporciones de peso inicial monómero/hierro carbonilo. γ_S^{LW} es la componente Lifshitz-van der Waals; γ_S^+ (γ_S^-) es la componente electrón-aceptor (electrón-donante). Todos los valores están expresados en mJ/m².

Sólido	γ_S^{LW}	γ_S^+	γ_S^-
Hierro carbonilo	48.5 ± 0.2	0.12 ± 0.02	46.8 ± 0.7
PBCA	37.7 ± 1.2	0.04 ± 0.02	11.7 ± 0.6
PBCA/Fe ⁰ (4/1)	36.6 ± 1.5	0.29 ± 0.14	4.0 ± 0.5
PBCA/Fe ⁰ (4/2)	35.4 ± 1.6	0.64 ± 0.09	2.7 ± 0.6
PBCA/Fe ⁰ (4/3)	37.4 ± 1.0	0.17 ± 0.04	5.5 ± 0.7

Esta Tabla confirma en gran medida nuestras estimaciones basadas en las propiedades electroforéticas: en concreto, para cualquiera de las componentes consideradas, los valores obtenidos para las partículas compuestas son similares a los del polímero; excepto en el caso de la componente aceptor de electrones, γ_S^+ , la cual manifiesta valores pequeños en los tres casos. Así, aunque la componente de Lifshitz-Van der Waals es la menos afectada (como usualmente es el caso; Ref. 199), su valor para las partículas mixtas es casi el mismo que para el polímero de cianoacrilato. La contribución electrón-donante, γ_S^- , muestra un valor elevado para el hierro carbonilo, a diferencia de los otros dos tipos de materiales (como en muchos otros óxidos inorgánicos, p.e. hematita, yttria y magnetita, ver Refs. 104, 199; recordemos la existencia de una delgada capa superficial en el hierro carbonilo, ya comentada), el cuál es esencialmente un material monopolar electrón-donante, en el sentido dado al término por van Oss: puede tener interacciones ácido-base con fases de cualquier polaridad (γ^+ , γ^- , ambas diferentes de cero) pero las fuerzas AB no contribuyen a su energía libre de cohesión. Esto es, en esencia, similar a lo que otros autores han obtenido para diferentes compuestos inorgánicos (170, 192, 200, 201). Es bastante general el comportamiento monopolar en los materiales inorgánicos, aunque Jancruk

y cols. (195, 196, 202) han encontrado un carácter bipolar en calconita y galena.

Por lo tanto, como en el caso de las propiedades electrocinéticas, este análisis termodinámico sugiere que el recubrimiento ha sido total, puesto que los componentes de γ_s para las partículas mixtas coinciden casi exactamente con los correspondientes al PBCA, independientemente de los pesos relativos iniciales del monómero y del hierro carbonilo utilizados en la síntesis.

3.5.4.2. Análisis de la naturaleza hidrófila/hidrófoba.

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

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

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

Haciendo uso de la Ec. 60, pueden obtenerse valores de ΔG_{121}^{LW} y ΔG_{121}^{AB} , que se muestran en la Tabla 7. En la misma, se puede apreciar que para el hierro carbonilo, el intercambio energético debido a la componente *LW* es bastante menor que el asociado a la componente *AB*, siendo además negativo. Por tanto, la variación de la energía libre de interacción total es debida, principalmente, a la componente *AB* (199).

Tabla 7. Energía libre de interacción entre las partículas y sus componentes *AB* y *LW* en medio acuoso.

Sólido	ΔG_{121}^{LW} (mJ/m ²)	ΔG_{121}^{AB} (mJ/m ²)	ΔG_{121} (mJ/m ²)
Hierro Carbonilo	-10.5 ± 0.3	34 ± 2	23 ± 1
PBCA	-4.3 ± 0.5	-32 ± 2	-36 ± 2
PBCA/Fe ⁰ (4/1)	-3.8 ± 0.8	-55 ± 5	-59 ± 5
PBCA/Fe ⁰ (4/2)	-3.3 ± 0.4	-58 ± 5	-61 ± 5
PBCA/Fe ⁰ (4/2)	-4.2 ± 0.3	-50 ± 4	-54 ± 4

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

Obviamente, estos cambios en la energía libre superficial se manifiestan en las características hidrófobas/hidrófilas de los diferentes materiales. De acuerdo con van Oss y cols. (180), puede utilizarse el siguiente criterio para determinar cuándo un material puede considerarse hidrófilo o hidrófobo.

3. Síntesis y estudio de un sistema transportador de fármaco.

Si ΔG_{121} resulta ser negativo, las interacciones interfaciales favorecen la atracción entre sí de las partículas, y se consideran hidrofóbicas. La hidrofilia corresponderá a valores positivos de ΔG_{SLS}^{TOT} . La Figura 22 muestra los resultados para las tres clases de materiales. Como puede apreciarse, la naturaleza hidrófila del hierro carbonilo se pierde, al ser recubierta por el polímero hidrófobo, una clara indicación de que dicho recubrimiento ha sido efectivo (94, 104).

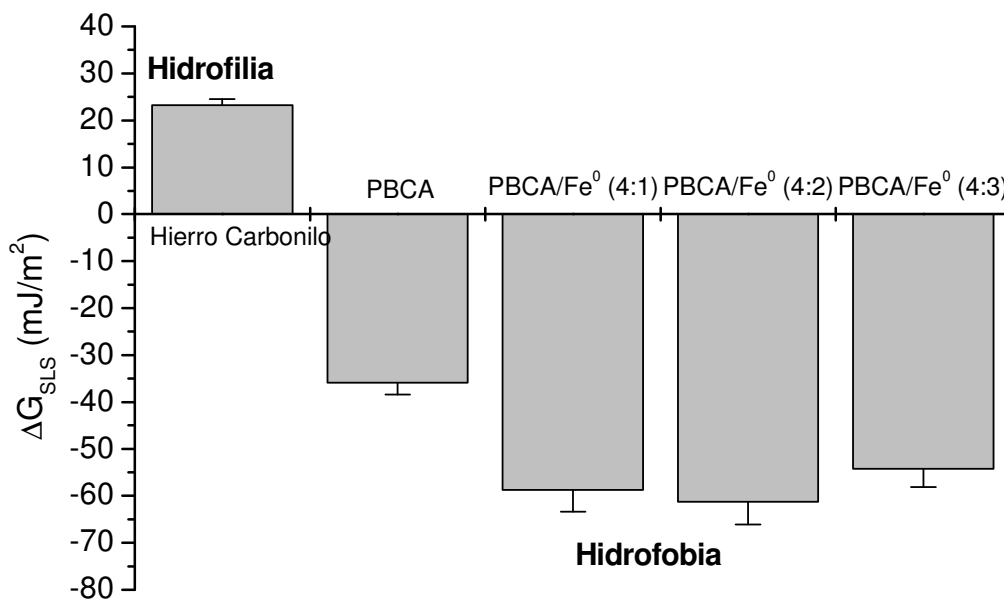


Figura 22. Valores de ΔG_{SLS} y balance hidrófilo/hidrófobo de los tres tipos de partículas: hierro carbonilo, polibutilcianoacrilato y partículas compuestas (de diferentes proporciones de peso inicial monómero/hierro carbonilo 4/3, 4/2 y 4/1).

3.6. MECANISMO DE FORMACIÓN DEL RECUBRIMIENTO POLIMÉRICO EN LAS PARTÍCULAS COMPUESTAS.

Disponiendo de toda la información descrita acerca de las características superficiales de los materiales estudiados, pueden darse algunos argumentos concernientes a los mecanismos mediante los que la capa de polímero se forma en la superficie del hierro carbonilo. En primer lugar, podemos hablar de una interacción electrostática netamente atractiva entre las partículas cargadas positivamente de hierro carbonilo (Figura 20; obsérvese que la reacción tiene lugar en condiciones ácidas, y estas corresponden a una carga superficial positiva) y los carbaniones cargados negativamente (generados por el ataque nucleofílico de los aniones OH^- al monómero). Esta atracción puede tender a concentrar a estos últimos en las inmediaciones de la superficie del hierro carbonilo. Además, pueden darse argumentos termodinámicos: mediante los datos de la Tabla 6, puede calcularse como sigue la energía libre de interacción entre el núcleo magnético (M) y el polímero (P) en medio acuoso (A), ΔG_{MAP} , utilizando la ecuación de Dupré (180):

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

donde las energías libres interfaciales pueden obtenerse mediante la Ec. (55) para cada par de interfases implicadas. El resultado del cálculo es $-4.8 \pm 0.7 \text{ mJ/m}^2$. Esto significa que las interacciones de van der Waals y las ácido-base entre el hierro carbonilo y el polímero son netamente atractivas. En otras palabras, es termodinámicamente favorable para el polímero permanecer en contacto con el hierro carbonilo antes que como entidad aislada en el agua (104).

4

CAPACIDAD DE TRANSPORTE Y LIBERACIÓN DE ANTINEOPLÁSICOS

4.1. INTRODUCCIÓN.

Para que un fármaco antineoplásico actúe es condición indispensable que acceda en concentración suficiente a todas las células sensibles a él. Si bien es cierto que estos fármacos pueden actuar mejor que otros métodos terapéuticos en determinadas situaciones (grupos de células no visibles por su tamaño, metástasis múltiples e infiltrados en lugares poco accesibles al bisturí o a las radiaciones), en otras pueden no hacerlo porque sus características farmacocinéticas se lo impiden, por desarrollarse resistencias celulares o porque la concentración eficaz sería tal que implicaría una grave toxicidad (90). La utilización de nanopartículas de polialquilcianoacrilato como vehículos de anticancerígenos ha recibido una especial atención en los últimos años. Los resultados más espectaculares en quimioterapia antineoplásica experimental se han logrado cuando el transportador es administrado dentro del compartimento donde las células cancerígenas están localizadas (203). Parece ser que el incremento de la acción de los citostáticos asociados a estas nanosferas se debe a un aumento de su captación por las células tumorales más que a su lenta liberación (204, 205).

En concreto, el uso de polialquilcianoacrilatos genera resultados terapéuticamente significativos en el tratamiento de cánceres de tipo resistente y no resistente, de un amplio rango de líneas celulares, ya que se alcanzan concentraciones adecuadas de principio activo en el tejido tumoral. Se ha sugerido que el citado incremento de la actividad terapéutica se debe a: *i*) la potenciación de la toxicidad de la droga; *ii*) la toxicidad inducida por la alta concentración de productos de degradación poliméricos que se genera en la membrana celular, la cuál induce la inhibición del crecimiento celular o la muerte celular; y *iii*) la reversión de los fenómenos de multiresistencia a fármacos, debida a la adsorción de nanopartículas cargadas en la superficie celular y a la formación, cuando tiene lugar la degradación polimérica, de pares iónicos fármaco-poli(ácido cianoacrílico), capaces de atravesar la

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

membrana celular sin ser reconocidos por la glicoproteína-P (53, 103, 206, 207); la interacción entre el principio activo y los productos de degradación poliméricos también aumenta el paso del fármaco a través de la barrera hematoencefálica (208). Además, las nanopartículas alcanzan el órgano diana de una manera relativamente sencilla, tras su inyección intratumoral o intraarterial en las arterias que nutren al tumor, ya que las nanoesferas son capaces de sufrir un proceso de extravasación a través de la barrera endotelial, debido al incremento en la permeabilidad de estos vasos sanguíneos en la zona tumoral (207, 208). La acción antitumoral se incrementa aún más si el fármaco antineoplásico se encuentra localizado no sólo en la superficie de las partículas, sino también en la red polimérica. Además, esta familia de polímeros ha demostrado una mayor eficacia que otros polímeros como el alginato, la poli(láctida) y la poli(láctida-co-glicolida) (53). Sin embargo, es discutida su eficacia *in vivo*. De hecho, cuando se administran por vía intravenosa son captadas por el hígado unos minutos después debido al proceso de opsonización (209).

La utilización de un sistema de liberación modificada constituido por un núcleo magnético (hierro carbonilo) y un recubrimiento polimérico biodegradable (polibutilcianoacrilato) podría permitir el transporte magnéticamente controlado de fármacos anticancerígenos de diversa naturaleza (como el 5-fluorouracilo o su profármaco el ftorafur) hasta el órgano diana de interés. De esta manera, a los principales beneficios derivados del uso de estos sistemas ya comentados (15, 210), se sumarían los derivados de la mejora de los problemas de estabilidad (cardiotoxicidad de los productos de degradación generados en el medio básico de los viales inyectables; Ref. 211) y de la concentración del 5-fluorouracilo y el ftorafur en el lugar diana (mejora del perfil farmacocinético: rápida metabolización, vida media muy corta; Ref. 90). También se solucionaría la posible aparición de resistencias, al localizarse el antineoplásico en elevada concentración en las inmediaciones de la célula cancerosa y facilitarse su acción por el efecto sinérgico de los productos de degradación poliméricos.

En el presente capítulo realizaremos, en primer lugar, un estudio de la absorbancia óptica de las disoluciones de 5-fluorouracilo y de ftorafur con el objetivo de determinar el coeficiente de absorción molar, mediante la preparación de una curva de calibrado que relacione la absorbancia con la concentración de fármaco, y de lograr la validación del método analítico espectrofotométrico. Realizaremos una justificación de la metodología de medida empleada en la determinación de la incorporación de fármaco en las partículas compuestas, la cual está basada en la aplicación de la extensión de la ley de Beer a mezclas de sustancias absorbentes. En la metodología de medida de la cantidad de fármaco vehiculizado por las partículas y liberado por éstas, tenemos en cuenta el efecto de los residuos de la síntesis y de los productos de degradación sobre la absorbancia de los sobrenadantes, ya que afectan considerablemente las determinaciones de fármaco en solución. Dos son los mecanismos identificados de incorporación de fármaco por las partículas mixtas: la absorción o englobamiento en la matriz polimérica (al añadirse el fármaco durante el proceso de formación de las nanosferas), y la adsorción superficial (tras la incubación de las nanopartículas en una solución de fármaco), detectable mediante determinaciones de la movilidad electroforética y medidas espectrofotométricas. Entre los factores que afectan a la vehiculización de 5-fluorouracilo y ftorafur por las partículas compuestas, el pH y la concentración de anticancerígeno son los más importantes. Además, debemos controlar la acidez del medio para evitar la formación de macroagregados poliméricos o precipitados sólidos. Las condiciones óptimas de vehiculización de fármaco fueron utilizadas para realizar los estudios de liberación in vitro de principio activo desde las partículas compuestas (a pH = 2 y 7.4), estudiándose la influencia en ésta del mecanismo de incorporación de fármaco por las partículas y la cantidad de fármaco vehiculizada. Se comprobó que la cinética de liberación de ambos principios activos está controlada por el pH del medio de liberación y la cantidad de fármaco vehiculizada.

4.2. DETERMINACIÓN ESPECTRAL DE LA ABSORCIÓN.

4.2.1. Fundamentos teóricos.

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

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

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

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

$$A_{total} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \epsilon_1 bc_1 + \epsilon_2 bc_2 + \dots + \epsilon_n bc_n \quad (69)$$

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

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

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

La absorción de radiación ultravioleta o visible resulta, generalmente, de la excitación de los electrones de enlace; como consecuencia, los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces de las especies

objeto de estudio. La espectroscopía de absorción molecular es, por tanto, válida para identificar grupos funcionales en una molécula. Más importantes, sin embargo, son las aplicaciones en la determinación cuantitativa de compuestos que contienen grupos absorbentes.

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

4.2.2. Absorbancia óptica de las disoluciones de 5-fluorouracilo y ftorafur.

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

Si bien la metodología seguida en la síntesis de las nanopartículas compuestas determina las condiciones de trabajo (el fármaco estará disuelto

en un medio de polimerización acuoso acidulado), un aspecto crucial previo es la clarificación de las condiciones de preparación y conservación de las disoluciones de 5-fluorouracilo. Este estudio se realizó prestando especial atención a las concentraciones de fármaco y el pH de las disoluciones utilizados. El 5-fluorouracilo (Sigma-Aldrich, Alemania) es un polvo cristalino blanco, inodoro, con un peso molecular de 130.08 g/mol y estable al aire. Su profármaco, ftorafur (Sigma-Aldrich, Alemania), es un polvo blanco, inodoro, con un peso molecular de 200.2 g/mol y estable al aire. El carácter fotosensible de las disoluciones de ambos fármacos (214), determina que deban prepararse con gran diligencia bajo las mínimas condiciones de iluminación posibles. Debe tenerse también en cuenta, ya que limita las condiciones de trabajo, el problema de estabilidad del 5-fluorouracilo a pH básico, que desemboca en la formación con el tiempo de fluoroacetaldehído y ácido fluoromalonaldehídico como productos de degradación. La metabolización in vivo del primero conduce a la formación del agente cardiotoxico fluoroacetato (211).

En nuestro estudio, el primer paso es preparar una curva de calibrado de ambos fármacos, a partir de una batería de disoluciones (concentraciones molares: 10^{-5} , $3 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$, $8.5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $1.5 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $2.5 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $3 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $7 \cdot 10^{-3}$ y 10^{-2}) con una concentración fijada 10^{-4} M de HCl, ya que esta es la concentración utilizada en la síntesis óptima de las partículas mixtas. De esta manera, determinaremos la longitud de onda de máxima absorbancia y se realizará el cálculo del coeficiente de absorción molar, fundamental en los estudios de incorporación y liberación in vitro de fármaco por las partículas compuestas. Transcurridas 24 horas desde su preparación, se procedió a la determinación del espectro de absorción ultravioleta-visible de cada una de ellas, realizando un barrido de longitudes de onda desde 1100 a 180 nm, con intervalos de 1.0 nm. Se utilizó como blanco en la calibración previa del aparato una disolución 10^{-4} M de HCl para eliminar las posibles interferencias en el espectro de los fármacos generadas por el medio de disolución.

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

Los resultados de este estudio, en el caso del 5-fluorouracilo, se recogen en la Fig. 23, donde sólo se observa señal por debajo de los 325 nm y se aprecia cómo la absorción aumenta al aumentar la concentración de fármaco en el medio. Son claros los dos picos en el espectro de las disoluciones de 5-fluorouracilo, si bien el único que presenta una longitud de máxima absorbancia invariable a diferentes concentraciones es el que aparece a 266 nm. Por lo tanto, descartamos el pico que se genera a menor longitud de onda y los espectros obtenidos a concentraciones superiores a $5 \cdot 10^{-4}$ M, ya que a partir de esta concentración es patente la tendencia de los dos picos a fundirse en uno, hecho que se produce a una concentración de $3 \cdot 10^{-3}$ M. Además, se aprecia un espectro irregular a estas altas concentraciones que hace imposible plantear cualquier tipo de medida, si no es mediante la realización de una adecuada dilución de la muestra, y la longitud de onda de máxima absorbancia decrece de forma muy acusada al aumentar la concentración, por lo que pierde validez en la determinación del coeficiente de absorción molar. Esta desviación manifiesta de la ley de Beer podría justificarse por el hecho de que aunque, normalmente, el efecto de las interacciones moleculares no es significativo para concentraciones inferiores a 10^{-2} M, el 5-fluorouracilo puede pertenecer al grupo de moléculas orgánicas donde aparecen algunas excepciones (105, 215).

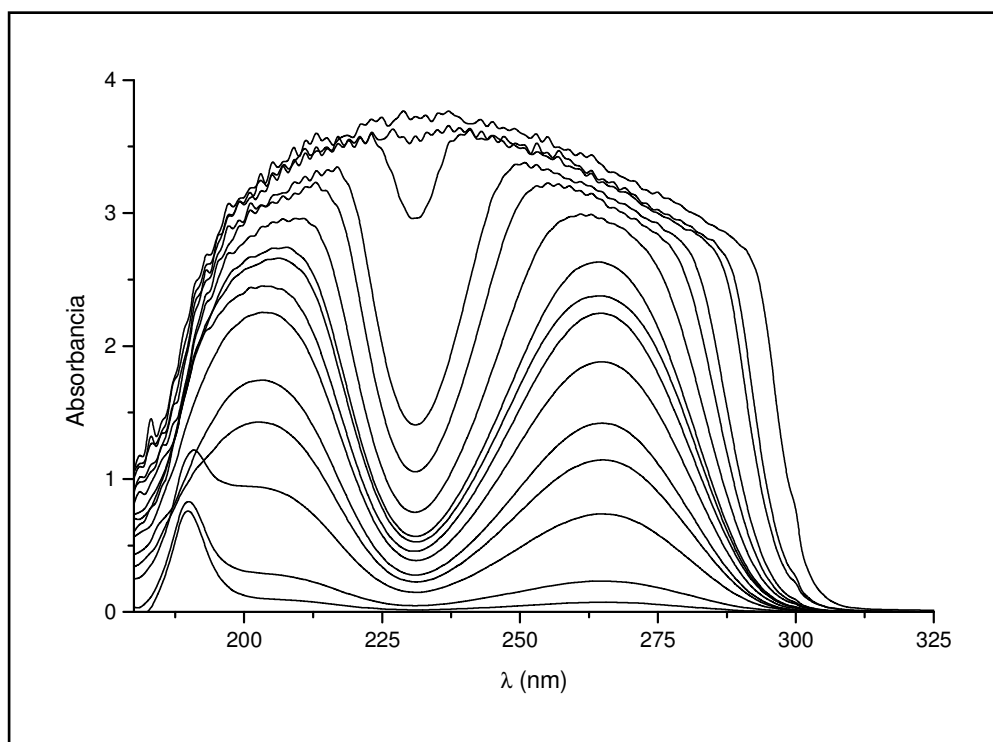


Fig. 23. Espectro de absorción UV-Vis de disoluciones de 5-fluorouracilo con una concentración 10^{-4} M de HCl. Las concentraciones molares de anticancerígeno en orden creciente de absorbancia son: 10^{-5} , $3 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$, $8.5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $1.5 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $2.5 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $3 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $7 \cdot 10^{-3}$ y 10^{-2} .

La determinación del coeficiente de absorción molar (ϵ) se realizó ajustando los datos de absorbancia y concentración mediante el método de los mínimos cuadrados. El resultado obtenido fue $\epsilon = 7330 \pm 90 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. En la Fig. 24 se muestran los datos y la recta de ajuste. Es destacable cómo los valores de absorbancia a diferentes concentraciones, obtenidos para la longitud de onda de máxima absorbancia cumplen la ley de Beer.

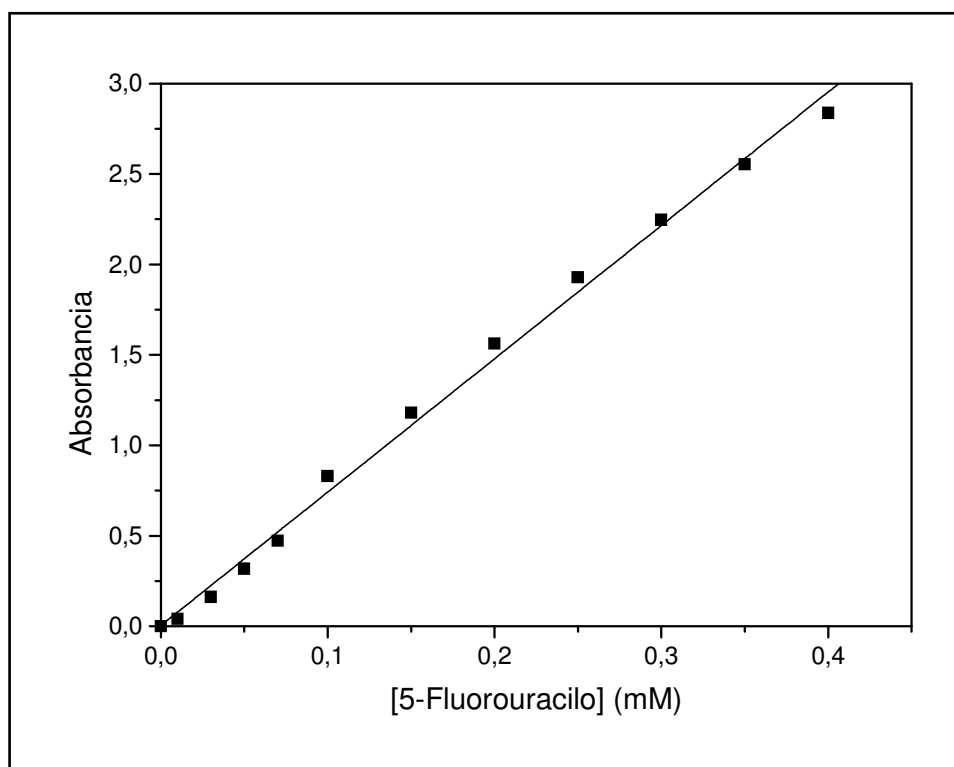


Fig 24. Determinación del coeficiente de absorción molar de las disoluciones de 5-fluorouracilo para la longitud de onda de máxima absorbancia (266 nm).

La pérdida de la linealidad absorbancia-concentración se produce cuando los picos del espectro tienden a fusionarse en uno, a concentraciones de 5-fluorouracilo superiores a $5 \cdot 10^{-4}$ M. A estas elevadas concentraciones, se hace preciso realizar una adecuada dilución de las muestras para poder realizar las estimaciones de absorción, adsorción y liberación *in vitro*.

En cuanto a los resultados obtenidos para el ftorafur, en la Fig. 25 se pueden observar los espectros de absorción de las diferentes soluciones de Ftorafur, los cuáles sólo se aprecian a longitudes de onda inferiores a ~ 320 nm. A pesar de que el espectro está constituido por 2 picos, sólo el que aparece a 271 nm permanece estable a esta longitud de onda en un amplio margen de concentraciones (hasta $\sim 3 \cdot 10^{-4}$ M), y será el que utilizemos en nuestro estudio; además, este pico se deforma y tiende a desaparecer, fusionándose con el pico de menor longitud de onda, a concentraciones superiores a 0.3 mM. No podemos dar una explicación clara sobre el origen de estas deformaciones, si

bien se han descrito desviaciones de la ley de Beer a concentraciones inferiores a 10^{-2} M (105, 215).

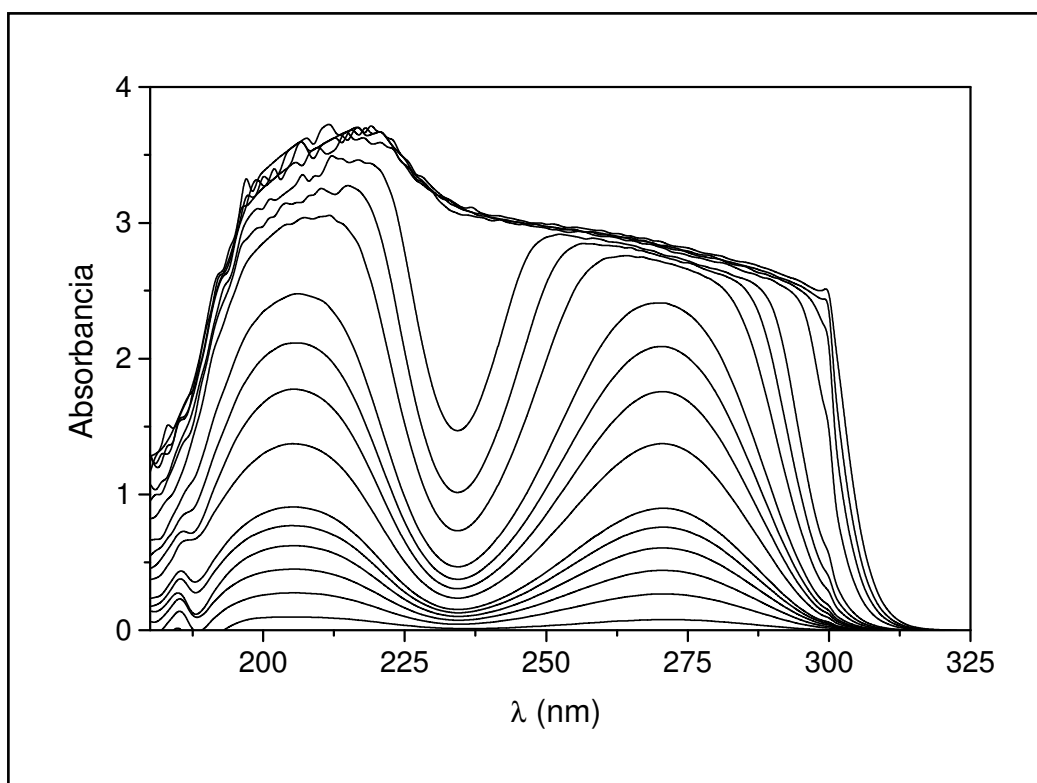


Fig.25. Espectro de absorción UV-Vis de disoluciones de fluorouracil con una concentración 10^{-4} M de HCl. Las concentraciones molares de anticancerígeno en orden creciente de absorbancia son: 10^{-5} , $3 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$, $8,5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $1,5 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$, $2,5 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $3 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $7 \cdot 10^{-3}$ y 10^{-2} .

La determinación del coeficiente de absorción molar (ϵ) se realizó ajustando los datos de absorbancia y concentración, correspondientes a concentraciones inferiores a $3 \cdot 10^{-4}$ M, mediante el método de los mínimos cuadrados. El resultado obtenido fue $\epsilon = 8070 \pm 140 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. En la Fig. 26 se muestran los datos y la recta de ajuste. Es destacable cómo los valores de absorbancia a diferentes concentraciones, obtenidos para la longitud de onda de máxima absorción cumplen la ley de Beer.

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

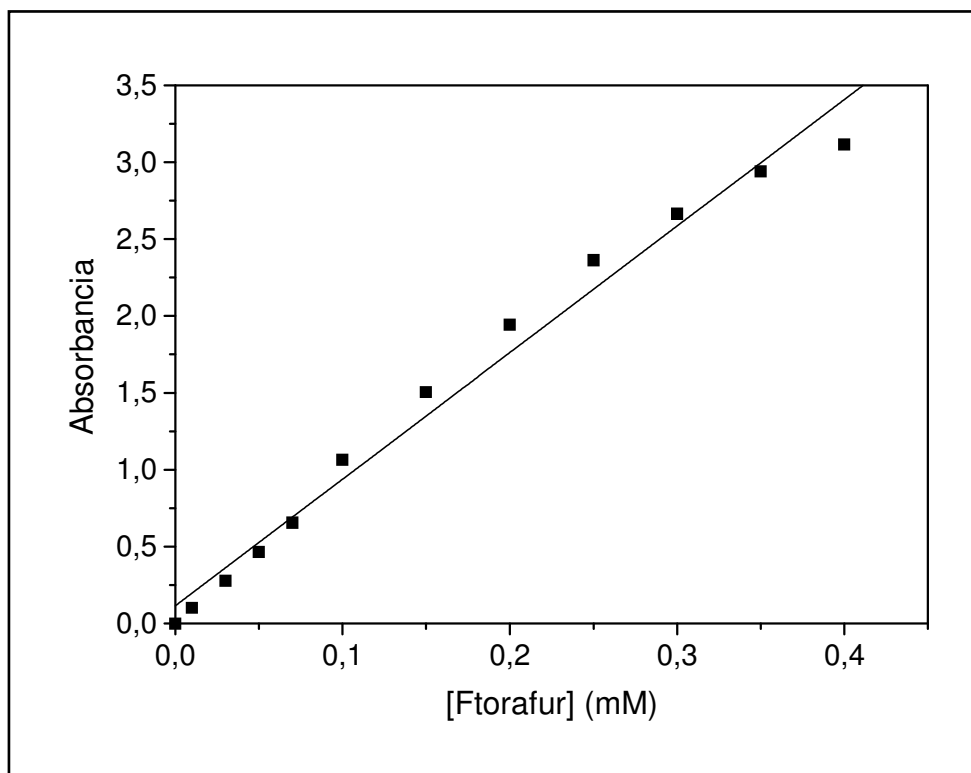


Fig. 26. Determinación del coeficiente de absorción molar de las disoluciones de ftorafur para la longitud de onda de máxima absorción (271 nm).

La pérdida de la linealidad absorbancia-concentración se produce cuando los picos del espectro tienden a fusionarse en uno, a concentraciones de Ftorafur superiores a $3 \cdot 10^{-4}$ M. A partir de esta concentración, se hace preciso realizar una adecuada dilución de las muestras para poder hacer las estimaciones de absorción, adsorción y liberación *in vitro*.

Por otro lado, se observó que en las disoluciones de 5-fluorouracilo y de Ftorafur con una concentración superior a 0.1 M se formaban cristales en las primeras 24 horas. Este hecho ha sido descrito previamente para concentraciones altas de 5-fluorouracilo (105, 216). De esta manera, decidimos no realizar ningún ensayo utilizando concentraciones superiores a 0.01 M.

Con el objetivo de estudiar el espectro de ambos fármacos en la amplia gama de pH ácidos que se utilizarán en los ensayos de absorción, y en el pH utilizado en los estudios de liberación *in vitro* (pH = 7.4), investigamos la influencia de la concentración de H^+ y del tampón $NaOH^-$

KH_2PO_4 de pH = 7.4 en las propiedades de absorbancia óptica de las disoluciones de 5-fluorouracilo y ftorafur. Preparamos para ello, una batería de soluciones de ftorafur 10^{-4} M con concentraciones crecientes de HCl, para obtener un rango de pH entre 1 y 5, y con un pH = 7.4, fijado con el tampón NaOH- KH_2PO_4 preparado. Tras 24 horas, se determinó el espectro de absorción según la metodología previamente descrita. El análisis de los espectros obtenidos, sirvió para comprobar la estabilidad de las soluciones de ftorafur y de 5-fluorouracilo en todos los pH investigados, y la independencia del coeficiente de absorción molar con respecto a los pH estudiados.

4.2.3. Validación del método espectrofotométrico.

El método espectrofotométrico utilizado para el análisis de la cantidad de fármaco vehiculizado o liberado por las partículas compuestas, fue previamente validado, verificando su exactitud, precisión y linealidad (217). Como las soluciones de 5-fluorouracilo y de ftorafur son estables en todo el margen de pH investigados y se ha demostrado la validez de sus respectivos coeficientes de absorción molar para todos estos valores de pH, se prepararon 6 réplicas de soluciones estándar de cada uno de los fármacos, de concentración entre 10^{-5} y 10^{-2} M, en presencia de HCl 10^{-4} N o tampón NaOH- KH_2PO_4 de pH = 7.4. Las concentraciones de fármaco por encima de $3 \cdot 10^{-4}$ M fueron adecuadamente diluidas, al igual que se hace en los experimentos de absorción, adsorción y liberación, con el objetivo de poder trabajar en el rango de linealidad absorbancia-concentración de fármaco.

En la Tabla 8 se recogen los valores de absorbancia de las soluciones de 5-fluorouracilo en función de su concentración. Mostramos los valores medios de absorbancia y las desviaciones estándar (D.E.) para cada una de las concentraciones, así como el coeficiente de variación (C.V.). Los valores bajos de los coeficientes de variación (< 5 %, en todos

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

los casos) indica la adecuada precisión del método. La linealidad de la relación absorbancia (A)-concentración molar (C) es adecuada [$A = (0.02 \pm 0.02) + (7330 \pm 90) \cdot C$], con un coeficiente de correlación $r = 0.999$. El ajuste lineal es estadísticamente significativo, con una probabilidad superior al 99.9 %.

Tabla 8. Absorbancia (media \pm D.E.) de las soluciones de 5-fluorouracilo para cada una de las concentraciones indicadas, en presencia de HCl 10^{-4} N. Las concentraciones por encima de $5 \cdot 10^{-4}$ M fueron adecuadamente diluidas hasta 10^{-4} M, antes de realizar la medida. El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio.

Concentración (M)	Absorbancia	C.V. (%)
10^{-5}	0.0758 ± 0.0016	2.07
$3 \cdot 10^{-5}$	0.224 ± 0.001	0.29
$5 \cdot 10^{-5}$	0.371 ± 0.007	1.99
$7 \cdot 10^{-5}$	0.493 ± 0.013	2.61
10^{-4}	0.771 ± 0.015	1.91
$1.5 \cdot 10^{-4}$	1.141 ± 0.041	3.53
$2 \cdot 10^{-4}$	1.547 ± 0.035	2.24
$2.5 \cdot 10^{-4}$	1.898 ± 0.015	0.78
$3 \cdot 10^{-4}$	2.247 ± 0.015	0.66
$5 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.749 ± 0.006	0.77
10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.773 ± 0.004	0.57
$5 \cdot 10^{-3}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.771 ± 0.016	2.09
10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.741 ± 0.025	3.36

Con el propósito de comprobar la exactitud del método analítico, utilizamos los datos de absorbancia de las concentraciones de la Tabla 8 ("concentración actual" en la Tabla 9), para obtener las concentraciones estimadas para cada una de las 6 réplicas. Las concentraciones medias y sus D.E. quedan recogidas en la Tabla 2 como "estimadas". Como antes, los bajos valores de los C.V. y sus errores relativos son una clara indicación de la exactitud del método espectrofotométrico.

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

Tabla 9. Comparación de las concentraciones "actuales" de 5-fluorouracilo en solución con las concentraciones "estimadas" deducidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas. Las concentraciones por encima de $5 \cdot 10^{-4}$ M fueron diluidas hasta 10^{-4} M, antes de realizar la medida. Los valores "estimados" son la media (\pm D.E.) de las 6 réplicas experimentales. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente $[(\text{estimado} - \text{actual})/\text{estimado}]$, también se muestran los C.V.

Actual (M)	Estimada (M)	Error relativo (%)	C.V. (%)
10^{-5}	$(10.28 \pm 0.21) \cdot 10^{-6}$	2.72	2.09
$3 \cdot 10^{-5}$	$(3.04 \pm 0.01) \cdot 10^{-5}$	1.28	0.28
$5 \cdot 10^{-5}$	$(5.02 \pm 0.11) \cdot 10^{-5}$	0.42	1.99
$7 \cdot 10^{-5}$	$(6.69 \pm 0.17) \cdot 10^{-5}$	4.61	2.61
10^{-4}	$(1.045 \pm 0.017) \cdot 10^{-4}$	4.31	1.67
$1.5 \cdot 10^{-4}$	$(1.55 \pm 0.055) \cdot 10^{-4}$	3.11	3.56
$2 \cdot 10^{-4}$	$(2.09 \pm 0.05) \cdot 10^{-4}$	4.72	2.25
$2.5 \cdot 10^{-4}$	$(2.58 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	2.91	0.78
$3 \cdot 10^{-4}$	$(3.05 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	1.58	0.66
$5 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.02 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	1.58	0.77
10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.05 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	4.58	0.59
$5 \cdot 10^{-3}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.045 \pm 0.023) \cdot 10^{-4}$	4.31	2.13
10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.01 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$	0.59	3.33

Con respecto al fluorouracilo, en la Tabla 10 se recogen los valores de absorbancia de sus disoluciones en función de la concentración. Para cada una de las concentraciones, mostramos los valores medios de absorbancia y las desviaciones estándar (D.E.), así como el coeficiente de variación (C.V.). Los valores bajos de estos coeficientes ($< 5\%$, en todos los casos) indican la adecuada precisión del método. La linealidad de la relación absorbancia (A)-concentración molar (C) es adecuada $[A = (0.03 \pm 0.03) + (8070 \pm 140) \cdot C]$, con un coeficiente de correlación $r = 0.999$. El ajuste lineal es estadísticamente significativo, con una probabilidad superior al 99.9 %.

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

Tabla 10. Absorbancia (media \pm D.E.) de las disoluciones de ftorafur para cada una de las concentraciones indicadas, en presencia de HCl 10^{-4} N. Las concentraciones por encima de $5 \cdot 10^{-4}$ M fueron adecuadamente diluidas hasta 10^{-4} M, antes de medir. El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio.

Concentración (M)	Absorbancia	C.V. (%)
10^{-5}	0.0819 ± 0.0016	1.95
$3 \cdot 10^{-5}$	0.2588 ± 0.0021	0.81
$5 \cdot 10^{-5}$	0.422 ± 0.003	0.81
$7 \cdot 10^{-5}$	0.591 ± 0.006	1.07
10^{-4}	0.867 ± 0.008	0.96
$1.5 \cdot 10^{-4}$	1.286 ± 0.012	0.92
$2 \cdot 10^{-4}$	1.723 ± 0.022	1.25
$2.5 \cdot 10^{-4}$	2.06 ± 0.04	1.80
$3 \cdot 10^{-4}$	2.46 ± 0.03	1.14
$5 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.862 ± 0.010	1.18
10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.866 ± 0.021	2.41
$5 \cdot 10^{-3}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.861 ± 0.010	1.21
10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.857 ± 0.024	2.86

Para comprobar la exactitud del método analítico, utilizamos los datos de absorbancia de las concentraciones de la Tabla 10 ("concentración actual" en la Tabla 11), para obtener las concentraciones estimadas para cada una de las 6 réplicas. En la Tabla 11 recogemos las concentraciones medias y sus D.E. como "estimadas". Como antes, los bajos valores de los C.V. y sus errores relativos son una clara indicación de la exactitud del método espectrofotométrico.

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

Tabla 11. Comparación de las concentraciones "actuales" de ftorafur con las concentraciones "estimadas" deducidas a partir de las medidas espectrofotométricas. Las concentraciones por encima de $5 \cdot 10^{-4}$ M fueron adecuadamente diluidas hasta 10^{-4} M, antes de medir. Los valores "estimados" son la media (\pm D.E.) de las 6 réplicas. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente $[(\text{estimado} - \text{actual})/\text{estimado}]$, también se muestran los C.V.

Actual (M)	Estimada (M)	Error relativo (%)	C.V. (%)
10^{-5}	$(9.95 \pm 0.20) \cdot 10^{-6}$	0.50	1.99
$3 \cdot 10^{-5}$	$(3.14 \pm 0.03) \cdot 10^{-5}$	4.44	0.98
$5 \cdot 10^{-5}$	$(5.13 \pm 0.04) \cdot 10^{-5}$	2.53	0.76
$7 \cdot 10^{-5}$	$(7.18 \pm 0.08) \cdot 10^{-5}$	2.51	1.12
10^{-4}	$(1.050 \pm 0.014) \cdot 10^{-4}$	4.76	1.35
$1.5 \cdot 10^{-4}$	$(1.562 \pm 0.017) \cdot 10^{-4}$	3.85	1.08
$2 \cdot 10^{-4}$	$(2.09 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$	4.31	1.44
$2.5 \cdot 10^{-4}$	$(2.51 \pm 0.04) \cdot 10^{-4}$	0.40	1.67
$3 \cdot 10^{-4}$	$(2.99 \pm 0.04) \cdot 10^{-4}$	0.33	1.34
$5 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.04 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	3.85	1.91
10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.05 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$	4.76	2.65
$5 \cdot 10^{-3}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.053 \pm 0.009) \cdot 10^{-4}$	4.76	0.91
10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.04 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$	3.85	3.06

En cuanto a las 6 réplicas preparadas a pH = 7.4 (NaOH-KH₂PO₄) que contenían una cantidad conocida de 5-fluorouracilo o ftorafur, se obtuvieron resultados similares, como mostramos a continuación, con lo que queda demostrada la exactitud, precisión y linealidad del método espectrofotométrico a este pH.

La Tabla 12 contiene los valores de absorbancia de las soluciones de 5-fluorouracilo en función de su concentración, los valores medios de absorbancia y las desviaciones estándar (D.E.) para cada una de las concentraciones, así como el coeficiente de variación (C.V.). En todos los casos, el coeficiente de variación tiene un valor < 5 %, lo que indica la adecuada precisión del método. La linealidad de la relación absorbancia (A)-concentración molar (C) es adecuada $[A = (0.01 \pm 0.01) + (7570 \pm 85) \cdot C]$, con un coeficiente de correlación $r = 0.999$. El ajuste lineal es estadísticamente significativo, con una probabilidad superior al 99.9 %.

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

Tabla 12. Absorbancia (media \pm D.E.) de las soluciones de 5-fluorouracilo para cada una de las concentraciones indicadas, en presencia tampón NaOH-KH₂PO₄ de pH = 7.4. Las concentraciones por encima de 5·10⁻⁴ M fueron adecuadamente diluidas hasta 10⁻⁴ M, antes de realizar la medida. El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio.

Concentración (M)	Absorbancia	C.V. (%)
10 ⁻⁵	0.0799 \pm 0.0012	1.51
3·10 ⁻⁵	0.235 \pm 0.001	0.43
5·10 ⁻⁵	0.362 \pm 0.008	2.21
7·10 ⁻⁵	0.524 \pm 0.013	2.48
10 ⁻⁴	0.762 \pm 0.015	1.97
1.5·10 ⁻⁴	1.132 \pm 0.031	2.74
2·10 ⁻⁴	1.539 \pm 0.031	2.74
2.5·10 ⁻⁴	1.893 \pm 0.011	0.58
3·10 ⁻⁴	2.236 \pm 0.018	0.81
5·10 ⁻⁴ (\rightarrow 10 ⁻⁴)	0.737 \pm 0.011	1.49
10 ⁻³ (\rightarrow 10 ⁻⁴)	0.756 \pm 0.007	0.93
5·10 ⁻³ (\rightarrow 10 ⁻⁴)	0.769 \pm 0.015	1.95
10 ⁻² (\rightarrow 10 ⁻⁴)	0.733 \pm 0.021	2.86

La exactitud del método analítico fue comprobada utilizando los datos de absorbancia de las concentraciones de la Tabla 12 ("concentración actual" en la Tabla 13), para obtener las concentraciones estimadas para cada una de las 6 réplicas. Las concentraciones medias y sus D.E. quedan recogidas en la Tabla 13 como "estimadas". Como antes, los bajos valores de los C.V. y sus errores relativos son una clara indicación de la exactitud del método espectrofotométrico.

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

Tabla 13. Comparación de las concentraciones "actuales" de 5-fluorouracilo en solución con las concentraciones "estimadas" deducidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas. Las concentraciones por encima de $5 \cdot 10^{-4}$ M fueron diluidas hasta 10^{-4} M, antes de realizar la medida. Los valores "estimados" son la media (\pm D.E.) de las 6 réplicas experimentales. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente $[(\text{estimado} - \text{actual})/\text{estimado}]$, también se muestran los C.V.

Actual (M)	Estimada (M)	Error relativo (%)	C.V. (%)
10^{-5}	$(1.06 \pm 0.05) \cdot 10^{-5}$	5.66	4.72
$3 \cdot 10^{-5}$	$(3.11 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	3.54	0.64
$5 \cdot 10^{-5}$	$(4.78 \pm 0.08) \cdot 10^{-5}$	4.59	1.67
$7 \cdot 10^{-5}$	$(6.92 \pm 0.12) \cdot 10^{-5}$	1.16	1.73
10^{-4}	$(1.01 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	0.99	1.98
$1.5 \cdot 10^{-4}$	$(1.49 \pm 0.06) \cdot 10^{-4}$	0.67	4.02
$2 \cdot 10^{-4}$	$(2.03 \pm 0.04) \cdot 10^{-4}$	1.48	1.98
$2.5 \cdot 10^{-4}$	$(2.51 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$	0.39	1.19
$3 \cdot 10^{-4}$	$(2.95 \pm 0.04) \cdot 10^{-4}$	1.69	1.36
$5 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(9.74 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	2.67	0.21
10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(9.99 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$	0.11	0.31
$5 \cdot 10^{-3}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.02 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	1.96	1.96
10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(9.68 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	3.31	0.11

En cuanto al ftorafur, la Tabla 14 recoge los valores de absorbancia de sus disoluciones en función de la concentración. Mostramos los valores medios de absorbancia y las desviaciones estándar (D.E.), así como el coeficiente de variación (C.V.), para cada una de las concentraciones. Los valores bajos de estos coeficientes (< 5 %, en todos los casos) indican la adecuada precisión del método. La linealidad de la relación absorbancia (A)-concentración molar (C) es adecuada $[A = (0.02 \pm 0.02) + (8205 \pm 105) \cdot C]$, con un coeficiente de correlación $r = 0.999$. El ajuste lineal es estadísticamente significativo, con una probabilidad superior al 99.9 %.

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

Tabla 147. Absorbancia (media \pm D.E.) de las disoluciones de Ftorafur para cada una de las concentraciones indicadas, en presencia tampón NaOH-KH₂PO₄ de pH = 7.4. Las concentraciones por encima de $5 \cdot 10^{-4}$ M fueron adecuadamente diluidas hasta 10^{-4} M, antes de medir. El C.V. se calculó mediante cociente entre la D.E. y el valor medio.

Concentración (M)	Absorbancia	C.V. (%)
10^{-5}	0.0849 ± 0.0011	1.29
$3 \cdot 10^{-5}$	0.253 ± 0.002	0.79
$5 \cdot 10^{-5}$	0.402 ± 0.004	0.99
$7 \cdot 10^{-5}$	0.584 ± 0.005	0.86
10^{-4}	0.861 ± 0.004	0.46
$1.5 \cdot 10^{-4}$	1.266 ± 0.011	0.87
$2 \cdot 10^{-4}$	1.713 ± 0.022	1.28
$2.5 \cdot 10^{-4}$	2.05 ± 0.03	1.46
$3 \cdot 10^{-4}$	2.44 ± 0.03	1.23
$5 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.865 ± 0.011	1.27
10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.859 ± 0.016	1.86
$5 \cdot 10^{-3}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.858 ± 0.009	1.05
10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.862 ± 0.019	2.21

La exactitud del método analítico fue estudiada utilizando los datos de absorbancia de las concentraciones de la Tabla 14 ("concentración actual" en la Tabla 15), para obtener las concentraciones estimadas para cada una de las 6 réplicas. En la Tabla 15 recogemos las concentraciones medias y sus D.E. como "estimadas". Como antes, los bajos valores de los C.V. y sus errores relativos son una clara indicación de la exactitud del método espectrofotométrico.

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

Tabla 15. Comparación de las concentraciones "actuales" de ftorafur con las concentraciones "estimadas" deducidas a partir de las medidas espectrofotométricas. Las concentraciones por encima de $5 \cdot 10^{-4}$ M fueron adecuadamente diluidas hasta 10^{-4} M, antes de medir. Los valores "estimados" son la media (\pm D.E.) de las 6 réplicas. Los errores relativos se calcularon mediante el cociente $[(\text{estimado} - \text{actual})/\text{estimado}]$, también se muestran los C.V.

Actual (M)	Estimada (M)	Error relativo (%)	C.V. (%)
10^{-5}	$(1.03 \pm 0.04) \cdot 10^{-5}$	2.91	3.88
$3 \cdot 10^{-5}$	$(3.08 \pm 0.02) \cdot 10^{-5}$	2.59	0.65
$5 \cdot 10^{-5}$	$(4.89 \pm 0.03) \cdot 10^{-5}$	2.25	0.61
$7 \cdot 10^{-5}$	$(7.12 \pm 0.07) \cdot 10^{-5}$	1.68	0.98
10^{-4}	$(1.05 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	4.76	0.95
$1.5 \cdot 10^{-4}$	$(1.54 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	2.59	1.29
$2 \cdot 10^{-4}$	$(2.09 \pm 0.05) \cdot 10^{-4}$	4.31	2.39
$2.5 \cdot 10^{-4}$	$(2.49 \pm 0.06) \cdot 10^{-4}$	0.41	2.41
$3 \cdot 10^{-4}$	$(2.97 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$	1.01	1.01
$5 \cdot 10^{-4}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.05 \pm 0.03) \cdot 10^{-4}$	4.76	2.86
10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.04 \pm 0.02) \cdot 10^{-4}$	3.85	1.92
$5 \cdot 10^{-3}$ ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.05 \pm 0.01) \cdot 10^{-4}$	4.76	0.95
10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.05 \pm 0.04) \cdot 10^{-4}$	4.76	3.81

4.2.4. Metodología de determinación de la incorporación de fármaco.

La determinación cuantitativa de la incorporación de los antineoplásicos ftorafur y 5-fluorouracilo por nuestro sistema transportador mixto, se encuentra limitada por las técnicas instrumentales que tenemos a nuestra disposición. La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) es la técnica más utilizada para la cuantificación de la incorporación y liberación de principios activos, incluidos estos dos antineoplásicos (218, 219). Sin embargo, no hemos tenido acceso a esta técnica para la realización de nuestro estudio. Por lo tanto, nos hemos basado en la metodología utilizada por otros autores para la cuantificación del fármaco vehiculizado y liberado por diferentes tipos de sistemas transportadores coloidales (220, 221). Esta metodología ha sido ampliamente estudiada y puesta a punto por nuestro grupo de investigación (105, 222, 223) y está basada en la aplicación de la ley de Beer a un medio que contenga más de una clase de sustancias

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

absorbentes. Como ya se ha descrito en la Ec. 69, la absorbancia total para un sistema multicomponente viene dada por la suma de las absorbancias de cada una de las especies, siempre que no exista interacción entre estas. De esta manera, se acepta la contribución de cada una de las sustancias presentes en el medio donde se ha producido la polimerización a la absorbancia total del sistema, o de las sustancias que se han generado en el proceso de liberación de los anticancerígenos.

Respecto al proceso de vehiculización del fármaco, podemos citar como sustancias susceptibles de contribuir a esta absorción total el propio fármaco no incorporado por las nanopartículas, los residuos de la polimerización del monómero (fracciones de monómero que no han polimerizado, restos de oligómeros y de productos de degradación) y los restos de otros componentes del medio (HCl, responsable del pH del medio, y dextrano-70, agente estabilizador de la polimerización). Por lo tanto, podría estimarse la cantidad de fármaco que no ha sido incorporado por las nanopartículas restando a la absorción total del sistema, la correspondiente al resto de sustancias presentes (residuos de la polimerización del monómero y restos de otros componentes del medio). Y, por diferencia entre la concentración inicial y final del antineoplásico en el medio, conoceremos la cantidad total incorporada por nuestros materiales.

Entre los factores citados, suficientemente estudiados por nuestro grupo de investigación, destaca como principal fuente que contribuye a la absorbancia total del sistema los residuos de la polimerización del monómero. La señal de absorción en el espectro que generan, crece con la concentración de monómero de cianoacrilato empleada. Por lo tanto, al aumentar la cantidad de butilcianoacrilato que se añade al medio, se generarán residuos de la síntesis en mayor cuantía. Asimismo, hemos comprobado que la absorción desarrollada por estos residuos deforma el espectro del fármaco no incorporado por las nanopartículas. Esta deformación aumenta con la concentración de monómero utilizada, por llevar asociada una mayor producción de residuos de síntesis. Un efecto similar, pero menos intenso, se aprecia también cuando se incrementa en el medio de

polimerización la concentración de HCl o de dextrano-70 (105, 222, 223). Es por ello lógico plantear la determinación de la cantidad de fármaco no incorporado por las nanopartículas restando a la absorbancia total del sistema la correspondiente al resto de especies absorbentes (105, 220-223).

En cuanto al proceso de liberación de ambos antineoplásicos, podemos citar como sustancias susceptibles de contribuir a la absorción total del medio de liberación, el propio fármaco liberado por las nanopartículas, los residuos de la degradación del polímero y los restos de otros componentes del medio (HCl o tampón NaOH-KH₂PO₄ de pH = 7.4, según sea el caso). Por lo tanto, podría estimarse la cantidad de fármaco liberado por las partículas restando a la absorción total del sistema, la correspondiente al resto de sustancias presentes (residuos de la degradación del polímero y restos de otros componentes del medio). Entre los factores citados, suficientemente estudiados por nuestro grupo de investigación, destaca como principal fuente que contribuye a la absorbancia total del sistema los residuos de la degradación del polímero. La señal de absorción en el espectro que generan, crece con la concentración de éstos en el medio de liberación. Asimismo, hemos comprobado que estos residuos deforman el espectro UV-Vis del fármaco liberado, la cuál aumenta con la concentración de residuos presente en el medio (222, 223). Es por ello lógico plantear la determinación de la cantidad de anticancerígeno liberado por las partículas compuestas restando a la absorbancia total del sistema la correspondiente al resto de especies absorbentes (105, 220-223).

4.3. INCORPORACIÓN DE LOS ANTINEOPLÁSICOS EN LAS PARTÍCULAS RECUBIERTAS.

La vehiculización de fármaco en las nanopartículas mixtas puede realizarse mediante dos métodos: la adición del principio activo en el momento en el que se forman las partículas, quedando éste atrapado principalmente en la matriz polimérica, o la adsorción tras la formación e incubación de las nanopartículas en una disolución de éste. Es previsible que la mayor captación de fármaco se consiga mediante el método de incorporación (105, 222-224).

4.3.1. Adsorción de 5-fluorouracilo y ftorafur.

El estudio de la vehiculización superficial de los anticancerígenos seleccionados por las partículas compuestas se centrará en la evaluación del grado de unión a la superficie polimérica de éstas, mediante determinaciones espectrofotométricas y un estudio electroforético.

4.3.1.1. Análisis electrocinético de la adsorción.

La electroforesis puede ser una adecuada herramienta para la determinación cualitativa de la vehiculización de fármaco por su elevada sensibilidad, incluso a cambios superficiales mínimos atribuibles a la adsorción de pequeñas cantidades de especies cargadas. En este estudio, realizamos una determinación cualitativa del proceso de adsorción mediante determinaciones de la movilidad electroforética de las partículas en suspensiones diluidas [≈ 0.1 % (p/v)] con diferentes concentraciones de los fármacos, utilizando el aparato de electroforesis Malvern Zetasizer 2000

(Reino Unido). Una vez fijadas las diferentes concentraciones molares de 5-fluorouracilo o ftorafur (10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3}$ y 10^{-2}), y a fin de descartar la influencia de los iones presentes en la disolución, las suspensiones se dividieron en dos grupos: uno de ellos con una fuerza iónica fijada (KNO_3 10^{-3} M) y el otro sin fijar una fuerza iónica. Las medidas se realizaron tras 24 horas de almacenamiento de las suspensiones a 25 °C, protegidas de la luz ambiental y bajo agitación constante, comprobando previamente el pH. Los datos presentados son el promedio de quince determinaciones, cambiando la muestra cada tres.

La Fig. 27 muestra la evolución de la movilidad de las partículas mixtas con la concentración de 5-fluorouracilo, en presencia y en ausencia del electrolito añadido (10^{-3} M KNO_3 , en su caso). De forma general, los valores de u_e tienden a incrementarse hacia valores más positivos o progresivamente menos negativos cuanto la concentración de 5-fluorouracilo aumenta (Fig. 27). Sin embargo, puede apreciarse un claro efecto de la adición de KNO_3 . La adsorción de 5-fluorouracilo por las partículas recubiertas, favorecida electrostáticamente, reduce su carga originalmente negativa. Las especies cargadas positivamente, responsables de este efecto, provienen presumiblemente de la protonización de los grupos $-\text{NH}$ de la molécula de fármaco. La presencia de KNO_3 provoca una reducción de la movilidad debido a la compresión de la doble capa eléctrica. Además, el KNO_3 apantalla la atracción entre las nanopartículas compuestas y las moléculas de fármaco; por lo tanto, la reducción de la u_e al aumentar la concentración de 5-fluorouracilo es más significativa cuando no hay KNO_3 en el medio.

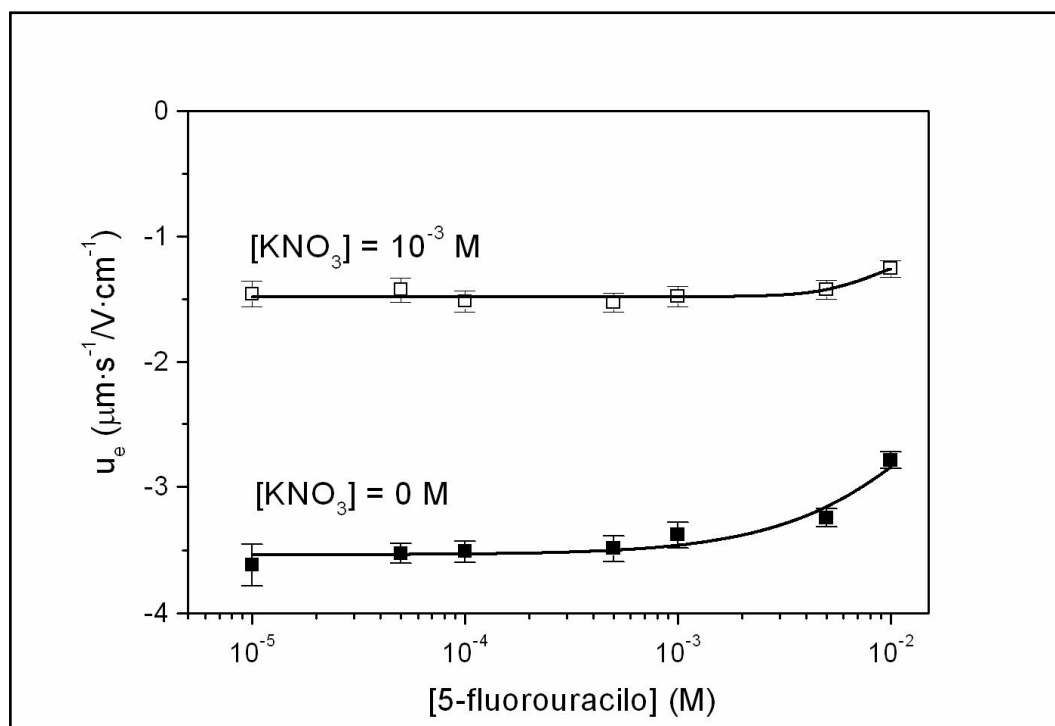


Fig. 27. Movilidad electroforética (u_e) de las partículas recubiertas (\blacksquare , \square) en función de la concentración de 5-fluorouracilo, en presencia (símbolos abiertos) y en ausencia (símbolos cerrados) de KNO_3 10^{-3} M .

Con respecto a la determinación cualitativa de la adsorción de fluorouracilo por las partículas mixtas, en la Fig. 28 puede apreciarse un comportamiento similar al observado en el caso del 5-fluorouracilo: la evolución de la u_e hacia valores progresivamente menos negativos, conforme aumenta la concentración de fluorouracilo. La carga originalmente negativa de las partículas compuestas disminuye debido a la adsorción electrostática de fármaco (especies cargadas positivamente, que pueden provenir de la protonización de los grupos $-\text{NH}$ de la molécula de fármaco). La presencia de una fuerza iónica constante (KNO_3 10^{-3} M) provoca una reducción de la movilidad debido a una compresión de la doble capa. Además, el KNO_3 apantalla la atracción entre las moléculas de fármaco y las partículas mixtas, de tal manera que la reducción de la u_e de las partículas cuando la concentración de fluorouracilo aumenta es más importante cuando no hay KNO_3 en el medio.

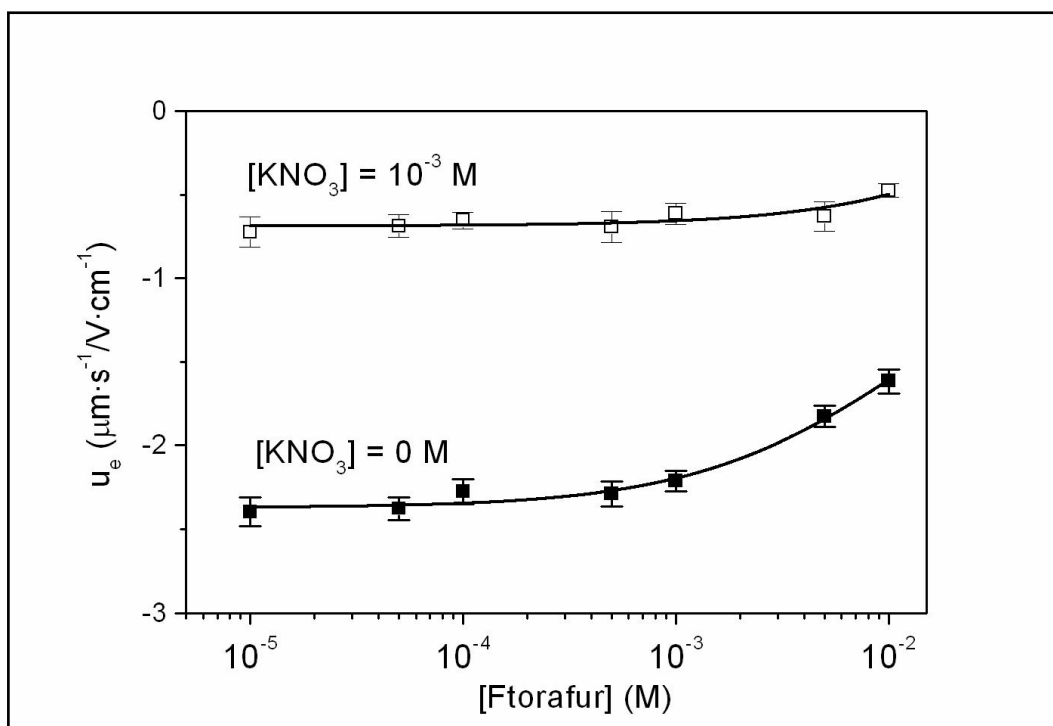


Fig. 28. Movilidad electroforética (u_e) de las partículas recubiertas (\blacksquare , \square) en función de la concentración de 5-fluorouracilo, en presencia (símbolos abiertos) y en ausencia (símbolos cerrados) de KNO_3 10^{-3} M .

4.3.1.2. Determinación espectrofotométrica de la adsorción.

El segundo método, para estimar la adsorción de los antineoplásicos objeto de estudio, es la determinación de la absorbancia óptica de los sobrenadantes obtenidos tras poner en contacto las partículas sintetizadas con soluciones de concentraciones prefijadas de estos principios activos, durante 24 horas, a $25.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ y bajo agitación mecánica. Para ello, preparamos una serie de disoluciones de 5 mL de volumen con diferente concentración molar de 5-fluorouracilo o ftorafur (10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3}$ y 10^{-2}). Una vez retirada una muestra del medio para la posterior comparación, se procedió a añadir las partículas compuestas en cantidad suficiente como para tener una concentración final del 1 % (p/v). Tras 24 horas de contacto se procedió a la separación de los sobrenadantes mediante doble centrifugación a 13500 r.p.m. durante 20 minutos, para la determinación del espectro de absorción de éstos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

Como ya se ha justificado, el cálculo de la adsorción de los antineoplásicos se realizó mediante la comparación de la absorbancia del medio de polimerización con la correspondiente al sobrenadante obtenido tras doble centrifugación y tras eliminar la propia de los productos residuales que puedan interferir.

Los resultados obtenidos, muestran un efecto positivo de la concentración de antineoplásico en el grado de adsorción de éste por las partículas recubiertas, tanto en el caso del 5-fluorouracilo como en el del ftorafur. La Fig. 29 muestra la cantidad de 5-fluorouracilo (Fig. 29a) y la cantidad de ftorafur (Fig. 29b) adsorbida por las partículas compuestas, en función de la concentración de fármaco en el equilibrio. Como puede apreciarse en ambos casos, la adsorción de antineoplásico por las partículas mixtas aumenta con la cantidad de principio activo en solución, sugiriéndose una saturación de la adsorción en ambos casos para una concentración superior a 10^{-2} M. La cantidad máxima vehiculizada por las partículas recubiertas es $159.69 \pm 7.33 \mu\text{mol}/\text{m}^2$, para el 5-fluorouracilo, y $202.62 \pm 5.23 \mu\text{mol}/\text{m}^2$, para el ftorafur. Puede observarse, al comparar ambos principios activos, que las partículas recubiertas adsorben más cantidad de ftorafur, lo que puede explicarse si tenemos en cuenta que este anticancerígeno es más lipófilo que el 5-fluorouracilo, por lo que su adsorción en una superficie hidrófoba como la del recubrimiento polimérico se encuentra más favorecida (94, 154, 222, 223, 225).

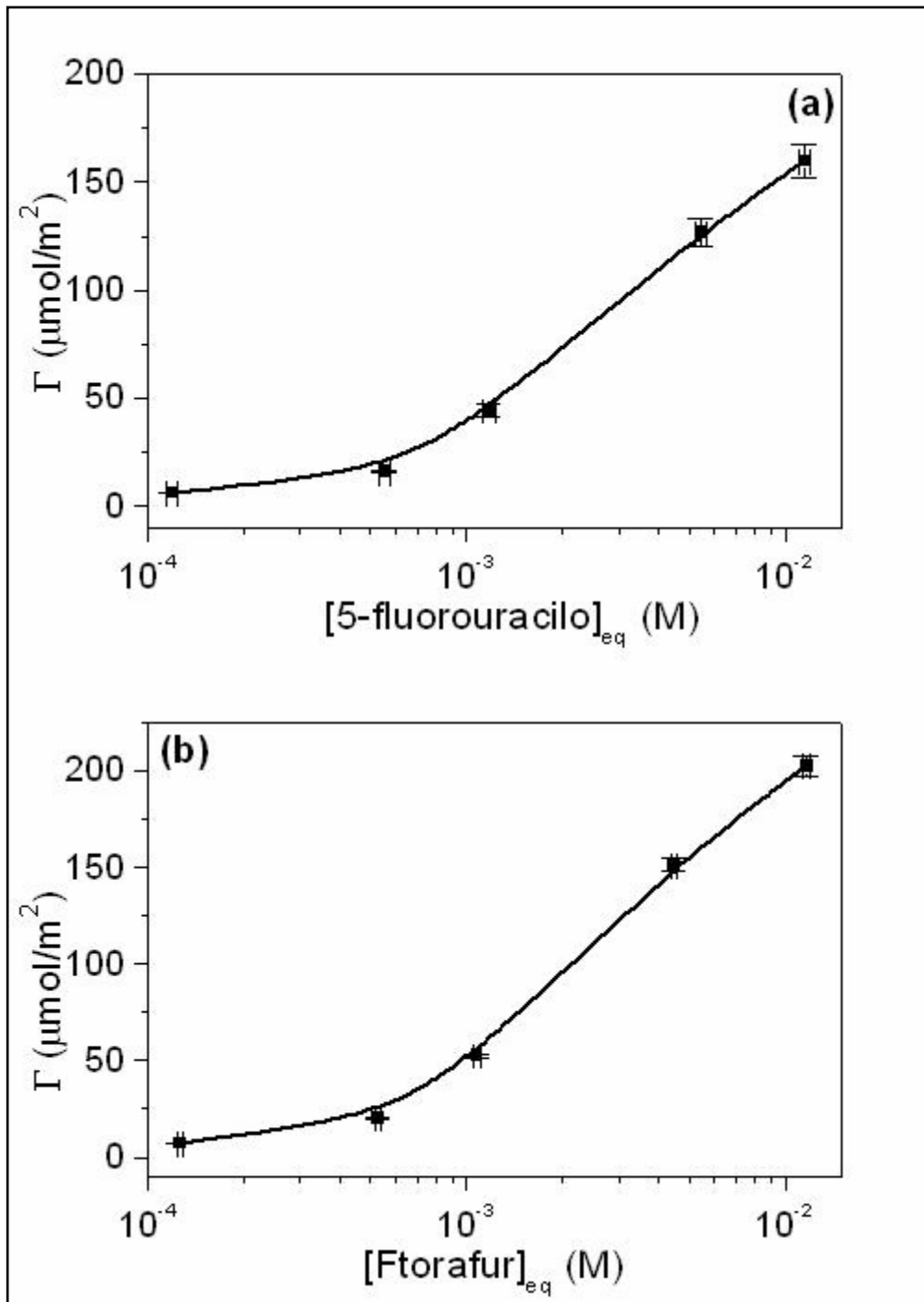


Fig. 29. Densidad de adsorción, Γ , de 5-fluorouracilo (a) y de ftorafur (b) por las partículas recubiertas, en función de la concentración de principio activo en el equilibrio.

4.3.2. Absorción de 5-fluorouracilo y ftorafur.

Una vez estudiada la adsorción de ftorafur y de 5-fluorouracilo en la superficie de las partículas recubiertas, nos centraremos en el estudio de la contribución del, a priori, principal método de vectorización de fármacos en este tipo de nanopartículas: la incorporación en el momento en que se produce su formación. Para ello, analizaremos la influencia de los principales factores que influyen esta captación de fármaco en la matriz de las partículas y que también determinan la polimerización del monómero butilcianoacrilato. Estos son la concentración de fármaco, de dextrano-70, de HCl y de butilcianoacrilato en el medio. De esta manera, pretendemos determinar las condiciones óptimas que permiten una incorporación máxima de los antineoplásicos y desarrollaremos una síntesis optimizada de las partículas recubiertas con 5-fluorouracilo o con ftorafur incorporado.

4.3.2.1. Efecto de la concentración de butilcianoacrilato.

La capacidad de captación de fármaco por parte de las partículas compuestas, se encuentra condicionada por la reducida longitud de la cadena alquílica (radical butilo) del monómero butilcianoacrilato, por lo tanto es esperable un menor grado de vehiculización en comparación con la utilización como recubrimiento de los núcleos magnéticos de otros miembros de la misma familia con sustituyente alquílico de mayor longitud (224). Diversos estudios han puesto de manifiesto que la estructura de los polímeros de esta familia consiste en un núcleo poroso rodeado por un anillo más homogéneo (50, 226, 227), lo que nos hace intuir que el principal medio de incorporación de los anticancerígenos ftorafur y 5-fluorouracilo se desarrollará mediante un atrapamiento mecánico. De esta manera, no se alterará la actividad del fármaco tras su unión a las nanosferas como ocurre con la ampicilina (228). Por otro lado, es de esperar una mayor vehiculización de ftorafur que de 5-fluorouracilo por el menor carácter hidrófilo del primero, lo que determinará una mayor afinidad por incorporarse en una matriz de naturaleza hidrófoba como la del butilcianoacrilato (105, 154, 218). En cuanto a la influencia de la

concentración de monómero empleada, estudios recientes sobre la incorporación de 5-fluorouracilo y ftorafur en polímeros de diferente naturaleza (Eudragit®, poli-lactida-co-glicolida, policaprolactona y poli-alquilocianoacrilato), han revelado que no se incrementa la vehiculización al aumentar la cantidad de polímero y sí existe un aumento de la formación de aglomerados poliméricos inservibles (105, 218, 222, 223).

El estudio de la influencia de la concentración de butilcianoacrilato adicionada al medio de polimerización sobre el grado de incorporación de los dos antineoplásicos, se realizó siguiendo la rutina de síntesis de las partículas compuestas descrita anteriormente, modificada por la introducción en el medio de polimerización de una concentración 10^{-4} M de 5-fluorouracilo o ftorafur, según el caso. La concentración de monómero utilizada fue: 1, 2 y 3 % (p/v). Una vez preparado el medio de polimerización y antes de añadir el monómero, se retiró una pequeña cantidad de cada uno de los medios para determinar su espectro de absorción en las mismas condiciones que el sobrenadante obtenido tras centrifugar dos veces dicho medio (a 13500 rpm y durante 25 minutos) una vez finalizada la síntesis. La metodología seguida para determinar la cantidad de antineoplásico vehiculizado es la descrita y justificada anteriormente. Los experimentos fueron repetidos tres veces con cada una de las concentraciones de monómero.

En términos absolutos, las cantidades absorbidas de 5-fluorouracilo y de ftorafur por las partículas compuestas se incrementan al aumentar la concentración de monómero adicionada al medio, concretamente desde 0.12 hasta 0.37 micromoles en el caso del 5-fluorouracilo, y desde 0.26 hasta 0.74, en el caso del ftorafur. Sin embargo, no ocurre lo mismo si analizamos la absorción relativa de fármaco vehiculizado por las nanosferas: en torno a los 0.2 $\mu\text{mol/g}$ en el caso del 5-fluorouracilo y en torno a los 0.5 $\mu\text{mol/g}$ en el caso del ftorafur, sin importar que la concentración de butilcianoacrilato adicionada al medio se incremente hasta el 3 % (p/v) (Fig. 30).

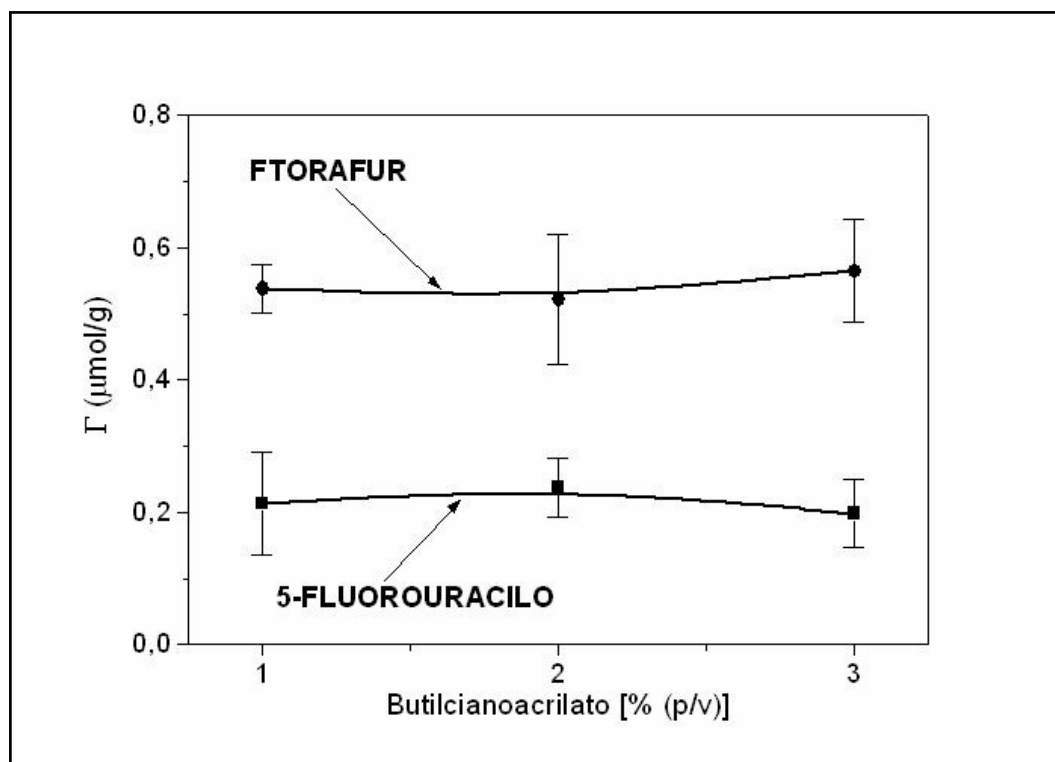


Fig. 30. Cantidad absorbida ($\mu\text{mol/g}$) de 5-fluorouracilo (■) y de ftorafur (●) por las partículas recubiertas en función de la concentración de butilcianoacrilato.

Por lo tanto, se puede deducir que el único efecto que provoca el incremento de la concentración de monómero adicionado, es un aumento de la cantidad de nanopartículas poliméricas puras generadas como residuo de la síntesis, y este aumento será el responsable del incremento de la vehiculización en términos absolutos, pero no inducirá que las partículas compuestas porten una mayor cantidad de fármaco. De esta manera, no es necesario emplear una elevada concentración de butilcianoacrilato para lograr la mejor densidad de absorción (105). Por otro lado, puede observarse al comparar ambos principios activos, que las partículas recubiertas vehiculizan más cantidad de ftorafur, lo que puede explicarse si tenemos en cuenta que este anticancerígeno es más lipófilo que el 5-fluorouracilo, por lo que su afinidad por el entorno hidrófobo de la matriz polimérica del recubrimiento es mayor (94, 154, 222, 223, 225).

4.3.2.2. Efecto de la concentración de dextrano-70.

El empleo de agentes tensioactivos o estabilizadores permite optimizar las características de las partículas obtenidas al lograr una mejora de las características morfológicas y de tamaño, una mejor vehiculización de principios activos y una protección frente a los fenómenos de opsonización a nivel fisiológico, lo que adecúa estos sistemas para su administración parenteral (13, 224, 229). Estas razones justifican la introducción de un agente estabilizador en la síntesis de las partículas compuestas. El agente seleccionado es el dextrano-70 (dextrano-70 grado clínico, Sigma, U.S.A.), un polímero biodegradable y biocompatible, de elevado peso molecular, neutro, hidrosoluble y con una buena estabilidad a temperatura ambiente y pH entre 4 y 10 (230). Se trata de un polvo blanco, higroscópico, y con peso molecular de 68000 Da, que ha sido ampliamente utilizado para facilitar la incorporación de fármacos de diferente naturaleza por polímeros de la familia de los poli(alquilocianoacrilatos), incluidos los antineoplásicos doxorubicina y metotrexato (53, 105, 229). Su introducción en el medio de polimerización antes de adicionar el monómero pretende provocar la apertura de las cadenas poliméricas, generándose un espacio dentro de la matriz polimérica donde pueda incorporarse el fármaco. Además, ha demostrado ser útil en la obtención de distribuciones poliméricas homogéneas y con uniformidad en los tamaños (229).

Para el estudio de la influencia de la concentración de dextrano-70 en el medio de polimerización sobre el grado de vehiculización de los antineoplásicos, se siguió la rutina de síntesis y el procedimiento de determinación de los principios activos ya descritos y justificados, con la única variación de la introducción en el medio de polimerización de este agente estabilizador y una concentración 10^{-4} M de ftorafur o 5-fluorouracilo, según el caso. Las concentraciones [% (p/v)] de dextrano-70 utilizadas fueron: 0, 1 y 2. Los experimentos fueron repetidos tres veces con cada una de las concentraciones de dextrano-70.

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

No se apreció una influencia estadísticamente significativa en la vehiculización de ambos fármacos, al aumentar la concentración de tensioactivo en el medio de polimerización, ya que los valores de densidad de absorción obtenidos en las síntesis sin este agente estabilizador, son muy similares a los logrados con su participación (en torno a 0.2 $\mu\text{mol/g}$ en el caso del 5-fluorouracilo, y, en torno a 0.5 $\mu\text{mol/g}$ en el caso del ftorafur) (Fig. 31). Sin embargo, este agente desempeña un papel crucial en la formación de las partículas mixtas cualitativa y cuantitativamente, debido a la combinación de sus acciones iniciadoras y estabilizadoras en la formación de la cubierta polimérica, las cuáles son similares a las de otros agentes muy utilizados en estos casos, como el polietilenglicol. Esto es atribuible a su carácter de estabilizador polihidroxílico, que provoca que en el medio exista una mayor concentración de especies iniciadoras de la polimerización (sus grupos OH y los iones OH^- de la disociación del agua) (231).

De esta manera se justifica que, con concentraciones de dextrano-70 inferiores al 1 % (p/v), se generen suspensiones que coagulan fácilmente y en las que predomina la formación de macroagregados y precipitados sólidos de polímero y de partículas compuestas, lo que determina la necesidad de realizar una filtración previa de la suspensión para obtener el tamaño de partículas deseado, reduciéndose el rendimiento del proceso de síntesis. Sin embargo, el uso de concentraciones ≥ 1 % (p/v) conduce a la formación de dispersiones estables sin macroagregados sedimentados. Queda claro, por tanto, que con la introducción de este agente estabilizador se optimiza la obtención de las partículas compuestas, sin que para ello se merme la capacidad de carga de fármaco.

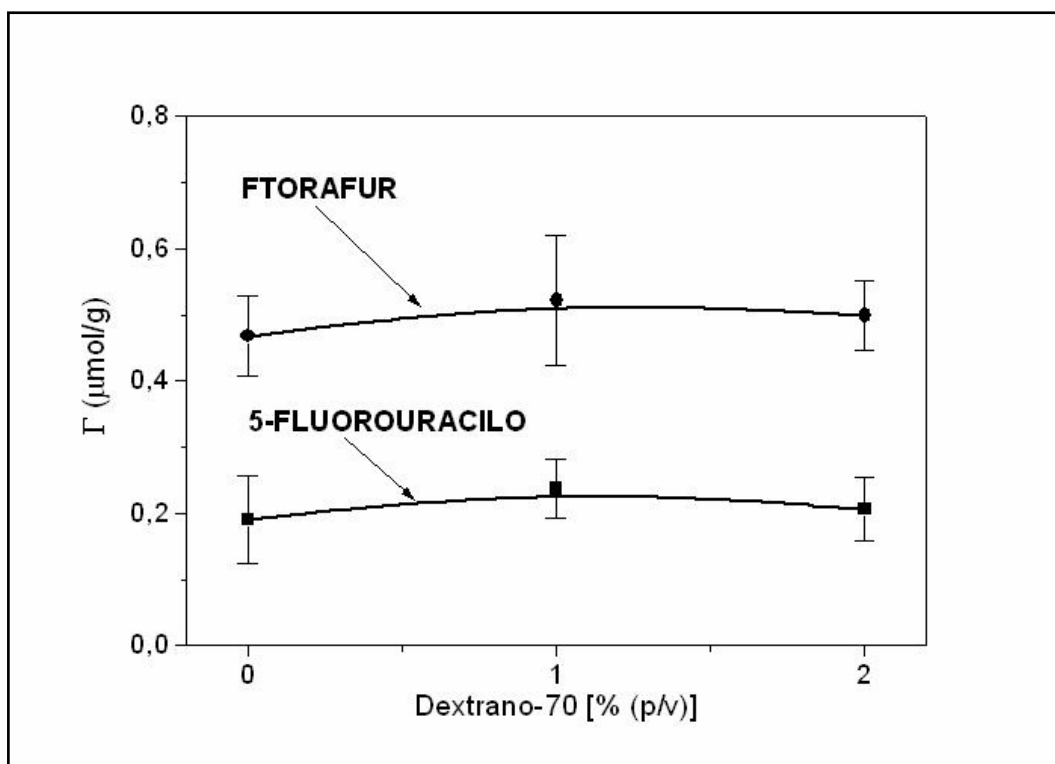


Fig. 31. Cantidad absorbida ($\mu\text{mol/g}$) de 5-fluorouracilo (■) y de ftorafur (●) por las partículas recubiertas en función de la concentración de dextrano-70.

4.3.2.3. Efecto de la concentración de HCl.

El mecanismo de formación del recubrimiento polimérico, mediante el método de emulsión/polimerización, es un proceso aniónico iniciado por bases covalentes presentes en el medio de polimerización. La cinética del proceso está determinada por las cantidades relativas de los grupos -OH alcohólicos del agente tensioactivo y de los iones OH^- formados tras la disociación de las moléculas de agua. Al incrementarse la acidez del medio, la velocidad de polimerización decrece. Por lo tanto, podemos decir que el pH determina tanto la velocidad de polimerización como la absorción de principio activo (48, 105, 220, 231). Como el ftorafur y el 5-fluorouracilo tienen un carácter esencialmente no iónico, la polimerización del monómero con una cinética rápida permitirá lograr una máxima vehiculización de fármaco por las partículas recubiertas. Sin embargo, una polimerización excesivamente rápida puede provocar la formación de macroagregados o precipitados sólidos (105, 229).

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

Nuestro objetivo es analizar la influencia de la concentración de HCl en el medio de polimerización sobre el grado de vehiculización de 5-fluorouracilo y de ftorafur por las partículas mixtas. Asimismo, investigaremos las condiciones adecuadas de pH para obtener un rendimiento óptimo de partículas compuestas adecuadas para la vía parenteral. De esta manera, determinaremos el pH apropiado que permita cumplir ambos objetivos. Los experimentos se realizaron fijando unas concentraciones de HCl entre 10^{-4} y 10^{-2} N y unas concentraciones de ftorafur o 5-fluorouracilo entre 10^{-4} y 10^{-2} M, manteniendo el resto de condiciones de la síntesis de las partículas compuestas, y seguiremos el procedimiento de cuantificación ya descritos y justificados. Los experimentos fueron repetidos tres veces con cada una de las concentraciones de principio activo y para cada uno de los pH fijados.

La Fig. 32 recoge la densidad de absorción ($\mu\text{mol/g}$) de los anticancerígenos 5-fluorouracilo y ftorafur por las partículas compuestas. En ambos casos, puede apreciarse que esta absorción se ve claramente afectada por el pH del medio de polimerización, independientemente de la concentración de fármaco empleada: al decrecer la $[\text{OH}^-]$, la absorción cae, debido a que la cinética de polimerización es más lenta. Esta mejor absorción al utilizar pH menos ácidos también se obtiene con otros fármacos, como el ciprofloxacino (105, 220). Podemos explicar este efecto si tenemos en cuenta el mecanismo de polimerización previamente descrito: una rápida polimerización (valores altos de pH) permite una mejor captación de fármaco. Aunque nuestros datos indican que la mayor absorción se logra a un pH ~ 4 utilizando la mayor concentración de fármaco (10^{-2} M), $46.3 \pm 1.1 \mu\text{mol/g}$ en el caso del ftorafur y $38.2 \pm 1.5 \mu\text{mol/g}$ en el caso del 5-fluorouracilo, y que ésta va disminuyendo progresivamente con el pH hasta situarse entorno a $0.52 \pm 0.03 \mu\text{mol/g}$ en el caso del ftorafur y $0.16 \pm 0.03 \mu\text{mol/g}$ en el caso del 5-fluorouracilo, cuando la $[\text{HCl}] = 10^{-2}$ M; como puede apreciarse al comparar las Figs. 32a y 32b existen diferencias en cuanto al anticancerígeno empleado. Las partículas mixtas absorben más ftorafur, debido a que este anticancerígeno es más lipófilo que el 5-fluorouracilo, por lo que su absorción en el recubrimiento hidrófobo polimérico está favorecida (94, 154, 222, 223, 225).

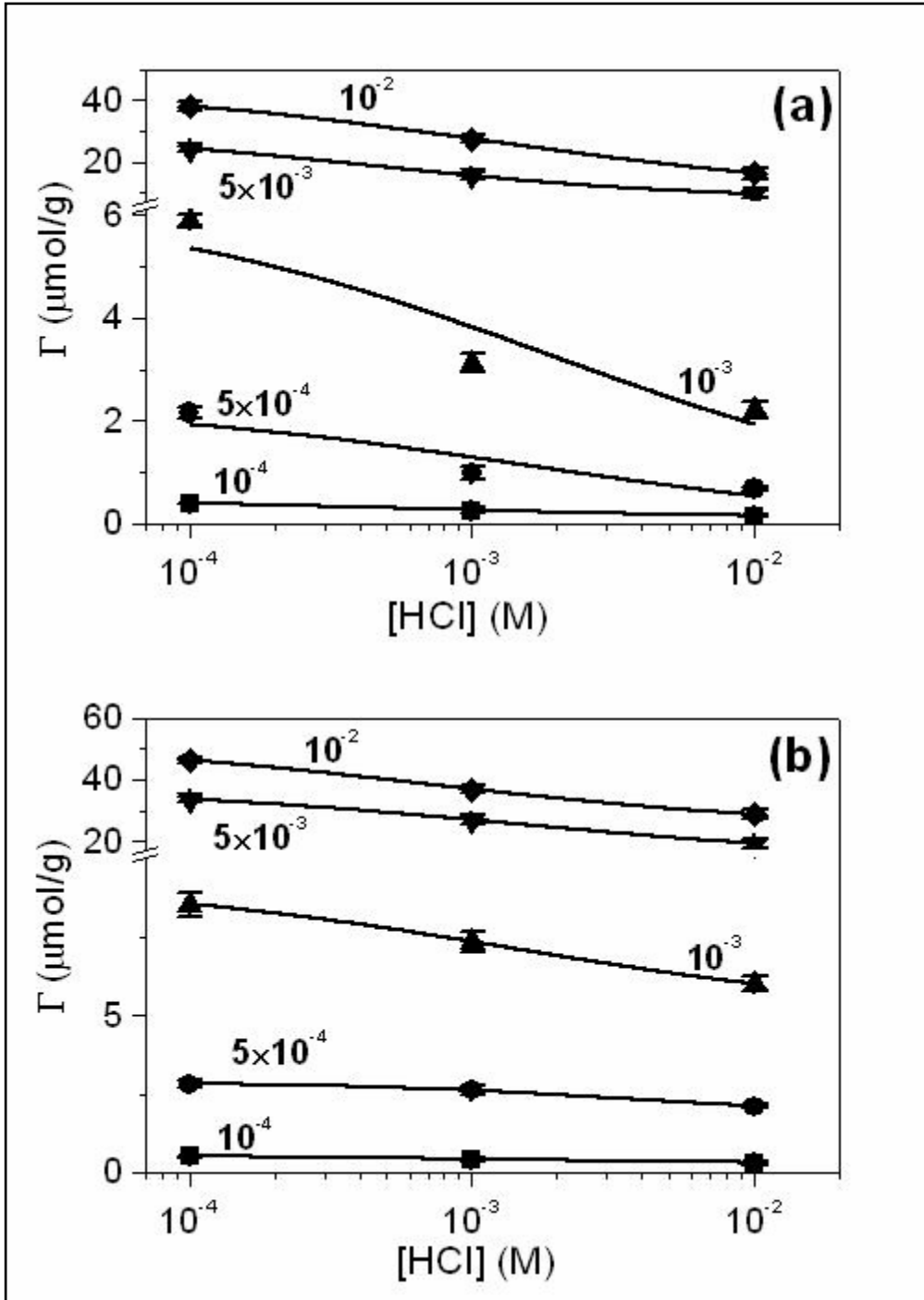


Fig. 32. Densidad de absorción ($\mu\text{mol/g}$) de 5-fluorouracilo (a) y de fluorouracil (b) por las partículas compuestas, en función de la concentración de HCl.

4.3.2.4. Efecto de la concentración de anticancerígeno.

La influencia de la concentración de principio activo presente en el medio de polimerización sobre su incorporación en la matriz de poli(alquilcianoacrilatos) es un fenómeno muy estudiado que, de forma general, implica un efecto positivo del aumento de la concentración de fármaco sobre la eficacia de la vehiculización (218, 220, 222, 223, 232, 233). Este efecto es predecible en las partículas constituidas por un núcleo magnético (en nuestro caso: hierro carbonilo) y un recubrimiento de polialquilcianoacrilato (en nuestro caso: polibutilcianoacrilato) (105). En cuanto a la incorporación por otros transportadores, son muchos los sistemas ensayados desde liposomas hasta nanopartículas de Eudragit®, policaprolactona o poli-lactida-co-glicolida, observándose una baja eficacia de incorporación debido a las características del fármaco ya comentadas (218, 234).

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

La Fig. 33 muestra la cantidad de 5-fluorouracilo y de ftorafur absorbido por las partículas mixtas en función de la concentración de fármaco en el equilibrio. Como puede apreciarse, la absorción de 5-fluorouracilo y de ftorafur aumenta con la concentración de fármaco presente en el medio de polimerización, sugiriéndose una tendencia a la saturación para concentraciones superiores a las ensayadas. Por lo tanto, existe una mayor eficacia en la captación mecánica ya que más fármaco es susceptible de ser atrapado en la red polimérica.

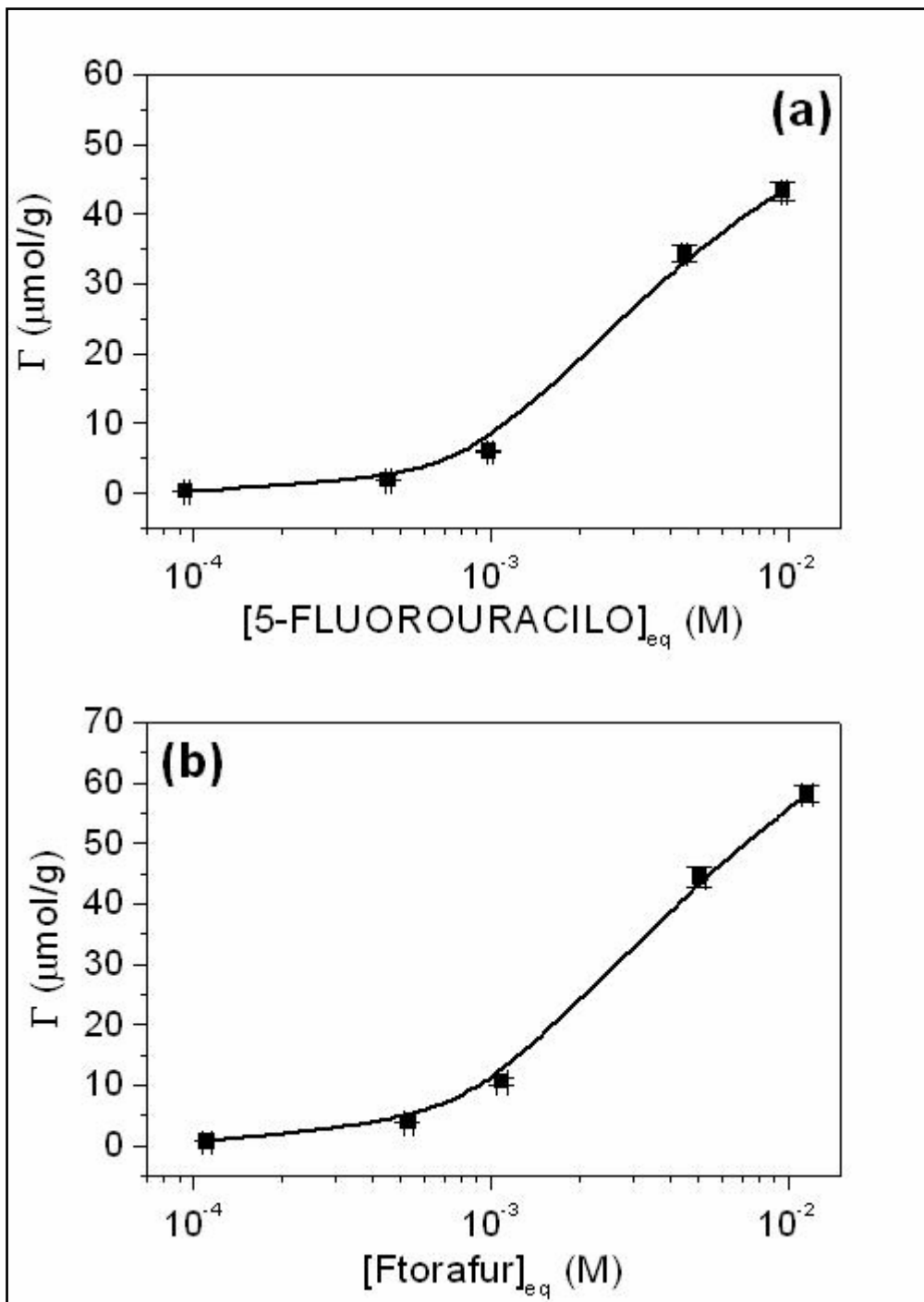


Fig. 33. Densidad de absorción ($\mu\text{mol/g}$) de 5-fluorouracilo (a) y de ftorafur (b) por las partículas compuestas en función de la concentración de éstos.

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

De esta manera, los valores de densidad de absorción obtenidos, en el caso del 5-fluorouracilo, pasarán de $0.31 \pm 0.03 \mu\text{mol/g}$ para la concentración inicial menor (10^{-4} M), a $43.33 \pm 1.37 \mu\text{mol/g}$ cuando la concentración inicial utilizada es 10^{-2} M; y, en el caso del ftorafur, pasarán de $0.69 \pm 0.02 \mu\text{mol/g}$ para la concentración inicial menor (10^{-4} M), a $58.13 \pm 1.34 \mu\text{mol/g}$ cuando la concentración inicial utilizada es 10^{-2} M. Como se ha explicado anteriormente, las partículas compuestas absorben más ftorafur, debido a la mayor hidrofobia de este anticancerígeno en comparación con el 5-fluorouracilo (94, 154, 222, 223, 225). Por otro lado, no existe ningún efecto apreciable de la concentración de fármaco sobre el aspecto de la suspensión de nanosferas que se obtiene.

4.4. LIBERACIÓN DE LOS ANTINEOPLÁSICOS DESDE LAS PARTÍCULAS RECUBIERTAS.

Una vez estudiadas y determinadas las condiciones óptimas de vehiculización de los fármacos antineoplásicos 5-fluorouracilo y ftorafur en las nanopartículas compuestas, mediante dos métodos: i) la adición de los principios activos en el momento en el que se forman las partículas; y ii) la adsorción tras la formación e incubación de las nanopartículas en una disolución de éstos; pasaremos a aplicarlas para la obtención de las partículas que se utilizarán en los ensayos de liberación in vitro. Estas condiciones son:

- Método de adsorción: las partículas sintetizadas se ponen en contacto con una solución de 5-fluorouracilo o de ftorafur con una concentración 10^{-2} M, durante 24 horas, a 25.0 ± 0.5 °C y bajo agitación mecánica. La concentración final de las partículas mixtas será del 1 % (p/v). De esta manera, la cantidad vehiculizada por las partículas recubiertas es 159.69 ± 7.33 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, en el caso del 5-fluorouracilo, y 202.62 ± 5.23 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, en el caso del ftorafur. Con el objetivo de estudiar el efecto de la cantidad de fármaco vehiculizada sobre la cinética de liberación, se obtuvieron partículas mixtas utilizando una concentración 10^{-3} M de 5-fluorouracilo o de ftorafur en el medio de contacto; lográndose de esta forma la adsorción de 44.37 ± 2.97 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, en el caso del 5-fluorouracilo, y de 52.72 ± 1.09 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$, en el caso del ftorafur.
- Método de absorción: síntesis de las partículas compuestas bajo las siguientes condiciones: i) adición del principio activo antes de añadir el monómero; ii) 2 horas de polimerización, para asegurar la adecuada formación de las partículas mixtas cargadas de antineoplásico; iii) una concentración de hierro carbonilo en el

medio de polimerización del 0.75 % (p/v); iv) la concentración de monómero añadida al medio de polimerización será del 1 % (p/v), ya que concentraciones mayores sólo provocan un aumento de la cantidad de residuos de la síntesis, principalmente partículas poliméricas puras; v) una concentración de dextrano-70 del 1 % (p/v) (su presencia juega un papel decisivo en la formación de partículas compuestas estables, homogéneas y con una distribución de tamaños estrecha); vi) una concentración de HCl 10^{-4} N, ya que concentraciones inferiores inducen la formación de partículas inadecuadas para la administración parenteral, y un pH excesivamente ácido reduce la vehiculización de fármaco; y vii) una concentración 10^{-2} M de 5-fluorouracilo o de ftorafur en el medio de polimerización, si bien, podrían utilizarse en principio concentraciones mayores, ya que no se ha alcanzado todavía la saturación del proceso. Bajo estas condiciones, la absorción obtenida, en el caso del 5-fluorouracilo, es de 43.33 ± 1.37 $\mu\text{mol/g}$ y, en el caso del ftorafur, de 58.13 ± 1.34 $\mu\text{mol/g}$. Sin embargo, con el objetivo de estudiar la influencia de la cantidad de principio activo vehiculizada sobre la cinética de liberación, se obtuvieron partículas recubiertas utilizando una concentración 10^{-3} M de 5-fluorouracilo o de ftorafur en el medio; lográndose de esta forma la absorción de 5.99 ± 0.19 $\mu\text{mol/g}$, en el caso del 5-fluorouracilo, y de 10.64 ± 0.56 $\mu\text{mol/g}$, en el caso del ftorafur.

4.4.1. Efecto del pH del medio de liberación y de la cantidad de fármaco vehiculizado sobre la cinética de liberación.

El estudio de la liberación de los anticancerígenos ftorafur y 5-fluorouracilo fue realizado a las partículas con fármaco vehiculizado tras un proceso de adsorción, con soluciones de principio activo con una

concentración 10^{-2} ó 10^{-3} M; y, también, a las partículas sintetizadas en un medio de polimerización con una concentración de fármaco 10^{-2} ó 10^{-3} M.

En ambos casos, las suspensiones de partículas recubiertas se centrifugaron a 13500 rpm durante 3 minutos, con el objetivo de eliminar el fármaco no incorporado. Las partículas recubiertas (1.5 g) fueron suspendidas en un medio de liberación constituido por 10 mL de tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH = 7.4) o por 10 mL de una solución de HCl (pH = 2). La temperatura fue mantenida a 37.0 ± 0.5 °C en todo momento, y los ensayos se realizaron por triplicado. Las muestras tomadas del medio (1.5 mL) a un intervalo de tiempo prefijado (0.08, 0.16, 0.33, 0.5, 0.66, 0.83, 1, 1.5, 2, 3, 6, 12 y 24 horas), fueron centrifugadas a 13500 rpm durante 15 minutos para realizar el análisis de su absorbancia óptica a 271 nm. Un volumen igual de la solución tampón correspondiente, mantenido a la misma temperatura, fue añadido al medio de liberación tras cada toma de muestra con el objetivo de mantener las condiciones *sink*. Todo resto de partículas presente en las muestras retiradas del medio de liberación, fue retornado inmediatamente a éste tras la centrifugación y análisis de la concentración de principio activo. La misma metodología de medida utilizada en la estimación de la vehiculización de fármaco (105, 220-223), fue empleada en los ensayos de liberación.

La Fig. 34 muestra la liberación de 5-fluorouracilo desde las partículas recubiertas (hierro carbonilo/polibutilcianoacrilato) en función del tiempo, en un medio de incubación con un pH = 7.4 o con un pH = 2. Si el pH del medio de liberación es 7.4 (Fig. 34a), puede apreciarse un proceso bifásico e independiente de la cantidad de principio activo vehiculizado: en primer lugar, una fase de liberación rápida (alrededor del 85 % en los primeros 50 minutos), mientras que el 15 % restante se libera lentamente durante los siguientes 70 minutos. Esta rápida primera fase de liberación, probablemente signifique la pérdida de 5-fluorouracilo asociado a la superficie o débilmente atrapado (adsorbido en los poros superficiales) (235). Sin embargo, la liberación más lenta que se produce durante la segunda fase, puede deberse a la difusión de fármaco a través de la matriz de la cubierta polimérica, a la

4. Capacidad de transporte y liberación controlada de antineoplásicos.

degradación de esta cubierta polimérica, o a ambos procesos, ya que se ha demostrado que el proceso de liberación es consecuencia directa de la degradación de la matriz polimérica mediante erosión superficial (101, 154, 236). Este perfil bifásico, característico de la familia de los poli(alquilcianoacrilatos), sugiere que la mayor parte del 5-fluorouracilo se encuentra adsorbida en la superficie de las partículas mixtas, en lugar de en su matriz polimérica, como ha sido comprobado en fármacos de muy diversa naturaleza (53, 227, 237, 238). Los resultados obtenidos también muestran que la cantidad acumulativa de fármaco liberada se acrecenta ligeramente al aumentar la cantidad de fármaco vehiculizado (235).

La liberación de 5-fluorouracilo desde las partículas cargadas mediante el proceso de adsorción, es casi completa tras 30 minutos. Esta rápida cinética de liberación sugiere que el principio activo se encuentra adsorbido exclusivamente en la superficie externa de las partículas mixtas. Además, un incremento de la cantidad de 5-fluorouracilo vehiculizada induce un aumento de la cantidad acumulativa de fármaco liberado (235).

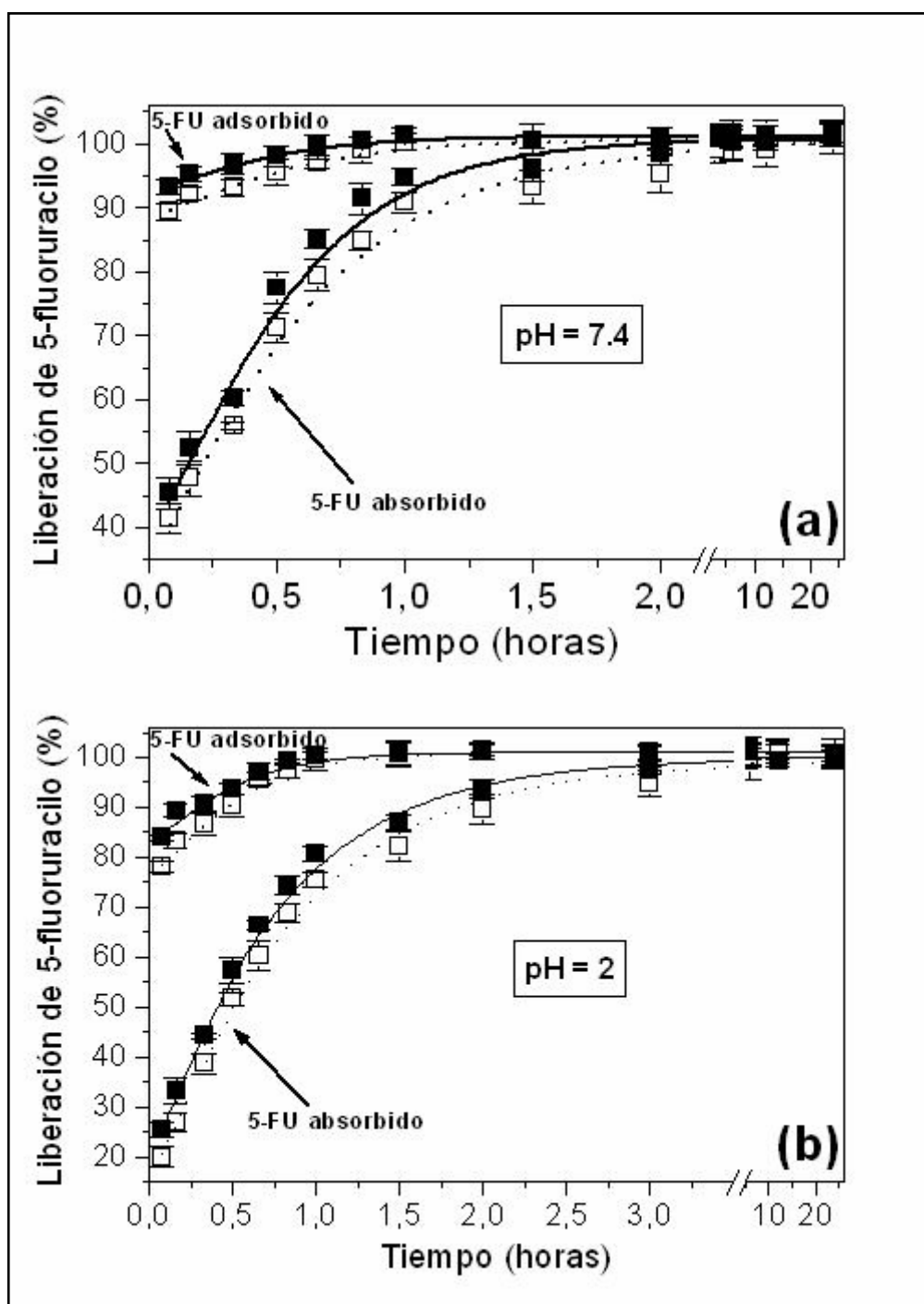


Fig. 34. Liberación de 5-fluorouracilo (%), adsorbido o absorbido, desde las partículas recubiertas (■, □) en función del tiempo de incubación en una solución tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH = 7.4) o en un medio de dispersión de pH = 2, a 37.0 ± 0.5 °C. La concentración de fármaco fijada en el medio de adsorción o de polimerización es 10⁻³ M (símbolos huecos y líneas punteadas) o 10⁻² M (símbolos llenos y líneas continuas).

Cuando el pH del medio de liberación se encuentra fijado en 2, se obtienen unos perfiles de liberación (Fig. 34b) similares a los obtenidos a pH = 7.4 (Fig. 34a), con la excepción de que se observa una velocidad de

liberación mucho más lenta: se logra la liberación del 85 % del total vehiculizado tras unos 90 minutos, y el 15 % restante se libera lentamente durante los siguientes 90 minutos. La significativa aceleración de la velocidad de erosión superficial al aumentar el pH del medio de liberación, es consecuencia del papel crucial que juegan los iones OH^- en la hidrólisis de la cadena lateral alquílica del recubrimiento polimérico: el incremento de la concentración de iones hidroxilo al aumentar el pH, induce un mayor ataque hidrolítico a las uniones C-C poliméricas, lo que provoca una degradación más rápida y, como consecuencia, una mayor velocidad de liberación de principio activo (236-239). El resto de las características de este proceso bifásico, descrita previamente al discutir los datos obtenidos a $\text{pH} = 7.4$, se mantienen iguales. Por otro lado, la liberación de 5-fluorouracilo desde las partículas cargadas mediante el proceso de adsorción es también más lenta a este pH y, de hecho, puede considerarse completa tras 60 minutos.

Recogemos en la Fig. 35 la liberación de ftorafur desde las partículas compuestas en función del tiempo, en un medio de incubación de $\text{pH} = 7.4$ ó 2. Cuando el medio de liberación tiene un $\text{pH} = 7.4$ (Fig. 35a), se observa un proceso bifásico independientemente de la cantidad de fármaco vehiculizada: en primer lugar, una etapa de liberación rápida (alrededor del 85 % en los primeros 60 minutos), mientras que el 15 % restante se libera lentamente durante los siguientes 120 minutos. La rápida cinética de liberación apreciada en la primera fase, probablemente signifique la pérdida del ftorafur asociado a la superficie o débilmente atrapado (adsorbido en los poros superficiales) (235). Sin embargo, la lenta cinética asociada a la segunda fase del proceso de liberación, puede deberse a la difusión de fármaco a través de la matriz de la cubierta polimérica, a la degradación de esta cubierta polimérica, o a ambos procesos, ya que se ha comprobado que la liberación es consecuencia directa de la erosión superficial de la matriz polimérica (101, 154, 236). Este perfil bifásico, característico de la familia de los poli(alquilocianoacrilatos), sugiere que la mayor parte del ftorafur está adsorbida en la superficie de las partículas compuestas, como ha sido estudiado en principios activos de muy diversa naturaleza (53, 227, 237, 238).

Los resultados también muestran que la cantidad acumulativa de fármaco liberada se acrecenta ligeramente al aumentar el contenido en principio activo presente en las partículas recubiertas (235).

La liberación de ftorafur desde las partículas cargadas mediante el proceso de adsorción, es casi completa tras 60 minutos. Esta rápida cinética de liberación sugiere que el fármaco se encuentra adsorbido exclusivamente en la superficie externa de las partículas compuestas. Además, un incremento de la cantidad de ftorafur vehiculizada induce un aumento de la cantidad acumulativa de antineoplásico liberado (235).

Al fijar el pH del medio de liberación en 2, se obtienen unos perfiles de liberación (Fig. 35b) similares a los obtenidos a pH = 7.4 (Fig. 35a), con la excepción de que se aprecia una cinética de liberación algo más lenta: se logra la liberación del 85 % del total vehiculado tras unos 120 minutos, y el 15 % restante se libera lentamente durante los siguientes 240 minutos. La significativa influencia del pH del medio de liberación sobre la velocidad de erosión superficial, es consecuencia del papel crucial que juegan los iones OH⁻ en la hidrólisis de la cadena lateral alquílica del recubrimiento polimérico: el incremento de la concentración de iones hidroxilo al aumentar el pH, induce un mayor ataque hidrolítico a las uniones C-C poliméricas, lo que provoca una degradación más rápida y, como consecuencia, una mayor cinética de liberación del fármaco (236-239). El resto de parámetros característicos de este proceso bifásico, descritos previamente al discutir los datos obtenidos a pH = 7.4, no se alteran. Por otro lado, la liberación de ftorafur desde las partículas cargadas mediante adsorción es también más lenta a este pH y, de hecho, puede considerarse completa tras 90 minutos.

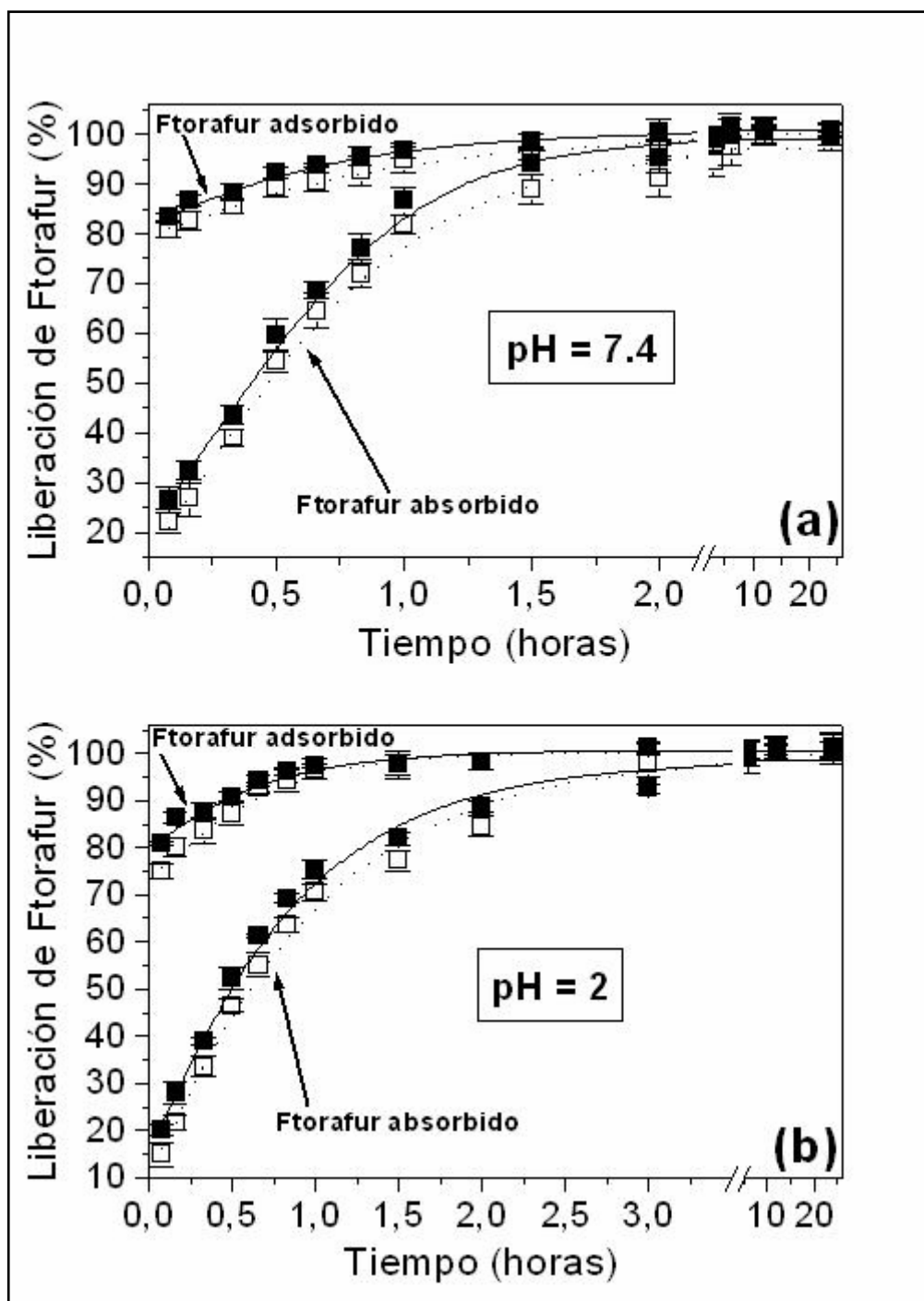


Fig. 35. Liberación de ftorafur (%), adsorbido o absorbido, desde las partículas mixtas (■, □) en función del tiempo de incubación en una solución tampón NaOH-KH₂PO₄ (pH = 7.4) o en un medio de dispersión de pH = 2, a 37.0 ± 0.5 °C. La concentración de principio activo fijada en el medio de adsorción o de polimerización es 10⁻³ M (símbolos huecos y líneas punteadas) o 10⁻² M (símbolos llenos y líneas continuas).

5

CONCLUSIONES

El principal objetivo de este trabajo de investigación es la consecución, bajo condiciones óptimas, de un sistema transportador de fármacos antineoplásicos (5-fluorouracilo y ftorafur) consistente en nanopartículas formadas por un núcleo magnético y un recubrimiento polimérico biodegradable. Del mismo se pueden extraer, en resumen y de forma principal, las siguientes conclusiones:

1. Sobre la síntesis de las nanopartículas compuestas.

Se ha puesto a punto un procedimiento reproducible de síntesis de partículas coloidales esféricas de composición mixta, formadas por un núcleo magnético (hierro carbonilo) y un recubrimiento polimérico (polibutilcianoacrilato) biodegradable.

Para optimizar las condiciones de la síntesis, se analizó el efecto de la relación de pesos inicial monómero/núcleo magnético sobre las partículas compuestas obtenidas, y se concluyó que la relación 4/3 es la óptima para la realización de la síntesis de las partículas compuestas.

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

2. Sobre la estructura, la composición química y las propiedades magnéticas.

El análisis del espectro de infrarrojos constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento, ya que permitió la identificación de los grupos funcionales del polímero en las partículas compuestas. Las bandas del

espectro de las partículas compuestas son menos intensas debido a la presencia de una menor cantidad de polímero en éstas.

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

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

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

3. Sobre las propiedades eléctricas superficiales.

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

4. Sobre la termodinámica superficial.

Utilizando un modelo termodinámico aplicable a la interfase sólido/líquido, ha sido posible llevar a cabo una completa caracterización

termodinámica superficial de las partículas sintetizadas. Para ello, se ha realizado la determinación experimental del ángulo de contacto, sobre comprimidos, del agua, de la formamida y del diiodometano.

El modelo permite caracterizar el sólido mediante tres componentes de su energía libre superficial: γ^{LW} (Lifshitz-van der Waals, representativa de las interacciones no polares o dispersivas en la interfase), γ^+ (aceptor de electrones o ácido de Lewis) y γ^- (donante de electrones o base de Lewis).

La diferente naturaleza de las superficies de hierro carbonilo, polibutílicoacrilato y partículas compuestas, se manifiesta en los cambios sufridos por las interacciones interfaciales entre el sólido y los líquidos de ensayo, y en general, en las diferentes contribuciones a la energía superficial total de cada tipo de sólido.

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

5. Sobre el mecanismo de formación del recubrimiento polimérico en las partículas compuestas.

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

decir, termodinámicamente es más favorable para el polímero permanecer en contacto con el hierro carbonilo que estar aislado en el agua.

6. Sobre la capacidad de transporte y liberación controlada de los fármacos antineoplásicos 5-fluorouracilo y ftorafur.

Para la determinación de la incorporación de principio activo por las partículas compuestas, se ha diseñado un procedimiento original que permite esta cuantificación de forma reproducible, fundamentado en técnicas espectrofotométricas. Este método está basado en la corrección de los valores de absorción obtenidos tras el ensayo de vehiculización, mediante la eliminación de las absorbancias generadas por los residuos de la síntesis y los productos de degradación de las partículas. Este método ha sido validado y utilizado también en la cuantificación de la cantidad de fármaco cedida al medio en los ensayos de liberación.

Las condiciones óptimas de vehiculización de los fármacos antineoplásicos 5-fluorouracilo y ftorafur en las nanopartículas compuestas han sido estudiadas y determinadas, mediante dos métodos: i) la adición de los principios activos en el momento en el que se forman las partículas; y ii) la adsorción tras la formación e incubación de las nanopartículas en una disolución de éstos. Estas condiciones han sido empleadas para la obtención de las partículas a utilizar en los ensayos de liberación in vitro de antineoplásico.

El análisis de la incorporación superficial de 5-fluorouracilo y de ftorafur por las partículas recubiertas, mediante técnicas espectrofotométricas y electroforéticas, pone de manifiesto la contribución de la adsorción superficial al proceso de vehiculización de estos principios activos. Se ha observado un efecto positivo de la concentración de antineoplásico en el medio de contacto sobre la cantidad adsorbida por las partículas mixtas.

De la contribución de las variables de la síntesis sobre la absorción de estos dos anticancerígenos, cabe destacar el papel desempeñado por el pH del medio de polimerización y por la concentración de fármaco. Un pH moderadamente ácido (pH = 4) permite una rápida cinética de polimerización, lo que induce una mayor captación mecánica de antineoplásico. Por otro lado, al incrementarse la concentración de anticancerígeno, mayor cantidad de éste se encontrará disponible para ser captada. En cuanto a la concentración de monómero, su aumento no conlleva una mejora de la vehiculización y sí el incremento de la formación de residuos de la síntesis de partículas compuestas. La presencia de dextrano-70 en el medio no afecta a la vehiculización, pero sí a la calidad de la suspensión obtenida para uso parenteral.

Los estudios de liberación de 5-fluorouracilo y de ftorafur revelan, en ambos casos, un perfil de cesión de fármaco bifásico que se encuentra marcadamente afectado por el pH del medio de liberación y la cantidad de fármaco vehiculizado. En cuanto al pH, el incremento de la concentración de iones hidroxilo al aumentar éste, provoca una degradación más rápida del recubrimiento polimérico de las partículas y, como consecuencia, una mayor velocidad de liberación de principio activo. En cuanto a la cantidad de fármaco cargado, los resultados obtenidos muestran que la cantidad acumulativa liberada aumenta ligeramente con la cantidad vehiculizada por las partículas compuestas.

Podemos concluir, por tanto que el procedimiento de vehiculización de los anticancerígenos mediante absorción permite obtener una mayor incorporación de fármaco en las partículas y una cinética de liberación menor, en comparación con la metodología de adsorción superficial.

6

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Maeda H., Fang J., Juntruka J., Kitamoto Y., *Int. Immunopharmacol.*, **3**, 319 (2003).
- 2 Craig D.Q.M., "Dispersions as Pharmaceutical Dosage Forms". En: "Technological Applications of Dispersions", Ed.: Williams R.A., Marcel Dekker, Nueva York, pp. 457-497 (1994).
- 3 Pieters B.R., Williams R.A., Webb C., "Magnetic Carrier Technology". En: "Colloid and Surface Engineering: Applications in the Process Industries", Ed.: Williams R. A., Butterworth-Heinemann, Oxford, pp. 248-286 (1994).
- 4 Pankhurst Q.A., Connolly J., Jones S.K., Dobson J., *J. Physics D-Applied*. **36** (13), R167 (2003).
- 5 Meyers P.H., Cronic F., Nice C.M. Jr., *AJR*, **90**, 1068 (1963).
- 6 Alksne J.F., Fingerhut A.G., Rand R.W., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, **30**, 159 (1967).
- 7 Robinson P.J., Dunnill P., Lilly M.D., *Biotechnol. Bioeng.*, **15**(3), 603 (1973).
- 8 Kronick P.L., Campbell G.L., Joseph K., *Science*, **200**, 1074 (1978).
- 9 Zimmerman U., Pilwat G., *Naturforschungen*, **31C**, 732 (1976).
- 10 Widder K.J., Senyei A.E., Scarpelli D.G., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **158**, 141 (1978).
- 11 Widder D.J., Edelman R.R., Grief W.L., Monda L., *AJR*, **149**, 839 (1987).
- 12 Saini S., Stark D.D., Hahn P.F., Wittenberg J., Brady J.T., Ferrucci J.T., *Radiology*, **162**, 211 (1987).
- 13 Stolnik S., Illum L., Davis S.S., *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **16**, 195 (1995).

6. Bibliografía.

- 14 Gupta P.K., Hung C.T., "Magnetically Controlled Targeted Chemotherapy". En: "Microspheres and Regional Cancer Therapy", Eds.: Willmott N., Daly J., CRC Press, Boca Raton, pp. 71-116 (1994).
- 15 Senyei A., Widder K.J., Czerlinski G., *J. Appl. Phys.*, **49**, 3578 (1978).
- 16 Pouliquen D., Chouly C., "Magnetic Microcarriers for Medical Applications". En: "The MML Series (Vol. 2): Medical & Biotechnology Applications", Ed.: Arshady R., Citus Books, Londres, pp. 343-382 (1999).
- 17 Lübbe A.S., Alexiou C., y Bergemann C., *J. Surg. Res.* **95**, 200 (2001).
- 18 Rudge S., Kurtz T.L., Vessely C.R., Catterall L.G., Williamson D.L., *Biomaterials* **21**, 1411 (2000).
- 19 Lübbe A.S., Bergemann C., Brock J., McClure D.G., *J. Magn. Magn. Mater.* **194**, 149 (1999).
- 20 Belikov V.G., Kuregyan A.G., *Pharm. Chem. J.*, **35**(2), 88 (2001).
- 21 Lewis D.A., Alpar H.O., *Int. J. Pharm.*, **22**, 137 (1984).
- 22 Sprandel U., Lanz D.-J., von Horsten W., *Method. Enzymol.*, **149**, 301 (1987).
- 23 Vyas S.P., Jain S.K., *J. Microencapsulation*, **11**(1), 19 (1994).
- 24 Ibrahim A., Couvreur P., Roland M., Speiser P., *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**, 59 (1983).
- 25 Hung C.T., McLeod A.D., Gupta P.K., *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **16**, 509 (1990).
- 26 Mosbach K., Schroder U., *FEBS Lett.*, **102**, 112 (1979).
- 27 Mosbach K., Schroder U., *Enz. Eng.*, **5**, 239 (1981).

- 28 Morimoto Y., Akimoto M., Yotsumoto Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**(8), 3024 (1982).
- 29 Morimoto Y., Sugibayashi K., Akimoto M., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**(1), 279 (1983).
- 30 Morimoto Y., Akimoto M., *Biomaterials*, **4**, 49 (1983).
- 31 Kiwada H., Sato J., Yamada S., Kato Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4253 (1986).
- 32 Kharkevich D.A., Alyautdin R.N., Filippov V.I., *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**, 286 (1989).
- 33 Gupta P.K., Hung C.T., *Int. J. Pharm.*, **43**, 167 (1988).
- 34 Gupta P.K., Gallo J.M., Hung C.T., Perrier D.G., *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **13**, 1471 (1987).
- 35 Gallo J.M., Gupta P.K., Hung C.T., Perrier D.G., *J. Pharm. Sci.*, **78**, 190 (1989).
- 36 Widder K.J., Senyei A.E., Ranney D.F., *Canc. Res.*, **40**, 3512 (1980).
- 37 Gupta P.K., Hung C.T., Perrier D.G., *Int. J. Pharm.*, **33**, 137 (1986).
- 38 Widder K.J., Flouret G., Senyei A., *J. Pharm. Sci.*, **68**, 79 (1979).
- 39 Widder K.J., Morris R.M., Poore G., Howard D.P. Jr., Senyei A.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**(1), 579 (1979).
- 40 Senyei A.E., Reich S.D., Gonczy C., Widder K.J., *J. Pharm. Sci.*, **70**, 389 (1981).

6. Bibliografía.

- 41 Kato T., Nemoto R., Mori H., Abe R., Unno K., Goto A., Murota H., Harada M., Homma M., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **10**, 199 (1984).
- 42 Kato T., Nemoto R., Mori H., Unno K., Goto A., Harada M., Homma M., *Proc. Jpn. Acad.*, **55**, 470 (1979).
- 43 Samokhin B.P., Domogatsky S.P., *Zh. Vses. Khim. Ova.*, **32**, 527 (1987).
- 44 Jain S.K., Vyas S. P., *J. Microencapsulation*, **11**, 141 (1994).
- 45 Langer R., *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **30**(8), 524 (1983).
- 46 Kost J., Noecker R., Kunica E., Langer R., *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**(8), 935 (1985).
- 47 Saslawski O., Weingarten C., Benoit J.P., Couvreur P., *Life Sci.*, **42**, 1521 (1988).
- 48 Fattal E., Peracchia M.T., y Couvreur P. En "*Handbook of Biodegradable Polymers*", Eds.: Domb A.J., Kost J., y Wiseman D.M., Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 183-202 (1997).
- 49 Cavallaro G., Fresta M., Giammona G., Puglisi G., y Villari A., *Int. J. Pharmaceutics* **111**, 31 (1994).
- 50 Henry-Toulmé N., Decout A., Lalanne J., Nemati F., Dubernet C., Dufourcq J., *J. Colloid Interface Sci.* **162**, 236 (1994).
- 51 Hu Y-P., Jarillon S., Dubernet C., Couvreur P., Robert J., *Cancer Chemoter. Pharmacol.* **37**, 556 (1996).
- 52 Decout A., Dubernet C., Henry-Toulme N., *J. Colloid Interface Sci.* **181**, 99 (1996).

- 53 Nèmati F., Dubernet C., Fessi H., de Verdière A. C., Poupon M.F., Puisieux F., Couvreur, P., *Int. J. Pharm.* **138**, 237 (1996).
- 54 Flesch C., Joubert M., Bourgeat-Lami E., Mornet S., Duguet E., Delaite C., Dumas P., *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects* **262** (1-3), 150 (2005).
- 55 Flesch C., Delaite C., Dumas P., Bourgeat-Lami E., Duguet E., *Journal of Polymer Science Part A- Polymer Chemistry.* **42** (23) 6011 (2004).
- 56 Kato T., Nemoto R., Mori H., Kumagai I., *Lancet*, **2**, 479 (1979).
- 57 Kato T., Nemoto R., Mori H., Takahashi M., Harada M., *Cancer*, **48**, 674 (1981).
- 58 Kato T., Nemoto R., Mori H., Takahashi M., Tamakawa Y., Harada M., *J.A.M.A.*, **245**, 1123 (1981).
- 59 Kato T., "Encapsulated Drugs in Targeted Cancer Therapy". En: "Controlled Drug Delivery (Vol. 2)", Ed.: Bruck S.D., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 189-192 (1982).
- 60 Goldberg J.A., Kerr D.J., Blackie R., Whately T.L., Pettit L., Kato T., McArdle C. S., *Cancer*, **67**, 952 (1991).
- 61 Audisio R.A., Doci R., Mazzaferro V., Bellegotti L., Tommasini M., Montalto F., Machiano A., Piva A., DeFazio C., Damascelli B., Gerranri L., van Thiel D.H., *Cancer*, **66**, 228 (1990).
- 62 Kato T., Nemoto R., Mori H., Iwata K., Sato S., Unno K., Murota H., Echigo M., Harada M., Homma M., *J. Jap. Soc. Cancer Ther.*, **15**, 33 (1980).
- 63 Sako M., Hirota S., *Jpn. J. Cancer Chemother.*, **13**(4): part. II, 1618 (1986).

6. Bibliografía.

- 64 Morris R.M., Poore G.A., Howard D.P., Sefranka J.A., "Selective Targeting of Magnetic Albumin Microspheres Containing Vindesine Sulphate: Total Remission in Yoshida Sarcoma-Bearing Rats". En: "Microspheres and Drug Therapy: Pharmaceutical, Immunological and Medical aspects", Eds.: Davis S.S., Illum L., McVie J.G., Tomlinson E., Elsevier, Nueva York, pp. 439-449 (1984).
- 65 Zavadskii S.P., Cherkasova O.G., Kharitonov Yu. Ya., *Pharm. Chem. J.*, **34**(10), 558 (2000).
- 66 Turner R.D., Rand R.W., Bentson J.R., Mosso J.A., *J. Urol.*, **113**, 455 (1975).
- 67 Sako M., Yokogawa S., Sakamoto K., Adachi S., Hirota S., Okada S., Murao S., *Invest. Radiol.*, **17**, 573 (1982).
- 68 Barry J.W., Bookstein J.J., Alksne J.F., *Radiology*, **138**, 341 (1981).
- 69 Charles S.W., Popplewell J., "Ferromagnetic Liquids". En: "Ferromagnetic Materials (Vol. 2)", Ed.: Wohlfarth E. P., North-Holland Publishing Company, pp. 509-559 (1980).
- 70 Ranney D.F., "Magnetically Controlled Devices and Biomodulation". En: "Drug Delivery Devices: Fundamentals and Applications", Ed.: Tyle P., Marcel Dekker, Nueva York, pp. 325-343 (1988).
- 71 Gupta P.K., Hung C.T., *Life Sci.*, **44**, 175 (1989).
- 72 Morimoto Y., Sugibayashi K., Okumura M., Kato Y., *J. Pharm. Dyn.*, **3**, 264 (1980).
- 73 Ovadia H., Paterson P.Y., Hale J.R., *Isr. J. Med. Sci.*, **19**, 631 (1983).
- 74 Gupta P.K., Hung C.T., *J. Microencapsulation*, **7**(1), 85 (1990).

- 75 Cueto A., Tardón A., Delgado M., "Epidemiología del Cáncer". En "Medicina Preventiva y Salud Pública (Piedrola Gil)". 10ª Ed., Ed. Masson (2001).
- 76 Chabner B.A. et al, "Fármacos antineoplásicos". En "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (Goodman & Gilman)". 11ª Ed., Ed. Brunton L.L., Lazo J.S., Parter K.L., McGraw-Hill – Interamericana (2003).
- 77 Waisman H.A., *J. Lab. Clin. Med.*, **50**, 961 (1957).
- 78 Curreri A.R. , Ansfield F.J. , McIver F.A., et al., *Cancer Res.*, **18**, 478 (1958).
- 79 Cranston E.M., *J. Natl. Cancer I.*, **22**, 489 (1959).
- 80 Liebling M.E. , Humphreys S.E. , Goldin A., *Cancer Res.*, **19**, 116 (1959).
- 81 Wilson W.L., Deren T., Mills L.C., *Fed. Proc.*, **18**, 460 (1959).
- 82 Lemon H.M. , Mozden P.J., *Ann. Intern. Med.*, **60**, 333 (1964).
- 83 Soloway M.S. , Tidwell M., *P. Am. Assoc. Canc. Res.*, **18**, 2 (1977).
- 84 Brown I., Ward H.W.C., *Cancer Lett.*, **5**, 291 (1978).
- 85 Conte P.F., Sertoli M.R., Bruzzone M., et al., *Gynecol. Oncol.*, **20**, 290-297 (1985).
- 86 Forastiere A.A., Natale R.B., Takasugi B.J., et al., *J. Clin. Oncol.* , **5**, 190 (1987).
- 87 Weinerman B., Orr K., *Clin. Invest. Med.* **9**, 126 (1986).
- 88 Airoidi M., Pedani F., Brando V., et al., *Tumori* **75**, 252 (1989).

6. Bibliografía.

- 89 Teo P.M.L. et al., *Oral Oncol.*, **31b**, 373 (1995).
- 90 Flórez J., "Quimioterapia Antineoplásica I. Principios Fundamentales. Antimetabolitos, Fijadores de la Tubulina, Inhibidores de Topoisomerasas". En: "*Farmacología Humana*", 4º Ed., Ed.: Flórez J., Maason S. A., Barcelona, pp. 1019-1038 (2003).
- 91 "Terapia antineoplásica y agentes inmunomoduladores". En "*Catálogo de Especialidades Farmacéuticas 2006*". 1º Ed., Ed.: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid pp. 1403-1475 (2006).
- 92 Foye W.O., "Análogos de pirimidina". En "*Principios de Química Farmacéutica*", 1º Ed. Ed. Reverté (1991).
- 93 Saniger E. et al, *Tetrahedron* **59**,8017 (2003).
- 94 Arias J.L., Gallardo V., Linares-Molinero F., Delgado A.V., *J. Colloid and Interface Science*, **299**, 599 (2006).
- 95 Neil W., Ashroft N., Mermin D. "Solid State Physics". *HRW International Editions*, (1976).
- 96 Whittaker P., Ali S.F., Imam S.F., Dunkel V.C., *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **36**, 280 (2002).
- 97 Huebers H.A., Brittenham G.M., Csiba E., Finch C.A., *J. Lab. Clin. Med.* **108**, 473 (1986).
- 98 Devathali S.D., Gordeuk V.R., Brittenham G.M., Bravo J.R., Hughes M.A., Keating L. J., *Eur. J. Haematol.* **46**, 272 (1991).
- 99 Chua-anusorn W., Macey D.J., Webb J., de la Motte Hall P., St. Pierre T. G., *Biometals* **12**, 103 (1999).

- 100 Okon E., Pouliquen D., Okon P., Kovaleva Z.V., Stepanova T.P., Lavit S.G., Kudryavtsev B.N., Jallet P., *Lab. Invest.* **71**(6), 895 (1994).
- 101 Page M.E., Pinto-Alphandary H., Chachaty E., Andremont A., Couvreur P., *S.T.P. Pharma Sciences* **6**(4), 298 (1996).
- 102 Montanaro L., Arciola C.R., Cenni E., Ciapetti G., Savioli F., Filippini F., Barsanti L. A., *Biomaterials* **22**, 59 (2001).
- 103 Lherm C., Müller R.H., Puisieux F., Couvreur P., *Int. J. Pharmaceutics* **84**, 13 (1992).
- 104 Arias J.L., Gallardo V., Gómez-Lopera S.A., Plaza R.C., Delgado A.V., *J. Control. Rel.*, **77**, 309 (2001).
- 105 Arias J.L., Gallardo V., Gómez-Lopera S.A., Delgado A.V., *J. Biomed. Nanotech*, **1**(2), 1 (2005).
- 106 Alvoitidinov A., *Dokl. Akad. Nauk. Uzb. SSR*, **7**, 41 (1982).
- 107 Donnelly E. F., Johnston D.S., Pepper D.C., *Polymer lett.*, **15**, 399 (1977).
- 108 Pepper D.C., *J. Polym. Sci.*, **62**, 65 (1978).
- 109 Pepper D.C., *Makromol. Chem. Macromol. Symp.*, **60**, 267 (1992).
- 110 Gupta P.K., Gupta M. *Biomaterials* **26**, 3995 (2005).
- 111 Goodwin S., Peterson, C., Hoh, C., y Bittner, C., *J. Magn. Magn. Mater.* **194**, 132 (1999).
- 112 Newman A.W., "Micromeritics". En: "Physical Characterization of Pharmaceutical Solids", Ed.: Brittain H.G., Marcel Dekker Inc., Nueva York, pp. 253-280 (1995).

6. Bibliografía.

- 113 López-Gonzales J. D., Carpenter F.G., Deitz V.R., *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, **55**, 11 (1955).
- 114 Silverstein R.M., Webster F. X., "Infrared Spectrometry". En: "Spectrometric Identification of Organic Compounds", 6° Ed., John Wiley & Sons Inc., Nueva York, pp. 71-144 (1998).
- 115 Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., "Principios de Análisis Instrumental", 5° Ed., Mc Graw Hill, Madrid, pp. 481-536 (2001).
- 116 Bugay D.E., "Magnetic Resonance Spectroscopy". En: "Physical Characterization of Pharmaceutical Solids", Ed.: Brittain H.G., Marcel Dekker Inc., Nueva York, pp. 93-125 (1995).
- 117 Silverstein R.M., Webster F.X., "Proton Magnetic Resonance Spectrometry". En: "Spectrometric Identification of Organic Compounds", 6° Ed., John Wiley & Sons Inc., Nueva York, pp. 144-216 (1998).
- 118 Silverstein R.M., Webster F.X., "¹³C-NMR Spectrometry". En: "Spectrometric Identification of Organic Compounds", 6° Ed., John Wiley & Sons Inc., Nueva York, pp. 217-249 (1998).
- 119 Callister W.D. Jr., "Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los Materiales (Tomo II)", Reverté, Barcelona, pp. 685-717 (1996).
- 120 Mercoureff W., "Propriétés Magnétiques des Solides et Propriétés Similaires". En: "Aspects Modernes de la Physique des Solides", Masson & Cie, París, pp. 75-103 (1969).
- 121 O'Brien R.W., White L.R., *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **274**, 1607 (1978).
- 122 Hunter R.J., "Foundations of Colloid Science (Vol. I)", Oxford University Press, Oxford (1987).

- 123 Hunter R.J., "Zeta Potential in Colloid Science", Academic Press, Nueva York (1981).
- 124 Lyklema J., "Structure of the Solid/Liquid Interface and the Electrical Double Layer". En: "Solid/Liquid Dispersions", Ed.: Tadros T. F., Academic Press, Londres, pp. 63-90 (1987).
- 125 Lyklema J., "Fundamentals of Interface and Colloid Science (Vol. II): Solid-Liquid Interfaces", Academic Press, Londres (1995).
- 126 Van Olphen H.J., "An Introduction to Clay Colloidal Chemistry", 2º Ed., Wiley, Nueva York (1977).
- 127 Russel W.B., Saville D.A., Schowalter W.R., "Colloidal Dispersions", Cambridge University Press, Cambridge (1989).
- 128 Dukhin S.S., "Development of Notions as to the Mechanism of Electrokinetic Phenomena and the Structure of the Colloid Micelle". En: "Surface and Colloid Science (Vol. VII)", Ed.: Matijević E., Wiley, Nueva York, pp. 1-47 (1974).
- 129 López García J.J., Moya A.A., Horno J.J., Delgado A.V., González-Caballero F., *J. Colloid Interface Sci.*, **183**, 124 (1996).
- 130 Lyklema J., *J. Colloid Interface Sci.*, **58**, 242 (1977).
- 131 Dukhin S.S., Derjaguin B.V., "Equilibrium Double Layer and Electrokinetic Phenomena". En: "Surface and Colloid Science (Vol. VII)", Ed.: Matijević E., Wiley, Nueva York, pp. 49-272 (1974).
- 132 Zukoski IV C.F., Saville D.A., *J. Colloid Interface Sci.*, **114**, 32 (1986).
- 133 Mangelsdorf C.S., White L.R., *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **86**, 2859 (1990).

6. Bibliografía.

- 134 Mangelsdorf C.S., White L.R., *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **94**, 2441 (1998).
- 135 Mangelsdorf C.S., White L.R., *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **94**, 2583 (1998).
- 136 Lyklema J., Minor M., *Colloids Surfaces A*, **140**, 33 (1998).
- 137 Panofski W.K.H., Phillips M., "*Classical Electricity and Magnetism*". Addison-Wesley, Reading (1975).
- 138 Ohshima H., "*Interfacial Electrokinetic Phenomena*". En: "*Electrical Phenomena at Interfaces*", 2° Ed., Eds.: Ohshima H., Furusawa K., Marcel Dekker, Nueva York, pp. 19-55 (1998).
- 139 Landau L.D., Lifshitz E.M., "*Fluid Mechanics*", Pergamon Press, Oxford (1959).
- 140 Morrison F.A., *J. Colloid Interface Sci.*, **34**, 210 (1970).
- 141 Overbeek J.H.G., *Adv. Colloid Interface Sci.*, **3**, 97 (1950).
- 142 James A.M., en: "*Surface and Colloid Science (Vol. IX)*", Eds.: Good R.J., Stromberg R.S., Plenum Press, Nueva York (1979).
- 143 Lyklema J., Overbeek J.G., *J. Colloid Interface Sci.*, **16**, 501 (1961).
- 144 Hunter R.J., *J. Colloid Interface Sci.*, **22**, 231 (1966).
- 145 Henry D.C., *Proc. Roy. Soc.*, **133A**, 106 (1931).
- 146 Overbeek J.T.G., *Kolloid Beih.*, **54**, 287 (1943).
- 147 Booth F., *Trans. Faraday Soc.*, **44**, 955 (1948).

- 148 Booth F., *Nature*, **161**, 83 (1948).
- 149 Booth F., *Proc. Roy. Soc.*, **203A**, 514 (1950).
- 150 Derjaguin B.V., Dukhin S.S., "Nonequilibrium Double Layer and Electrokinetic Phenomena". En: "Surface and Colloid Science (Vol. VII)", Ed.: Matijević E., Wiley, Nueva York, pp. 273-335 (1974).
- 151 Wiersema P.H., Loeb A.L., Overbeek J.T.G., *J. Colloid Interface Sci.*, **22**, 78 (1966).
- 152 Kallay N., Torbić Ž, Matijević E., *J. Phys. Chem.* 95, 7028 (1991).
- 153 Matijević E., "Interfacial Electrokinetics Electrophoresis" En "Interfacial Electrokinetics Electrophoresis" , Ed.: Delgado A.V., Marcel Dekker, Nueva York, pp. 199-218 (2002).
- 154 Müller R.H., Lherm C., Herbort J., Blunk T., Couvreur P., *Int. J. Pharmaceutics.* **84**, 1 (1992).
- 155 Van Oss C.J., Good R.J., Chaudhury M.K., *J. Colloid Interface Sci.*, **111**, 378 (1986).
- 156 Keesom W.H., *Physik*, **22**, 129, 643 (1921).
- 157 Debye P., *Physik*, **22**, 302 (1921).
- 158 London F.Z., *Physik*, **63**, 245 (1930).
- 159 Overbeek J.Th.G., "Electrokinetic Phenomena". En: "Colloid Science (Vol. I)", Ed.: Kruyt H.R., Elsevier, Amsterdam (1952).
- 160 Fowkes F.M., *J. Phys. Chem.*, **67**, 2538 (1963).

6. Bibliografía.

- 161 Fowkes F.M., Mostafa M.A., *I. E. C. Prod. Res. Div.*, **17**, 3 (1978).
- 162 Chaudhury M.K., Good R.J., *J. Colloid Interface Sci.*, **94**, 292 (1983).
- 163 Chaudhury M.K., *J. Controlled Interface Sci.*, **119**, 174 (1987).
- 164 Lifshitz E.M., *Zh. Eksp. Teo. Fiz.*, **29**, 94 (1955).
- 165 Israelachvili J., *"Intermolecular and Surface Forces"*, 2º Ed., Academic Press, Londres (1991).
- 166 Ninhan B.W., Parsegian V.A., *J. Biophys.*, **10**, 646 (1970).
- 167 Parsegian V.A., Ninhan B.W., *Nature*, **224**, 1197 (1969).
- 168 Van Olphen H., *"Clay Colloid Chemistry"*, Wiley, Nueva York (1977).
- 169 Allen L.M., Matijević E., *J. Colloid Interface Sci.*, **31**, 287 (1969).
- 170 Durán J.D.G., Guindo M.C., Delgado A.V., *J. Colloid Interface Sci.*, **173**, 436 (1995).
- 171 Vera P., Gallardo V., Salcedo J., Delgado A.V., *J. Colloid Interface Sci.*, **177**, 553 (1995).
- 172 Laskowski J.S., Pugh R.J., *"Dispersions Stability and Dispersing Agents"*. En: *"Colloid Chemistry in Mineral Processing"*, Elsevier, Londres (1992).
- 173 Pashley R.M., *"Interparticulate Forces"*. En: *"Colloid Chemistry in Mineral Processing"*, Ed.: Laskowski J.S., Ralston J., Elsevier, Londres (1992).
- 174 Christenson H.K., *J. Disp. Sci. Technol.*, **9**, 171 (1988).
- 175 Christenson H.K., Horn R.G., *Chemical Scripta*, **25**, 37 (1985).

- 176 Horn R.G., Israelachvili J., *J. Chem. Phys.*, **75**, 1400 (1981).
- 177 Good R.J., "Contact Angle, Wetting and Adhesion: A Critical Review". En: "Contact Angle, Wettability and Adhesion", Ed.: Mittal K.L., Utrecht (1993).
- 178 Adamson A.W., "Physical Chemistry of Surfaces", 4^o Ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1982).
- 179 Van Oss C.J., *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **78**, 1 (1993).
- 180 Van Oss C.J., "Interfacial Forces in Aqueous Media", Marcel Dekker Inc., Nueva York (1994).
- 181 Van Oss C.J., Good R.J., *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A26**, 1183 (1989).
- 182 Van Oss C.J., Good R.J., Chaudhury M.K., *Sep. Sci. Technol.*, **22**, 1 (1987).
- 183 Van Oss C.J., Chaudhury M.K., Good R.J., *Adv. Colloid Interface Sci.*, **28**, 35 (1987).
- 184 Van Oss C.J., Chaudhury M.K., Good R.J., *Chem. Rev.*, **88**, 927 (1988).
- 185 Van Oss C.J., Good R.J., Chaudhury M.K., *Langmuir*, **4**, 884 (1988).
- 186 Good R.J., Girifalco L.A., *J. Phys. Chem.*, **64**, 561 (1960).
- 187 Derjaguin B.V., *Dis. Faraday Soc.*, **18**, 85 (1954).
- 188 Hamaker H.C., *Physica*, **4**, 1058 (1937).
- 189 Visser J., *J. Advan. Colloid Interface Sci.*, **3**, 331 (1972).
- 190 Neumann A., Omenyi S.N., van Oss C.J., *Colloid Polymer Sci.*, **257**, 413 (1979).

6. Bibliografía.

- 191 Chibowski E., Kerkeb M.L., González-Caballero F., *Langmuir*, **9**, 2493 (1993).
- 192 Durán J.D.G., Delgado A.V., González-Caballero F., Chibowski E., *Mater. Chem. Phys.*, **38**, 42 (1994).
- 193 Neumann A., Good R.J., *J. Colloid Interface Sci.*, **38**, 341 (1972).
- 194 Janczuk B., Chibowski E., Bialopiotrowicz T., *J. Colloid Interface Sci.*, **102**, 553 (1984).
- 195 Janczuk B., Chibowski E., Bialopiotrowicz T., *Mater. Chem. Phys.*, **15**, 489 (1987).
- 196 Janczuk B., Chibowski E., Bialopiotrowicz T., González-Caballero F., *Colloids and Surfaces*, **35**, 41 (1989).
- 197 Good R.J., *J. Colloid Interface Sci.*, **59**, 3 (1977).
- 198 Chibowski E., González-Caballero F., *Langmuir*, **9**, 330 (1993).
- 199 Plaza R.C., Zurita L., Durán J.D.G., González-Caballero F., Delgado A.V., *Langmuir*, **14**, 6850 (1998).
- 200 Chibowski E., *J. Adhesion Sci. Technol.*, **6**, 1069 (1992).
- 201 Chibowski E., Holysz L., *Langmuir*, **8**, 710 (1992).
- 202 Janczuk B., Chibowski E., Guindo M.C., Wójcik W., González-Caballero F., *Mater. Chem. Phys.*, **37**, 64 (1993).
- 203 Couvreur P., Grislain L., Lenaerts V., Brasseur P., Guiot P., Biernacki A., "Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Carrier for Antitumor Agents", En: "Polymeric Nanoparticles and Microspheres", Ed.: Guiot P., Couvreur P., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 27-93 (1986).

- 204 Chiannikulchai N., Drionich Z., Benoît J.P., Parodi A.L., Couvreur P., *Select. Cancer Ther.*, **5**, 1 (1989).
- 205 Chiannikulchai N., Ammoury N., Caillon B., Devissaguet J.P., Couvreur P., *Cancer Chem. Pharm.*, **26**, 122 (1990).
- 206 Vauthier C., Dubernet C., Chauvierre C., Brigger I., Couvreur P., *J. Control. Rel.*, **93**, 151 (2003).
- 207 Vauthier C., Dubernet C., Fattal E., Pinto-Alphandary H., Couvreur P., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**, 519 (2003).
- 208 Brigger I., Morizet J., Laudani L., Aubert G., Appel M., Velasco V., Terrier-Lacombe M.J., Desmaële D., d'Angelo J., Couvreur P., Vassal G., *J. Control. Rel.*, **100**, 29 (2004).
- 209 Juliano R.L., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2**, 31 (1988).
- 210 Pouliquen D., Chouly C., "Magnetic Microcarriers for Medical Applications". En: "The MML Series (Vol. 2): Medical & Biotechnology Applications", Ed.: Arshady R., Citus Books, Londres, pp. 343-382 (1999).
- 211 Lemaire L., Arellano M., Malet-Martino M.C., Martino R., De Forni M., *Bull. Cancer*, **81**(12), 1057 (1994).
- 212 Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A.. "Principios de Análisis Instrumental", 5º Ed., Mc Graw Hill, Madrid, pp. 322-352 (2001).
- 213 Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A.. "Principios de Análisis Instrumental", 5º Ed., Mc Graw Hill, Madrid, pp. 353-378 (2001).
- 214 Barberi-Heyob M., Watelet M., Merlin J.L., Bleyer C., Schroeder B., *Bull. Cancer.*, **82**(12), 1025 (1995).

6. Bibliografía.

- 215 Olsen E.D., "Modern Optical Methods of Analysis", McGraw Hill, Nueva York (1975).
- 216 Sikora K., Advani S., Koroltchouk V., Magrath I., Levy L., Pinedo H., Schwartzmann G., Tattersall M., Yan S., *Annals of Oncology*, **10**, 385 (1999).
- 217 Caraballo I., Álvarez-Fuentes J., Melgoza L.M., Millán M., Holgado M.A., Rabasco A.M., Fernández-Arévalo M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **18**(1-2), 281 (1998)
- 218 McCarron P. A., Woolfson A. D., Keating S. M., *J. Pharm. Pharmacol.*, **52**, 1451 (2000).
- 219 Zhuo R. X., Du B., Lu Z. R., *J. Control. Rel.*, **57**, 249 (1999).
- 220 Fawaz F., Guyot M., Lagueny A. M., Devissaguet J. Ph., *Int. J. Pharm.*, **154**, 191 (1997).
- 221 Müller R. H., Lherm C., Herbolt J., Couvreur P., *Colloid Polym. Sci.*, **269**, 147 (1991).
- 222 Arias J.L., Gallardo V., Ruiz M.A., Delgado A.V., *Int. J. Pharm.*, en prensa (2006).
- 223 Arias J.L., Gallardo V., López-Viota M., Delgado A.V., *J. Pharm. Pharmacol.*, en prensa (2006).
- 224 Soppimath K. S., Aminabhavi T. M., Kulkarni A. R., Rudzinski W. E., *J. Control. Rel.*, **70**, 1 (2001).
- 225 Calvo F.A., Gómez-Espín M., Díaz-González J.A., Cantalapiedra R., Marcos P., Alvarado A., García-Alfonso P., Herranz R., Álvarez E., *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, **51**(5), 1264 (2001).

- 226 Couvreur P., Kante B., Roland M., Guiot P., Bauduin P., Speiser P., *J. Pharm. Pharmacol.*, **31**, 331 (1979).
- 227 Radwan M. A., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **21**(20), 2371 (1995).
- 228 Baszkin A., Couvreur P., Deyme M., Henry-Michelland S., Albrecht G., *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 973 (1987).
- 229 Llovet M.I., Egea M.A., Valero J., Alsina M.A., García M.L., Chauvet A., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **21**(15), 1761 (1995).
- 230 www.bioprocess.apbiotech.com
- 231 Peracchia M.T., Vauthier C., Popa M., Puisieux F., y Couvreur P., *S.T.P. Pharma Sci.* **7**(6), 513 (1997).
- 232 Fontana G., Pitarresi G., Tomarchio V., Carlisi B., San-Biagio P.L., *Biomaterials*, **19**, 1009 (1998).
- 233 Losa C., Calvo P., Castro E., Vila-Jato J.L., Alonso M.J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **43**, 548 (1991).
- 234 Gulati M., Grover M., Singh S., Singh M., *Int. J. Pharm.*, **165**, 129 (1998).
- 235 Brasseur N., Brault D., Couvreur P., *Int. J. Pharm.* **70**: 126 (1991).
- 236 Lenaerts V., Couvreur P., Christiaens-Leyh D., Joiris E., Roland M., Rollman B., Speiser P., *Biomaterials* **5**: 65 (1984).
- 237 Müller R.H., Lherm C., Herbort J., Couvreur P., *Biomaterials* **11**: 590 (1990).
- 238 Stein M., Hamacher E., *Int. J. Pharm.* **80**: R11 (1992).
- 239 O'Sullivan C., Birkinshaw C., *Polym. Degrad. Stab.* **78**: 7 (2002).