

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA
FARMACÉUTICA



SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS CONSTITUIDAS
POR NÚCLEO MAGNÉTICO Y
RECUBRIMIENTO POLIMÉRICO

TESIS DOCTORAL

MARGARITA LÓPEZ-VIOTA GALLARDO

GRANADA, 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Margarita López Viota Gallardo
D.L.: GR.1907-2008
ISBN: 978-84-691-5979-8

D^a. M^a Adolfinia Ruiz Martínez, 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

**DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS CONSTITUIDAS POR
NÚCLEO MAGNÉTICO Y RECUBRIMIENTO POLIMÉRICO
COMO TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS**

ha sido realizado en los Departamentos de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, y Física Aplicada, bajo nuestra dirección, por la Licenciada de Grado D^a. Margarita López-Viota Gallardo, y constituye su Tesis Doctoral.

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

Granada, 22 de julio de 2008

Fdo.: M^a Adolfinia Ruiz Martínez. Fdo.: José Luis Arias Mediano.

Fdo.: Ángel V. Delgado Mora.

La doctoranda,

Margarita López-Viota Gallardo.

Después de un largo y tedioso, pero a la vez desafiante, período para culminar este trabajo, una se da cuenta de que las palabras más importantes y sinceras que va a escribir pertenecen a este apartado.

La culminación de este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración desinteresada de muchas personas que a continuación se mencionan. A todos ellos mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, al Profesor González Caballero, por haberme acogido, sin condición alguna, en el seno del grupo de investigación, por su constante ayuda desinteresada, y por hacer lo que pocos en su caso habrían hecho, remarco mi más sincero agradecimiento.

En segundo lugar pero no por ello de menor importancia, a mis directores, los doctores José Luis Arias Mediano, Ángel Delgado Mora y M^a Adolfinia Ruiz Martínez, por su continua ayuda, su apoyo constante y por su confianza en mí desde el primer momento. No siempre se tiene la suerte de contar con tres personas de tanta valía respaldando tu trabajo, razón por la que me siento muy afortunada. Por todo ello, y más, quiero expresaros mi más sincera gratitud.

He de reconocer el esfuerzo, tesón y dedicación de una persona muy especial para mí, mi hermano el Dr. López-Viota, que siempre me ha apoyado en mis decisiones y ha estado ahí en los buenos momentos y en los no tan buenos.

I also would like to mention and acknowledge Professor Dr. Karin Stana-Kleinschek, for the availability, disposition and care that she always showed to me since I joined her group in Maribor. Because thanks to her I have grown up not only as a researcher, but also as a woman, hvala lepa.

A la Dra. Morales Hernández, en quien desde hace tanto tiempo tengo depositada una absoluta confianza, por su inestimable ejemplo y predisposición a lo largo de estos años.

Asimismo, debo mucho a las personas con las cuales he desarrollado mi trabajo en el seno del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, en particular a mis compañeras de laboratorio: Beatriz, Gema, Auxí, Clara, Marian, M^a José. Ellas han contribuido a hacer de éste un verdadero trabajo de equipo.

A Gema, Amparo, Eva y Hind. Gracias a ellas todo ha sido más fácil. No sé si esto hubiera sido posible sin vuestra ayuda. Lo que sí sé es que sin ella, habría sido mucho más difícil. Gracias.

A mis compañeros del Departamento de Física Aplicada, unos que ya son doctores, Juan de Dios, M^a del Mar, Cecilia, Silvia, Marisa, Modesto, Juan, Fernando y otros que se encuentran luchando por ello, Ana, Raúl, Guillermo. Gracias a todos por vuestro apoyo incesante y porque ha sido todo un placer el haber trabajado con vosotros.

A la Dra. Quíndo Olaya por su predisposición en todo momento y por sus grandes aportaciones en la realización de esta Tesis.

I would not like to forget my acknowledgement to all the members of the "Laboratory for Characterization and Processing of Polymers", specially to Simona, Silvo, Manja, Lidija, Vida, Zdenka, Tanja, Tea, Nika and Mitija, because thanks to them, I felt as I were at home. And specially to Dr. Fernanda Costa da Sousa, for supporting me in those days where the things didn't work.

Agradecer hoy y siempre a mi familia, las personas más importantes de mi vida, mis padres Julián y Visi, mis hermanos Cristina, Javier, Julián, Anastasia, Chema y al nuevo miembro de la familia, Lara, porque sin vosotros hubiese sido imposible haber llegado a este punto.

A Chema, por compartir conmigo muchos momentos tanto alegres como tristes, por tener siempre tendida su mano, por escucharme, en fin, por darme cariño, ánimo y apoyo; por todo ello y por más, gracias.

Con la alegría de llegar a la recta final, deseo dejar constancia de mi agradecimiento a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, con sus altos y bajos y que desde lo más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

Por último, el agradecimiento más emotivo para la persona que ha sido, y será siempre, mi modelo a seguir en la vida.

Gracias, mamá.

A todos MIL GRACIAS de todo corazón y que Dios les bendiga.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. Introducción	1
1.1. Sistemas transportadores de fármacos	1
1.1.1. Transportadores magnéticos coloidales de fármacos.....	10
1.1.2. Algunos ejemplos	15
1.1.3. Guiado y localización	18
1.2. Antineoplásicos	21
1.2.1. Generalidades	21
1.2.2. 5-fluorouracilo	25
1.3. Antiinflamatorios.....	31
1.3.1. Generalidades	33
1.3.2. Diclofenaco.....	38
1.4. Objetivos y plan de trabajo.....	41
1.4.1. Objetivos.....	41
1.4.2. Contribución del trabajo propuesto.....	44

1.4.3. Metodología y plan de trabajo	45
--	----

CAPÍTULO 2. Síntesis y caracterización49

2.1. Síntesis y estudio morfológico	49
2.1.1. Hierro carbonilo.....	51
2.1.2. Látex de etilcelulosa	56
2.1.3. Partículas compuestas.....	71
2.2. Estructura, composición química y magnetismo	77
2.2.1. Superficie específica.....	77
2.2.2. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier	82
2.2.3. Resonancia magnética nuclear.....	89
2.2.4. Propiedades magnéticas.....	96

CAPÍTULO 3. Propiedades eléctricas109

3.1. Introducción	109
3.2. Descripción clásica de la doble capa eléctrica	111
3.3. Fenómenos electrocinéticos. Potencial zeta	119
3.4. Metodología experimental.....	126
3.5. Resultados y discusión	127

CAPÍTULO 4. Termodinámica superficial133

4.1. Introducción	133
4.2. Interacciones superficiales	134
4.3. Metodología experimental.....	146
4.4. Resultados y discusión. Análisis de la naturaleza hidrófoba / hidrófila.....	152

CAPÍTULO 5. Transporte y liberación de fármacos	159
5.1. Introducción.....	159
5.2. Procedimiento de determinación experimental de la vehiculización de fármaco.	162
5.2.1. Incorporación superficial de fármaco	170
5.2.2. Absorción de fármaco.....	172
5.3. Liberación <i>in vitro</i> de fármaco. Metodología.....	173
5.4. Absorbancia óptica de las disoluciones de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico.....	175
5.4.1. Validación del método espectrofotométrico	181
5.5. Adsorción superficial de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico....	191
5.6. Absorción de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico.....	199
5.7. Liberación <i>in vitro</i> de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico	203
 CAPÍTULO 6. Conclusiones	 209
 CAPÍTULO 7. Bibliografía.....	 215
 ENGLISH SUMMARY	

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Sistemas transportadores de fármacos.

A veces se considera que la ciencia de las interfases y de los sistemas coloidales es una parte de la Fisicoquímica con interés sobre todo académico. Estas ideas, sin embargo, se han ido desechando en los últimos años dado que, en la práctica, la fenomenología de las superficies e interfases se infiltra en muchas áreas de la tecnología, que van desde el desarrollo y fabricación de nuevos productos hasta fenómenos con implicaciones en la Biología y la Ciencia del Medio Ambiente. Con todo, muchos aspectos de importancia crítica de la

ingeniería de sistemas coloidales se considera que están subexplotados o mal entendidos. Conseguir la integración de un conocimiento bien fundamentado de la ciencia de las superficies con su aplicabilidad en procesos tecnológicos puede suponer, según muchos autores, un paso importante en el desarrollo de nuevas técnicas en muy diversos campos.

Como es sabido, la actividad biológica de una sustancia terapéuticamente activa (un fármaco) depende, ante todo, de la naturaleza de su interacción con el tejido u órgano diana. Para que la interacción se produzca, es necesario, en primer lugar, que el fármaco esté en el sitio deseado en cantidad suficiente como para conseguir la respuesta buscada: lo que significa que el agente terapéutico debería liberarse en un lugar concreto del organismo y a una velocidad controlable. Esto se puede conseguir si la sustancia activa se formula adecuadamente antes de la administración. Por ejemplo, la misma cantidad de principio activo puede tener un efecto diferente cuando viene formulada como solución oral de cuando se encuentra en forma de cápsulas o comprimidos, debido a las diferencias en la velocidad a la que el principio activo es absorbido por el tubo digestivo en estos casos. La preparación de medicamentos a partir de las sustancias activas puras es, por ello, un extenso e importante campo dentro de las ciencias farmacéuticas, que incorpora elementos de la ingeniería y ciencia de los materiales, de la química física, de la ciencia de los polímeros, de la química de las soluciones y de la bioquímica, entre otros (Craig, 1994).

Cuando un fármaco se administra a un paciente, debe atravesar una serie de membranas lipídicas hasta llegar al lugar donde se necesite su acción. El mecanismo de transporte a través de las barreras biológicas es todavía objeto de debate, aunque suele admitirse que la mayoría de los fármacos las atraviesan por difusión pasiva. Por otro lado si bien muchos fármacos pueden formularse para diversas vías de administración, la oral es la más frecuentemente usada, puesto que permite la absorción satisfactoria de un amplio número de principios activos.

Sin embargo, una gran variedad de fármacos no pueden administrarse por vía oral, pues la cantidad inalterada absorbida a través de la membrana del tracto gastrointestinal es demasiado pequeña como para producir un efecto terapéutico. Como resultado de estas y otras dificultades, muchos fármacos deben administrarse por rutas alternativas, como la vía de administración parenteral, la tópica, la inhalatoria, la rectal o la intranasal, entre otras. La administración parenteral es particularmente importante porque evita muchos de los problemas asociados con la liberación oral de fármacos. Aparte la distribución de los principios activos inyectados dependerá de la ruta de administración; en este sentido aunque la administración intraarterial suele indicarse a menudo como un método para direccionar los fármacos a los órganos diana, diversas dificultades asociadas con esta ruta limitan su utilización. En concreto, el espesor de las arterias, la alta presión de la sangre en las mismas y el considerable riesgo asociado a la administración de la inyección, hacen preferibles las vías de administración intravenosa, intramuscular o subcutánea en la mayoría de los casos.

No obstante, hay ocasiones en las que las formas de administración convencional (tabletas, cápsulas, disoluciones inyectables, etc.), son inapropiadas. A menudo, las formas de dosificación convencionales requieren una administración repetida con objeto de mantener la concentración de fármaco en la sangre a un nivel suficientemente alto como para asegurar un efecto terapéutico. La administración crónica puede resultar un inconveniente para el paciente, conduciendo a un pobre cumplimiento del régimen de dosificación prescrito. Además, una administración repetida puede provocar considerables fluctuaciones en los niveles plasmáticos de fármaco entre dosis, causando a veces efectos tóxicos secundarios a una respuesta inadecuada al principio activo cuando las concentraciones plasmáticas se encuentran por encima del nivel terapéutico. Un método para solucionar estos problemas es el desarrollo de sistemas de liberación controlada (también llamada liberación modificada), en los que el fármaco es liberado desde la forma de dosificación a una velocidad constante (o casi constante) durante un periodo prolongado de tiempo. Estas formas de dosificación pueden ser administradas por vía oral en dispositivos tales como las matrices poliméricas, desde las que el fármaco se difunde lentamente, o como gránulos esféricos recubiertos por una película polimérica insoluble. Alternativamente, los sistemas de liberación controlada pueden formularse para administración parenteral, por ejemplo, como sistemas acuosos de partículas para vía intravenosa o como suspensiones aceitosas para uso intramuscular. También se han diseñado preparaciones de liberación modificada para la administración tópica, nasal, vaginal o inhalatoria.

Una aproximación relacionada es el desarrollo de sistemas transportadores direccionales de fármacos. Aunque es deseable que el principio activo difunda al interior del tejido de interés, una proporción significativa de aquel se distribuirá hacia otras regiones del cuerpo, lo que lleva asociado dos importantes inconvenientes: en primer lugar, el fármaco puede actuar en otros órganos o tejidos además del diana, aumentando la probabilidad de efectos adversos, y, en segundo lugar, la concentración del principio activo en el lugar de acción puede ser baja, dando lugar a una pobre acción. Por lo tanto, se hace patente la necesidad de dirigir el fármaco hacia el tejido u órgano de interés en lugar de permitir una libre circulación sistémica.

Los sistemas transportadores se utilizan para liberar el principio activo en un área específica del cuerpo (direccionalidad) y para retardar y prolongar su liberación (liberación modificada). De entre ellos, los sistemas dispersos se han utilizado extensamente con ambos propósitos, principalmente para la direccionalidad. De forma general, son sistemas constituidos por suspensiones acuosas de partículas de origen polimérico que contienen principios activos, normalmente administradas por vía parenteral. Las características que debe cumplir un sistema coloidal para poder ser utilizado por vía parenteral son (Craig, 1994):

- Deben facilitar que el fármaco se acumule selectivamente en el lugar de acción requerido, con concentraciones residuales muy pequeñas en la circulación sistémica.

- Las partículas portadoras deben ser capaces de transportar una cantidad apropiada de fármaco porque si no lo hacen, la dosis requerida puede ser demasiado grande como para una administración práctica.
- El fármaco debe liberarse a una velocidad adecuada en el lugar de acción.
- El coloide debe ser estable *in vitro* y en su tránsito al lugar requerido *in vivo*.
- El sistema debe presentar una toxicidad e inmunogenicidad mínimas, además de ser biodegradable para prevenir su acumulación orgánica.
- El sistema debe ser relativamente simple de producir a nivel industrial.
- Las autoridades sanitarias deben reconocer los materiales que constituyen el coloide como no tóxicos.

Los sistemas coloidales se administran principalmente por vía parenteral como se ha indicado, pues, generalmente, las partículas no son absorbidas intactas por otras rutas como la gastrointestinal. 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 (Allen y Cullis., 2004; Arruebo y cols., 2007; Craig, 1994; Durán y cols., 2008; Pankhurst y cols., 2003).

En cuanto al tamaño de las partículas transportadoras, se sabe que si éste excede de 7 μm se acumularán en los pulmones, ya que a este nivel se localiza la primera red de capilares que las partículas se encuentran. Las partículas de pequeño tamaño pasarán esta red y serán retiradas de la circulación sanguínea principalmente por el sistema inmune. Las células y los tejidos responsables de la eliminación física de las partículas de la circulación sanguínea constituyen el Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) (van Furth, 1970). Los principales tejidos asociados con el SFM son el hígado, la médula ósea y el bazo, de los cuales el primero es normalmente el más importante. Por ejemplo, se ha comprobado (Bradfield, 1980) que después de inyectar por vía intravenosa glóbulos rojos de oveja en ratones, el 90 % es retenido en el hígado, el 5 % en el bazo y un porcentaje ínfimo en la médula ósea. Dentro del hígado, las células de Kupffer son las principales responsables de la eliminación por fagocitosis de las partículas, aunque los hepatocitos y las células endoteliales también desempeñan un cierto papel. También hay macrófagos en los pulmones, pero estos tienden a estar asociados con la membrana alveolar en la interfase aire-membrana más que en los capilares alveolares, por lo que este no es un lugar significativo en la eliminación de las partículas de la circulación sanguínea.

El SFM constituye el principal obstáculo para el uso de los sistemas coloidales transportadores de fármacos, pues cualquier coloide inyectado será rápidamente retirado de la circulación en el

primer minuto posterior a la inyección. Sin embargo, este inconveniente se puede convertir en una ventaja si el objetivo es tratar cualquier enfermedad de este sistema. En concreto, la lepra, la tuberculosis y la leptospirosis conllevan una infección de las células macrófagas, por lo que es teóricamente posible direccionar el fármaco a esas células incorporándolo en partículas coloidales (Fidler y cols., 1982). Una forma de evitar el SFM consiste en suprimirlo, de modo que los coloides inyectados permanecerán en la circulación durante periodos de tiempo prolongados, aunque este método es en sí mismo peligroso por la inmunodeficiencia asociada que se genera en el paciente (Poste y Kirsh, 1983).

Cuando se inyecta una partícula coloidal en el torrente sanguíneo, diversos componentes de la sangre se adsorben sobre la superficie de ésta, proceso conocido como opsonización (Silverstein y cols., 1978). Los mecanismos involucrados son complejos pero, en general, se cree que moléculas flexibles como las proteínas no globulares y los polisacáridos se adhieren a la partícula mediante un gran número de enlaces, comparativamente débiles, por molécula. Se cree que moléculas más rígidas, como las proteínas globulares, sufren un reordenamiento estructural al adsorberse sobre la partícula circulante, posiblemente por ruptura de enlaces tipo van der Waals entre las partes hidrófobas del interior de la molécula. Esta ruptura de enlaces incrementa la flexibilidad de la proteína como un todo, aumentando también, como consecuencia, la entropía del sistema y haciendo irreversible el proceso de adsorción.

Después de la opsonización, las partículas son reconocidas por el SFM y se produce la fagocitación por los macrófagos. Se cree que aunque es difícil prevenir la eliminación de las partículas opsonizadas, es posible evitar el proceso de opsonización alterando las características superficiales de las partículas. El proceso de reconocimiento puede estar relacionado con el tamaño, la carga superficial y la naturaleza química del coloide (Bradfield, 1984; Hsu y Juliano, 1982). Las partículas con tamaño comprendido entre 300 nm y 2 μm , tienden a localizarse en las células de Kupffer del hígado, mientras que las que tienen un diámetro entre 100 y 300 nm tienden a hacerlo en los hepatocitos (Tomlinson, 1983). Se ha sugerido que las partículas cargadas negativamente son retenidas preferentemente a nivel hepático, mientras que las cargadas positivamente se acumulan a nivel pulmonar (Illum y Davis, 1982). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la carga superficial de una partícula antes de la inyección no será necesariamente la misma que cuando esté circulando en la sangre, una vez que haya tenido lugar el proceso de opsonización; por lo tanto, debe tenerse una gran cautela en la interpretación de los resultados. A pesar de que, tal y como se ha sugerido, todos los coloides adquieren una carga superficial negativa cuando han sido inyectados, hay cierta confusión sobre el papel de la carga inicial de la partícula en el proceso de opsonización (Wilkins y cols., 1979). En general, las partículas hidrófobas tienden a ser eliminadas a una mayor velocidad que las hidrófilas (van Oss y cols., 1975), por lo que una de las posibles consecuencias de la opsonización puede ser el hacer que las partículas se vuelvan más hidrófobas y, por lo tanto, que haya más probabilidad de que sean atrapadas y eliminadas por el SFM.

En la fase de opsonización 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. Por ello, 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 permite hacer que sean más hidrófilas, lo que retrasará su reconocimiento por el SFM y generará una estabilización estérica que reducirá la adhesión partícula-macrófago.

Otro problema asociado con la direccionalidad del principio activo es que, aunque el SFM sea evitado, las partículas también deben ser capaces de abandonar la circulación para acceder al órgano diana. Evidentemente, las partículas usadas como transportadores de fármacos no pueden simplemente difundir a través de las membranas capilares del mismo modo que lo hacen las moléculas, mucho más pequeñas. Sin embargo, si las partículas son retenidas de forma física en la red capilar del órgano y se produce la liberación lenta del fármaco, la extravasación de éste no es un problema, ya que difundirá a través de los capilares mientras las partículas quedan atrapadas en el sistema sanguíneo (Maeda y cols., 2003).

1.1.1. Transportadores magnéticos coloidales de fármacos.

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 surgió en los años 40 en el contexto de la purificación de las aguas residuales; dentro de las aplicaciones biológicas de esta tecnología destacan: el tratamiento de aguas residuales, la inmovilización enzimática, la separación magnética por afinidad de biomoléculas, la selección de un tipo de células entre una población celular, el transporte de fármacos y los biosensores (Dekker, 1989; Miyabayashi y Mattinson, 1988).

También en el campo biomédico se han propuesto numerosas y prometedoras aplicaciones de los coloides magnéticos de tamaño submicrométrico y nanométrico. Algunas de estas son: la terapia celular (separación y etiquetado celular), el tratamiento de tumores mediante hipertermia, imagen por resonancia magnética (como agentes de contraste), la reparación de tejidos y, particularmente, el transporte de fármacos (Arias y cols., 2001, 2007; Pankhurst y cols., 2003; Tarjat y cols., 2003; Gupta y Gupta, 2005).

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 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. De esta manera, 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 la eliminación del sistema coloidal por el SFM se verían retrasados, al estar concentradas las partículas en un lugar determinado del organismo por acción de un campo magnético, lo que impediría su libre distribución y llegada al hígado.

Las características que idealmente debe tener un transportador magnético de fármacos son (Senyei y cols., 1978):

- Pequeño tamaño (inferior a 1.4 μm), para permitir la distribución a nivel capilar y la perfusión uniforme al órgano o tejido diana.
- Una respuesta magnética adecuada a los campos y gradientes magnéticos externos alcanzables técnicamente, a la velocidad de flujo presente en los sistemas fisiológicos.
- Capacidad para transportar una amplia variedad de agentes terapéuticos en cantidad suficiente como para permitir el transporte de cantidades activas biológicamente, sin hacer que el organismo se cargue demasiado de material magnetizable.
- Velocidad controlable (o predecible) de liberación del fármaco en el lugar deseado.

- Propiedades superficiales que permitan una máxima biocompatibilidad y una mínima antigenicidad.
- Biodegradabilidad, y mínima toxicidad de los productos de degradación.

La acción del principio activo liberado por un transportador magnético coloidal en el lugar diana puede desarrollarse mediante varios mecanismos (Belikov y Kuregyan, 2001):

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

Los sistemas transportadores magnéticos de fármaco pueden diferenciarse en dos categorías principales según el origen de su recubrimiento (Pouliquen y Chouly, 1999):

- Celular: Eritrocitos, neutrófilos y linfocitos.
- Sintético:
 - Partículas

- Cápsulas
- Vesículas

La utilización de microtransportadores celulares magnéticos fue sugerida inicialmente por Zimmerman y Pilwat, (1976). En este sentido, los eritrocitos pueden comportarse como microrreservorios de un sistema de liberación lento y la técnica preferida para su obtención es la diálisis hipotónica (Iannone y cols., 1991; Lewis y Alpar, 1984; Müller y cols., 1996).

Las nanocápsulas magnéticas pueden prepararse mediante la polimerización del correspondiente monómero [p.ej.: alquilcianoacrilato (Okon y cols., 1994) o glutaraldehído (Ibrahim y cols., 1983)] en presencia de las partículas magnéticas. La matriz de tipo microcápsula magnética se prepara mediante la adición de una mezcla acuosa caliente de albúmina (Gupta y cols., 1994) o almidón (Hung y cols., 1990; Mosbach y Schroder, 1979), partículas de magnetita y el fármaco, en una fase oleosa en agitación continua, y enfriando a una temperatura de menos de 20 °C. El tamaño de partícula obtenido puede controlarse y la ultrasonificación permite la preparación de microcápsulas en el rango de tamaño de 0.2 a 2 µm. La preparación de las microcápsulas reservorias se realiza, entre otros métodos, mediante coacervación. De esta manera, se obtienen microcápsulas grandes (200 a 500 µm) y las partículas magnéticas presentes en la mezcla inicial pueden tener hasta 1.6 µm.

Las emulsiones magnéticas O/A se obtienen mediante la utilización de una dispersión de magnetita en ácido oleico o en oleato

de etilo (Mosbach y Schroder, 1979; Morimoto y cols., 1982; Morimoto y Akimoto, 1983) 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 (Morimoto y Akimoto, 1983; Kiwada y cols., 1986) 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 sistema tamponador. Los componentes magnéticos más utilizados son el hierro, la magnetita y la ferrita de bario, altamente dispersados.

1.1.2. Algunos ejemplos.

Los fármacos utilizados en el transporte magnéticamente controlado pueden clasificarse según su peso molecular en principios activos de bajo peso molecular (inferior a 1000 Da) y, en péptidos y proteínas (superior a 1000 Da). Los anticancerígenos que más han sido vehiculizados son la adriamicina (Widder y cols., 1978; Gupta y cols., 1986, 1988), la doxorubicina (Widder y cols., 1979; Senyei y cols., 1981) y la plasmina (Hung y cols., 1990; Mosbach y cols., 1979) en albúmina; la dactinomicina (Okon y cols., 1994) y el conjugado poli-L-lisina-metotrexato (Ibrahim y cols., 1983) en poliglutaraldehído; la mitomicina C (Kato y cols., 1979, 1984) en etilcelulosa; el 5-fluorouracilo y el ftorafur en poli(alquilcianoacrilatos) (Arias y cols., 2008a, b, c); la metilCCNu (Morimoto y Akimoto, 1983) en emulsiones; y la inulina (Kiwada y cols., 1986) en liposomas. Los eritrocitos magnéticos también han sido utilizados para el transporte local de acetilsalicilato para prevenir

la agregación plaquetaria (Samokhin y cols., 1987) y, para el transporte de diclofenaco sódico para tratar las articulaciones inflamadas doloridas (Müller y cols., 1996; Jain y cols., 1994). Entre los fármacos de elevado peso molecular en los que ha sido ensayado un guiado magnético externo destaca la insulina, entre otros péptidos y proteínas utilizados en endocrinología (Langer, 1983; Kost y cols., 1985; Saslawski y cols., 1988).

La eficacia terapéutica de un sistema de liberación modificada depende del mecanismo y velocidad de liberación del fármaco en el lugar diana. Hasta ahora, la eficacia de los transportadores vesiculares y celulares está limitada por problemas relacionados con el pobre arrastre magnético, la baja estabilidad y la rápida liberación *in vivo*. A pesar de que estos sistemas de transporte desarrollan algunas propiedades deseables como la biodegradabilidad y la no inmunogenicidad, su ejecución *in vivo* debe ser mejor estudiada. También, la reactividad química y la no degradabilidad de los componentes utilizados en la preparación de algunas nanocápsulas magnéticas, parecen complicar su aprobación para el transporte intravascular (Gupta y Hung, 1994).

Sin embargo, se ha demostrado el potencial de las microcápsulas magnéticas en el tratamiento experimental en pacientes con carcinomas (Kato, 1982; Kato y cols., 1979, 1981; Goldberg y cols., 1991; Audisio y cols., 1990), tumor de vejiga (Kato y cols., 1980) y hepatomas (Sako y cols., 1986). Las microcápsulas magnéticas de albúmina han demostrado su eficacia en el tratamiento

del sarcoma de Yoshida inducido en ratas (Widder y cols., 1979, 1983; Morris y cols., 1984).

Por otro lado, la oclusión de los vasos sanguíneos de un tumor mediante embolización puede permitir 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 (Alksne y cols., 1967) y de los hipernefomas (Turner y cols., 1975). Se ha demostrado que los coloides magnéticos son superiores a otros agentes que, principalmente, obliteran los vasos sanguíneos principales e inducen una circulación colateral. Para alcanzar la diminuta red vascular de los vasos sanguíneos pueden utilizarse pequeñas partículas, pero estas pasarán más fácilmente a través de las desviaciones arteriovenosas dando lugar a una embolización pulmonar o de otro tipo indeseable (Sako y cols., 1982). La administración magnéticamente controlada de partículas de hierro carbonilo (Barry y cols., 1981), microesferas de ferropolisacárido (Sako y cols., 1982) y microcápsulas de etilcelulosa magnética (Kato y cols., 1984), 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 (hipertermia) que calentarán así selectivamente el tumor (Sako e Hirota, 1986).

1.1.3. Guiado y localización

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 fuerza magnética que actúa sobre ellos debido a su imanación (M^p) y a la existencia de un gradiente de un gradiente de campo magnético. Por ejemplo, si Z es la dirección en la que se aplica el campo magnético y se supone que un gradiente está establecido en la misma dirección, la fuerza sobre una partícula cuyo momento magnético es μ , vale:

$$F_z = \mu \frac{dB}{dz} \quad (1)$$

Cuanto mayor sea la imanación de saturación (M_s) de las partículas, menor será el gradiente de campo magnético preciso para la retención del microtransportador magnético, y mayor será la eficacia del guiado magnético (Charles y Popplewell, 1980).

Para el transporte magnéticamente controlado de fármacos y la emboloterapia, el transportador magnético sólo quedará retenido en el órgano o tejido 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) (Gupta y Hung, 1994). Se acepta 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 % del transportador magnético que contenga un 20 % de magnetita (Kato y cols., 1984; Senyei y cols., 1978; Widder y cols., 1978).

En cuanto a la velocidad con que se produce el proceso de liberación del fármaco desde el sistema transportador magnético coloidal, se ha demostrado que esta velocidad puede incrementarse más de 30 veces mediante la exposición del sistema a un campo magnético externo oscilatorio (Langer, 1983). El mecanismo puede implicar el desplazamiento de las cadenas poliméricas con o sin la entrada de agua, la cual induce una mayor disolución del fármaco (Kost y cols., 1985; Saslawski y cols., 1988).

Diversos factores influyen en la distribución tisular de este tipo de transportadores (Ranney, 1988; Gupta y Hung, 1989). Parámetros como la vía de administración, ya que el destino de las partículas coloidales en el sistema circulatorio debe ser seguro y eficaz, es decir, con la mínima cantidad de partículas magnéticas transportar un máximo de fármaco hacia el lugar elegido; así como el tamaño, que afecta a la biodistribución de transportadores de fármaco no magnéticos, influyen igualmente en el guiado de los transportadores magnéticos (Lubbe y cols., 1999; Morimoto y cols., 1980).

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 (Gupta y Hung, 1988) y, en el caso de los eritrocitos y

otras células sanguíneas, por la resistencia al shock osmótico y a los fenómenos de turbulencia (Jain y Vyas, 1994).

La evaluación experimental de la distribución tisular de este tipo de transportadores ha sido estudiada en microcápsulas de albúmina que contienen en torno a un 20 % de partículas de magnetita (Gupta y Hung, 1994). 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. Por ejemplo, comparado con una disolución de adriamicina administrada por vía 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 magnético de 0.8 T logra la misma concentración de anticancerígeno en el lugar diana (Widder y cols., 1978). 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 perfiles farmacocinéticos diferentes según el tamaño de partícula, el tipo de campo magnético y la profundidad y permeabilidad del órgano o tejido diana (Gupta y Hung, 1990; Ovadia y cols., 1983).

En general, el uso de transportadores magnéticos está restringido por las dificultades propias del acceso al lugar diana y por la necesidad de un campo magnético externo (con intensidad de campo apropiada, gradientes de campo constantes y con la geometría adecuada), si bien este último inconveniente puede solucionarse con la utilización de implantes magnéticos introducidos en el lugar de acción

mediante cirugía menor (Durán y cols., 2008; Gupta y Hung, 1989, 1990).

1.2. Antineoplásicos.

1.2.1. Generalidades.

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 (Piédrola-Gil, 2001).

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 generar 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 antineoplásica 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. Los factores internos consisten en mutaciones puntuales que afectan a una base, translocaciones, 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. Los factores externos son los virus, las radiaciones (rompen el ADN mediante la formación de radicales libres) y los 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, el ADN o el ARN, o la división mitótica y, excepcionalmente, su acción es inhibir la síntesis de proteínas. Estos principios activos no muestran especificidad por las células tumorales; sin embargo, debido a que estas son las que más rápidamente se multiplican, actúan mayoritariamente sobre ellas. Por ello mismo, sus efectos secundarios se centran en las 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 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 años sesenta. Los primeros antimetabolitos en producir remisiones notables fueron los antifolatos (finales de los años cuarenta) y también los primeros en curar un tumor sólido (metotrexato) en los años sesenta (Hardman y cols., 2003).

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:

- Antimetabolitos. Actúan en la fase de síntesis del ciclo celular, alterando la síntesis de ADN y de ARN. Son análogos estructurales de los metabolitos que normalmente intervienen en los procesos de crecimiento y división.
- Productos naturales. Dentro de este grupo se encuentran los inhibidores de la mitosis, los inhibidores de las topoisomerasas, los antibióticos y las 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). En cualquier caso, provocan el cese del 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 las topoisomerasas y modificadores de la membrana celular; no suelen ser

específicos del ciclo celular. Las enzimas actúan rompiendo aminoácidos como la L-asparaginasa que rompe la asparagina.

- Agentes alquilantes. Tienen gran afinidad por el ADN y las proteínas, y adicionan a estos sus radicales muy reactivos. Enlazan cadenas de ADN impidiendo su replicación y la transcripción de ARN. Actúan en cualquier fase del ciclo celular.
- Otros compuestos. En tumores hormonodependientes son útiles diversas hormonas y sus antagonistas. Existen, además, otras sustancias de naturaleza muy diversa como los anticuerpos monoclonales y la miltefosina.

Uno de los principales obstáculos para curar la enfermedad cancerosa es el desarrollo de resistencias a los principios activos antitumorales por parte de las células neoplásicas. Es posible que, desde el principio, todas o una fracción de las células cancerosas sean intrínsecamente resistentes al fármaco (resistencia *de novo*). Pero, también es posible que las células inicialmente sensibles al fármaco antitumoral, puestas en contacto con éste, desarrollen procesos de adaptación utilizando mecanismos de diversa naturaleza, como la modificación de una proteína diana, el aumento del proceso de inactivación farmacológica, la disminución de la permeabilidad del principio activo en la célula, el aumento en la actividad de los mecanismos de salida o de expulsión del fármaco, o el aumento de la velocidad de reparación del ADN alterado.

1.2.2. 5-fluorouracilo.

El 5-fluorouracilo se comenzó a tomar en consideración para la terapia antineoplásica cuando Waisman (1957) lo ensayó en ratas para tratar la leucemia. Al año siguiente, Curreri y cols. (1958) realizaron los primeros ensayos clínicos con este principio activo. A partir de 1960 se utiliza en tumores sólidos después de los estudios que realizó Wilson en el carcinoma de vejiga (Wilson y cols., 1959). Ya en los años 60 se intenta reducir la toxicidad del 5-fluorouracilo (Lemon y Mozden, 1964).

En la década de los 70 se utilizaba combinado con otros fármacos como adriamicina o citoxano en el tratamiento del cáncer avanzado de próstata (Soloway y Tidwell, 1977) y con metotrexato en el adenocarcinoma mamario (Brown y Ward, 1978). En los años 80 se utiliza contra el cáncer de ovario combinado también con metotrexato y cisplatino (Conte y cols., 1985). También en esta década se estudia su utilización en los cánceres de cabeza y cuello (Forastiere y cols., 1987), en el colon-rectal (Weinerman y Orr, 1986) y en el de las glándulas salivares (Airoldi y cols., 1989). Durante los años 90 se extiende su uso en combinación con otros fármacos contra el cáncer de pecho y en los cánceres del tracto gastrointestinal (Teo y cols., 1995).

El 5-fluorouracilo pertenece al grupo de prioridad 1 en la clasificación que establece la Organización Mundial de la Salud para los antineoplásicos (Sikora y cols., 1999) 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 utiliza en la actualidad como monoterapia o como parte de terapia combinada en los siguientes casos (Cueto y cols., 2001; Flórez, 2003):

- Tratamiento paliativo (vía parenteral) de cánceres de mama, esófago, estómago, hígado, recto, cabeza y cuello, vejiga, riñón, próstata, cerviz, 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 o radioterapia.
- Tratamiento (vía tópica) de alteraciones cutáneas precancerosas o cancerosas como la queratosis solar y senil, la enfermedad de Bowen, y los epitelomas malignos superficiales simples o múltiples.

En terapia combinada se puede utilizar por ejemplo junto a ácido polínico en el cáncer gastrointestinal o, con ciclofosfamida y metotrexato o doxorubicina en el cáncer de mama (Cueto y cols., 2001; Flórez, 2003).

Del 5-fluorouracilo hay que reseñar como negativo su toxicidad y su alta capacidad para 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 o tejido diana, permitiría una reducción de la dosis neta administrada y,

así, sus efectos tóxicos. También se solucionaría la posible aparición de resistencias al localizarse el anticancerígeno en elevada concentración en las cercanías de la célula tumoral.

❖ **Estructura química.**

El 5-fluorouracilo es un bioisómero del uracilo que tiene en posición 5 un átomo de flúor en lugar de hidrógeno (Figura 1).

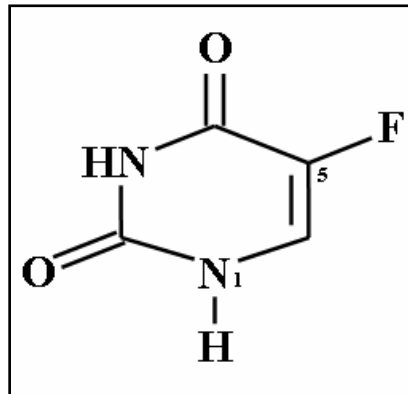


Figura 1. Estructura química del 5-fluorouracilo.

❖ **Mecanismo de acción.**

El 5-fluorouracilo, como antineoplásico antimetabolito, actúa en la fase de síntesis del ciclo celular interfiriendo en la síntesis de ADN y de ARN. Es un análogo estructural de la uridina, la cual interviene en los procesos de crecimiento y de división celular. Actúa 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.

El más sencillo de los análogos de la base pirimidínica uracilo es el 5-fluorouracilo. En su molécula incorpora un átomo de flúor en posición 5 en lugar del hidrógeno. El 5-fluorouracilo actúa mediante dos mecanismos: *i*) inhibición de la timidilato-sintetasa; y *ii*) incorporación al ARN (Hardman y cols., 2003). Para ello, el 5-fluorouracilo tiene que convertirse antes en desoxiribonucleótido (ácido 5-fluorodesoxiuridílico o 5-FdUMP).

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 5'-monofosfato (F-UMP) en las células animales. El 5-fluorouracilo puede ser transformado en fluoridina por la uridinfosforilasa, para seguir hasta F-UMP mediante la uridincinasa o bien reaccionar directamente con 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP), en una reacción catalizada por la orotatofosforribosil-transferasa hasta dar lugar a F-UMP. Para este último compuesto se cuenta con varias vías metabólicas, incluida 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 timidinfosforilasa y, en el siguiente paso, a F-dUMP, que es un potente inhibidor de la síntesis de timidilato por acción de la timidincinasa. 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 timidincinasa.

La interacción entre F-dUMP y la enzima timidilato sintetasa ocasiona la deleción de TTP (timidin-trifosfato), un constituyente necesario del ADN. El cofactor de folato 5,19-metilentetrahidrofolato y el 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 este motivo, se produce la inhibición sostenida del enzima.

El 5-fluorouracilo también se incorpora en el ADN y en el ARN. En las células tratadas con éste, el F-dUTP y el dUTP (sustrato que se acumula tras bloquear la reacción de la timidilato-sintetasa) se incorporan en el ADN en lugar del TTP fisiológico agotado. No se ha precisado la importancia de la incorporación del F-dUTP y del dUTP en el ácido desoxirribonucleico. Es probable que la incorporación del desoxiuridilato, el fluorodesoxiuridilato o ambos compuestos en el ADN ponga 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 timidilatosintetasa. La incorporación de 5-fluorouracilo en el ARN también ocasiona

toxicidad, al quedar comprometido el procesamiento y las funciones del ARN.

Existen mecanismos bioquímicos que originan resistencia a los efectos citotóxicos del 5-fluorouracilo. Estos mecanismos incluyen la pérdida o reducción de la actividad de las enzimas necesarias para activar el 5-fluorouracilo, la disminución del nivel de la pirimidinomonofosfato cinasa (que disminuye la incorporación en el ARN), la amplificación de la timidilato-sintetasa y la alteración de la propia timidilato-sintetasa que no es inhibida por F-dUMP. La respuesta al 5-fluorouracilo muestra una importante correlación con bajas cifras de las enzimas deshidrogenasa de dihidrouracilo y timidinfosforilasa. El nivel de la timidilato-sintetasa es controlado de forma estricta por un mecanismo de retroalimentación autorreguladora por el que 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 que las células cancerosas se vuelven 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 y muestra una mayor respuesta al 5-fluorouracilo. Excepto las reservas 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, otras sustancias se han combinado con 5-fluorouracilo para intensificar la actividad citotóxica por medio de una modulación bioquímica. Entre las combinaciones más interesantes en clínica con el 5-fluorouracilo destacan el metotrexato, el interferón, la leucovorina o el cisplatino. Existe una interacción sinérgica con el 5-fluorouracilo de sustancias que inhiben las primeras fases de la biosíntesis de pirimidina, como el N-fosfonoacetil-L-aspartato (PALA), inhibidor de la transcarbamilasa 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 se utiliza antes pero no después del mismo. La combinación con cisplatino y 5-fluorouracilo ha producido una respuesta impresionante en tumores de las vías aerodigestivas superiores, pero no se conoce en detalle la base molecular de dicha interacción.

1.3. Antiinflamatorios.

1.3.1. Generalidades.

La inflamación no es una enfermedad, pero sí un síntoma frecuente en muchas de ellas, consecuencia de una respuesta defensiva del organismo ante un estímulo que considera lesivo. Es una reacción característica del tejido conjuntivo vascular, mediada por agentes químicos, y estereotipada desde un punto de vista morfológico. El proceso inflamatorio se caracteriza desde un punto de vista

morfológico por una constricción arteriolar transitoria seguida de una dilatación arteriolar y venular. El aumento de flujo axial favorece la acumulación central de células y la estasis sanguínea. Los leucocitos se adhieren al endotelio vascular y el aumento de la permeabilidad vascular favorece su migración por diapédesis y la formación de edema por extravasación de líquido intravascular.

La inflamación puede definirse como la sucesión de cambios que se producen en los tejidos vivos cuando se produce una agresión de cualquier tipo, siempre y cuando el agente agresor no mate al tejido, y que tienen su origen en el tejido conjuntivo vascular. La respuesta inicial, inflamación aguda, se caracteriza por un inicio brusco, con manifestaciones muy llamativas en las que histopatológicamente predominan los fenómenos vasculares y exudativos. Una vez desencadenada la reacción, los cambios subsiguientes van a depender del tipo e intensidad del agente agresor y del tejido afectado. La inflamación aguda puede evolucionar como sigue: resolución, cicatrización con regeneración o no del parénquima lesionado, supuración o inflamación crónica. Su duración es de minutos a pocos días (Cotran y cols., 1995; Frölich, 1997).

La inflamación crónica tiene una duración mayor y se caracteriza histológicamente por la presencia de linfocitos y de macrófagos, y por la proliferación de vasos sanguíneos. Todos los agentes etiológicos, cuando producen lesión en los diferentes tejidos del organismo, originan una reacción característica del tejido conjuntivo vascular, estereotipada desde el punto de vista morfológico, mediada por agentes químicos, que clínicamente origina

manifestaciones locales y, en mayor o menor grado, sistémicas. A esta respuesta similar ante causas muy diversas, marco de la respuesta tisular a la agresión, se la denomina inflamación.

Durante mucho tiempo se consideró a la inflamación como una entidad independiente capaz de producir enfermedad, hasta que se demostró que la inflamación no era una enfermedad en sí misma sino una respuesta saludable del organismo frente a los agentes agresores. La respuesta inflamatoria está muy relacionada con el proceso de la reparación. La inflamación es útil para destruir, diluir y localizar al agente agresor y, al mismo tiempo, origina una serie secuencial de acontecimientos que intentan curar y reconstruir la zona lesionada. En este sentido, la inflamación es fundamentalmente una respuesta de carácter protector cuyo objetivo es librar al organismo del agente agresor.

No obstante, la inflamación puede ser perjudicial por su intensidad. Para que se produzca una respuesta inflamatoria es necesaria la existencia de un agente agresor capaz de producir una lesión subletal y que exista la viabilidad tisular para reaccionar y reparar el daño ocasionado. Sin embargo, la separación entre los efectos directos del agente agresor y los resultantes de la reacción tisular es difícil de realizar y, muchas veces, la intensidad de la respuesta tisular es más perniciosa que la alteración originada por el agente agresor.

La inflamación no es un proceso único, sino una serie de cambios hemodinámicos complejos que se producen en la zona

lesionada. La respuesta inflamatoria tiene lugar en el tejido conjuntivo vascularizado e implica a los constituyentes celulares y extracelulares del mismo, incluyendo al plasma, a las células circundantes y a los vasos sanguíneos. Las células circulantes son los monocitos, los eosinófilos, los linfocitos, los polimorfonucleares neutrófilos, los basófilos y las plaquetas. Las células del tejido conjuntivo son las células cebadas, los fibroblastos, los macrófagos y los linfocitos residentes. La matriz extracelular está constituida por las proteínas fibrilares estructurales (colágeno y elastina) y las glucoproteínas adhesivas (fibronectina, laminina, colágeno no fibrilar, entactina, tenascina), entre otras (Cotran y cols., 1995; Frölich, 1997).

La terapéutica de los procesos inflamatorios se basa en el empleo de fármacos que interfieren a distintos niveles la secuencia de eventos que dan lugar a la inflamación. El tratamiento dependerá del tipo de enfermedad y de la gravedad de la misma. En casos leves y autolimitados bastará con un tratamiento analgésico o con medidas de apoyo no farmacológicas. Cuando los síntomas son graves o suponen un riesgo para el paciente, debe iniciarse un tratamiento farmacológico para reducir la inflamación.

Podemos considerar distintos grupos de fármacos para el tratamiento de las patologías inflamatorias. Estos se diferencian en el grado de selectividad con que interfieren el proceso inflamatorio. Los corticosteroides ejercen el bloqueo menos selectivo del proceso ya que actúan a un nivel muy alto de la cadena de eventos bioquímicos implicados en la inflamación. Los corticosteroides bloquean la fosfolipasa A₂, impidiendo de este modo la generación de

prostanoides, lo que justifica no sólo su acción antiinflamatoria sino también su efecto inmunosupresor. Los antiinflamatorios no esteroídicos (AINEs) son inhibidores de la ciclooxigenasa (COX). La capacidad inhibidora de esta enzima es la responsable de su efecto analgésico, antiinflamatorio y antipirético. Hay fármacos que actúan en procesos específicos como es el caso de los denominados antirreumáticos específicos o fármacos modificadores de la enfermedad.

Los citostáticos e inmunosupresores se emplean en las enfermedades autoinmunes para suprimir la reacción inmunológica causante de la inflamación. El conocimiento de los mecanismos íntimos de la inflamación, junto con el desarrollo de la Biología Molecular, ha conducido a la obtención de anticuerpos monoclonales antifactor de necrosis tumoral (TNF) (Cuellar, 1996).

Los analgésicos y antiinflamatorios no esteroídicos (AINEs) constituyen, sin duda, uno de los grupos de medicamentos más empleados en clínica. Baste indicar que entre los 30 principios activos más empleados por el Sistema Nacional de Salud de España, 7 pertenecen a este grupo, totalizando un consumo de cerca de 60 millones de envases durante el año 1998 con cargo a la financiación pública (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1999). El grupo de los AINEs ofrece una gama muy extensa de productos equiparables en eficacia y en incidencia de efectos adversos, y con grandes diferencias en la respuesta individual incluso entre miembros de una misma familia química. Los AINEs son fármacos utilizados de forma masiva

por la población, tanto bajo prescripción médica como en automedicación.

Tal masificación está justificada, en parte al menos, por los siguientes hechos (Cuellar, 1996):

- Producen una respuesta terapéutica relativamente rápida, previsible y eficiente.
- Están indicados, salvo raras excepciones, como tratamiento sintomático en cualquier condición que curse con dolor moderado o inflamación.
- Forman parte esencial del tratamiento en numerosas indicaciones específicas.
- Son medicamentos baratos en comparación con otros grupos.
- Los analgésicos y los antiinflamatorios se utilizan desde hace mucho tiempo, de ahí que estén incorporados en la cultura popular.
- Los efectos adversos graves que pueden llegar a producir aparecen generalmente, cuando lo hacen, tras períodos prolongados de tratamiento.

En la molécula de todo AINE se localiza un carbono asimétrico, que se dispone en el espacio en dos formas isoméricas: dextrógira y levógira. La forma levógira tiene propiedades antiinflamatorias y analgésicas a nivel central, mientras que la dextrógira tiene poco efecto sobre las prostaglandinas periféricas. Esto sugiere, por lo tanto, que la analgesia provocada por los AINEs puede ser independiente de la síntesis de prostaglandinas. Dentro de los AINEs se distinguen dos subgrupos: *i*) los inhibidores no selectivos de la COX (inhiben la COX-1 y la COX-2), los cuales reducen simultáneamente la fiebre, el dolor, la inflamación y la función fisiológica de los prostanoides (inhiben la agregación plaquetaria y producen efectos adversos gastrointestinales y renales); y *ii*) los inhibidores relativamente selectivos de la COX-2, fármacos que mantienen los efectos primarios de los AINEs pero que no modifican sustancialmente la formación de prostanoides en los tejidos gastrointestinal y renal, y en las plaquetas. Si bien se ha observado que con este último grupo se disminuye la incidencia de reacciones adversas, particularmente las gastrointestinales, todavía no se han podido establecer claramente los riesgos asociados a un uso crónico (Cronstein y Weissmann, 1995; Launes, 2003).

Las enzimas ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2 están codificadas en genes separados en diferentes cromosomas. La COX-1 está en el cromosoma 9, y la COX-2 está en el cromosoma 1. El gen que codifica la COX-2 contiene regiones características de genes de respuesta rápida, que permiten una rápida sobreexpresión en respuesta a estímulos inflamatorios, así como una rápida infraexpresión en ausencia de una estimulación continuada. Por el contrario, la

expresión del gen que codifica la COX-1 se produce de forma natural en prácticamente todos los tejidos sanos y no es sobreexpresado por los estímulos antiinflamatorios, lo que implica una expresión constitucional o constitutiva. Aunque ambas enzimas presentan un 60 % de homología, hay algunas diferencias en la secuencia de aminoácidos que delimita las zonas activas de las COX, lo que repercute en la existencia de diferencias en el perfil de inhibición entre los AINEs tradicionales y los inhibidores de la COX-2.

1.3.2. Diclofenaco.

El diclofenaco es probablemente el AINE más ampliamente utilizado en todo el mundo. Este fármaco fue introducido en la práctica clínica hace más de 20 años para el tratamiento de enfermedades inflamatorias dolorosas. En la mayoría de los países, se encuentra comercializado en forma de sales de potasio; sin embargo, en el Reino Unido, en México, en EE.UU. y en España también se puede encontrar en forma de sales de sodio. Este principio activo es un inhibidor de las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2, si bien tiene más afinidad por la primera isoforma de la enzima, a la que se asocian la mayoría de los efectos adversos que presenta. Además, disminuye las concentraciones de ácido araquidónico libre o presente en los leucocitos. El diclofenaco está indicado en los padecimientos músculo-esqueléticos, en especial la artritis y los ataques de gota, en el manejo del dolor causado por cálculos renales y vesiculares, y en el tratamiento de las migrañas agudas. También se puede utilizar en los dolores menstruales y para tratar el dolor crónico de origen canceroso. En caso necesario, el diclofenaco se puede combinar con derivados

opiáceos. Asimismo, existen combinaciones con principios activos psicoactivos (cloroprotixeno y amitriptilina), que pueden resultar útiles en algunos pacientes oncológicos. Además, la fiebre causada por la linfogranulomatosis maligna (linfoma de Hodgkin) puede responder al tratamiento con diclofenaco (Cuellar, 1996).

❖ Estructura química

La estructura química del diclofenaco, dentro de los AINEs del tipo ácido arilalcanoico, es la característica de un ácido arilacético, en concreto, de un ácido fenilacético (Figura 2).

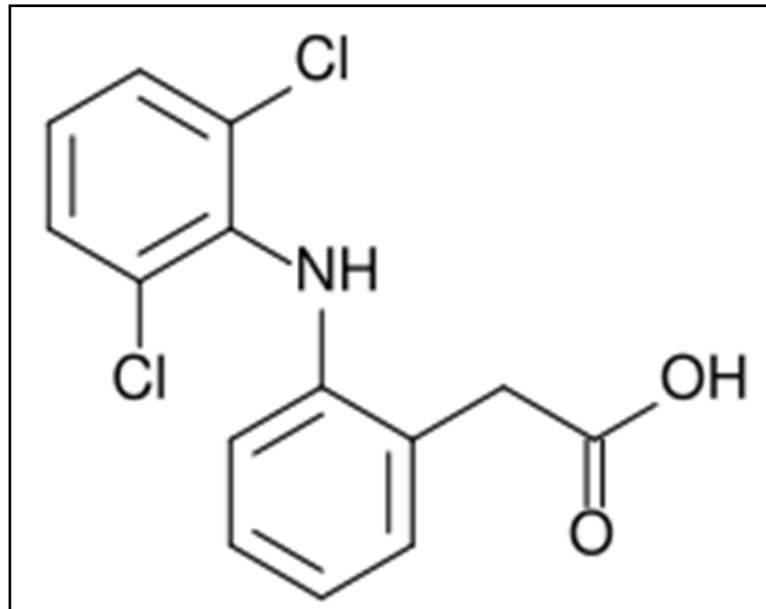


Figura 2. Estructura química del diclofenaco.

Dado que, en un principio, la fijación del ácido araquidónico sobre la ciclooxigenasa se produce a través del grupo carboxílico, la presencia de este grupo (o de un sustituto isostérico) es imprescindible

en cualquier molécula que aspire a actuar como competidor del ácido araquidónico. Una vez conseguida la fijación a la enzima, el interés reside en bloquearla, ocupando el lugar teóricamente reservado al sustrato fisiológico. Este lugar es ocupado por un anillo aromático, como factor de aproximación y estabilización de la unión a la ciclooxigenasa. Para actuar como inhibidor competitivo de la ciclooxigenasa es preciso que entre el grupo carboxílico y el anillo aromático exista un eslabón de un átomo de carbono. Este es absolutamente decisivo en la fijación, ya que la enzima presenta una gran estereoselectividad, fijando sólo aquellos restos carboxílicos unidos a carbono con, al menos, un átomo de hidrógeno libre. Las diversas sustituciones en zonas próximas al grupo carboxílico de los ácidos arilacéticos producen efectos importantes sobre la movilidad del grupo y ello repercute en una fijación más o menos intensa a la ciclooxigenasa. La introducción de un grupo metilo en el carbono α incrementa la actividad antiinflamatoria.

Los ácidos fenilacéticos son sustancias estructuralmente muy homogéneas. Casi todos ellos se utilizan como ácido libre (o en forma de sales inorgánicas de éste). En algunos casos, se han diseñado derivados amídicos, como la difenpiramida, o hidroxiamídicos, como el bufexamac. Dado que se trata de ácidos acéticos y, por tanto, no están sustituidos ninguno de los dos átomos de hidrógeno en el carbono α , el anillo aromático puede estar ocupado en todas sus posiciones relativas (orto, meta, para). En posición orto son comunes las sustituciones de restos electronegativos (nitrógeno u oxígeno), generalmente unidos a anillos bencénicos secundarios. Cuando hay

sustitutos en orto, el resto de las posiciones relativas del anillo aromático no suelen estar ocupadas.

1.4. Objetivos y plan de trabajo.

1.4.1. Objetivos.

En los apartados anteriores hemos descrito los aspectos beneficiosos que cabe esperar del empleo de partículas magnetizables como portadoras de fármacos. En principio el número de estos que podrían utilizarse es muy amplio: sólo se requiere que sea susceptible de incorporarse a las partículas sintetizadas y que la dificultad e la técnica se compense por el beneficio de la liberación localizada y controlada en el sitio de acción, sin distribución sistémica significativa.

Para el presente trabajo hemos elegido una antitumoral, el 5-Fluorouracilo (5-Fu), y un antiinflamatorio, el diclofenaco sódico. Ambos han sido suficientemente descritos en este capítulo, y su elección está justificada por las siguientes razones:

- El 5-Fu es un antitumoral de probada eficacia.
- Existe experiencia previa en nuestro grupo en lo referente a su vehiculización, liberación y caracterización en disolución.
- Nunca se ha ensayado una incorporación a los sistemas coloidales descritos en esta Tesis.

Como hemos descrito anteriormente, el diclofenaco es un excelente AINE. Nunca se ha probado, que sepamos su eficacia en formulaciones de liberación localizada, basadas en portadores magnéticos y quizás sería ventajoso tal uso dado que, con frecuencia, la inflamación está razonablemente localizada en muchas patologías. En tales casos podría ser útil sin duda la vehiculización en las partículas que proponemos.

Finalmente, el sistema coloidal diseñado para el transporte de ambos fármacos está constituido por partículas de composición mixta, formados por un núcleo magnetizable (hierro carbonilo) y un recubrimiento polimérico biocompatible (etilcelulosa). Este constituirá el almacén de fármaco, mientras que el núcleo dará a las partículas compuestas la posibilidad de magnetizarse y responder a un campo magnético externo, cuyo gradiente suministrará la fuerza necesaria para dirigir y localizar a las partículas.

El estudio sistemático que se describirá se resume en los siguientes objetivos:

1. Síntesis de las partículas coloidales compuestas, formadas por un núcleo magnético (partícula esférica de hierro) y de un recubrimiento polimérico biocompatible (etilcelulosa). Nos basaremos en el método de emulsión de un polímero preformado (Arias y cols., 2007). Las partículas obtenidas y la caracterización en cuanto a 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 (núcleo, polímero y partícula recubierta) 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.
3. Análisis comparativo de las propiedades termodinámicas superficiales de los tres tipos de partículas, mediante la determinación del ángulo de contacto de líquidos seleccionados. Uso de modelos teóricos para evaluar dichas propiedades. Estudio de la naturaleza hidrófila/hidrófoba de las partículas.
4. Determinación de la capacidad de incorporación del antineoplásico 5-fluorouracilo y del antiinflamatorio diclofenaco sódico, por las partículas compuestas mediante métodos espectrofotométricos y electrocinéticos.
5. Evaluación de las cinéticas de liberación de estos principios activos 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 parcialmente en la revista “*International Journal of Pharmaceutics*” (Arias y cols., 2007).

1.4.2. Contribución del trabajo propuesto.

Dentro del campo de la investigación y desarrollo de los transportadores magnéticos coloidales, la aportación principal de esta Tesis Doctoral es el diseño de un sistema de liberación modificada de fármacos con el que se podrá lograr el guiado de los principios activos 5-fluorouracilo (antineoplásico) y diclofenaco sódico (AINE) mediante control magnético hasta el tejido u órgano diana, o su retención en dicho lugar. Cabe esperar, utilizando este tipo de sistemas coloidales, que se reduzcan las reacciones adversas consecuentes a la distribución a nivel sistémico y de la poca especificidad de los principios activos, y que se necesiten 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. La síntesis del sistema hierro/ etilcelulosa.
2. La determinación de la estructura y composición química de este tipo de partículas, y su caracterización eléctrica y

termodinámica superficial. Pretendemos mostrar que los métodos de análisis fisicoquímico de superficies son muy sensibles a las transformaciones experimentadas por las partículas al recubrirlas de polímero o al cargarlas de fármaco.

3. El análisis de la capacidad de estas partículas compuestas como transportadores de principios activos, en concreto del antineoplásico 5-fluorouracilo y del antiinflamatorio diclofenaco sódico. Esta es una contribución esencial de nuestro trabajo, dado que las partículas sintetizadas podrían ser excelentes vehículos de fármacos por su capacidad de respuesta a campos magnéticos externos o a implantes magnéticos (localizados en el paciente mediante cirugía menor), y adecuadas igualmente como sistema de liberación basado en la descomposición de un polímero biocompatible.

1.4.3. Metodología y plan de trabajo.

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

1. Síntesis de las partículas compuestas. El método seguido es totalmente original: consiste en la realización de una emulsión del polímero preformado en una fase acuosa que contiene en suspensión los núcleos magnéticos (Arias y cols., 2007).

2. Evaluación de la efectividad del recubrimiento. Dadas las diferencias en cuanto a carga superficial (y, especialmente, en referencia a la dependencia de ésta con el pH y con la fuerza iónica) entre el hierro y el polímero, la determinación del potencial zeta de los tres tipos de partículas en función del pH y de 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 hidrófilo o hidrófobo de las partículas: este debe cambiar de los núcleos a las partículas mixtas, dado que el hierro es un material hidrófilo y el polímero tiene un carácter hidrófobo.
3. Evaluación de la capacidad de vehiculización de fármacos. Se realizará un estudio de la absorbancia óptica de disoluciones de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico de distintas concentraciones. Mediante calibrado, se obtendrá el coeficiente de absorción molar lo que nos permitirá evaluar la absorción y liberación de los fármacos. Además, se realizará una validación del método espectrofotométrico utilizado. 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, además de una aproximación sumamente original al problema.

4. Estudio de la liberación in vitro. Se determinará la cantidad de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico liberada y la cinética de liberación por parte de partículas compuestas. Se analizará cómo puede condicionar la liberación in vitro el tipo de unión fármaco-partícula.

CAPÍTULO 2

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

2.1. Síntesis y estudio morfológico.

La utilidad de los látex en la elaboración de formas de dosificación orales es bien conocida. Este tipo de materiales es ampliamente utilizado en la obtención de películas poliméricas para el recubrimiento de principios activos y en la obtención de comprimidos matriciales. De esta forma, se obtienen formas farmacéuticas de liberación modificada. Los derivados de la celulosa y los polímeros acrílicos son los que presentan mejores características para obtener

recubrimientos acuosos de formas farmacéuticas. Se han elaborado formas farmacéuticas de liberación modificada mediante el recubrimiento de pequeñas micropartículas con soluciones de polímero y dispersiones, que posteriormente se han comprimido obteniéndose una matriz. Estos procesos, también han sido utilizados para enmascarar sabores desagradables, mejorar la estabilidad del fármaco y, además, sirven para separar físicamente componentes que son incompatibles en estado sólido. Además, numerosas formulaciones líquidas y aerosoles han sido elaborados utilizando estos sistemas (McGinity y cols., 1983; Sheth y Thossouin, 1994). En la formulación de preparados oftálmicos también han sido ampliamente utilizados los látex, consiguiéndose así un mayor tiempo de contacto de la formulación con la superficie ocular. La elaboración de formas farmacéuticas tópicas también se ha visto beneficiada por la utilización de estos sistemas, por ejemplo, las formulaciones de glucocorticoides o de peróxido de benzoilo (Mena y cols., 1994; Ruiz y cols., 1994).

Como hemos mencionado, las ventajas del uso de la nanotecnología en el campo farmacéutico provienen sobre todo de la versatilidad de los diferentes métodos de síntesis, que permiten obtener una amplia variedad de nanopartículas. En particular, es posible dotar a las partículas de látex de respuesta magnética: la variedad de polímeros biodegradables y biocompatibles que se han descrito puede así aprovecharse en aplicaciones para las cuales la liberación localizada y controlada de fármaco pueda considerarse un avance esencial. Por ello, en este capítulo describimos los métodos de síntesis y las características esenciales de partículas de látex que

contienen un núcleo magnético. En el siguiente apartado nos referimos a los núcleos (esferas de hierro de tamaño inferior a la micra) y posteriormente consideraremos la preparación del látex de etilcelulosa y de partículas núcleo/recubrimiento.

2.1.1. Hierro Carbonilo.

Como hemos mencionado, nuestro sistema magnético de liberación será tanto más adecuado para su uso cuanto mayor sea su imanación para campos magnéticos moderados. El núcleo magnetizable debe tener una susceptibilidad magnética elevada. Aunque existen materiales con respuesta magnética muy intensa, tienen elementos pesados (como Nd o Sm) en su composición, y ello les hace inadecuados por su toxicidad. Por ello, nos centramos en partículas ferro- y ferri-magnéticas basadas en el Fe, en particular hierro metálico y magnetita (Fe_3O_4).

A lo largo de los años, se han puesto a punto numerosos procedimientos de síntesis de este tipo de partículas. Los métodos físicos como la deposición en fase gaseosa y la litografía de escala electrónica, tienen el inconveniente de su incapacidad para garantizar la obtención de un tamaño de partícula del orden de nanómetros. Entre los métodos secos para la obtención de óxidos de hierro, realizados a elevadas temperaturas, destacan: la oxidación de hierro metálico por agentes oxidantes, la desproporción de óxido ferroso y la descomposición de diferentes sales férricas o ferrosas. Sin embargo, son los métodos húmedos, los que mejores resultados proporcionan en cuanto al control del tamaño, composición y forma de las

nanopartículas. Estos métodos están basados en la coprecipitación de sales férricas y ferrosas en solución acuosa, mediante la adición de una base. El control de la morfología, el tamaño y la composición se realiza variando el tipo de sal utilizado, la proporción $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$, el pH y la fuerza iónica del medio (Gupta y Gupta, 2005; Tarjat y cols., 2003).

Dentro de los diversos tipos de nanopartículas obtenidas, merecen especial mención por sus aplicaciones biomédicas [en la separación y etiquetado celular (detoxificación de fluidos biológicos), la reparación de tejidos, el transporte de fármacos, la resonancia magnética de imagen (como agentes de contraste), la hipertermia y la magnetofección] las nanopartículas con propiedades superparamagnéticas. Su pequeño tamaño y su gran área superficial específica determina una gran susceptibilidad magnética y un comportamiento superparamagnético (Gupta y Gupta, 2005).

Como núcleo magnético del sistema transportador de fármacos que proponemos, utilizaremos el hierro carbonilo (BASF, Alemania) por su elevada susceptibilidad magnética e imanación de saturación. Se ha elegido el tipo “*HQ, carbonyl iron*”, el cual se obtiene mediante un tratamiento del hierro con monóxido de carbono (CO), bajo calor y presión. El hierro pentacarbonilo [$\text{Fe}(\text{CO})_5$] una vez obtenido es descompuesto en condiciones controladas, produciéndose CO y un polvo de hierro extremadamente puro en forma de esferas casi perfectas con un tamaño de partícula medio en torno a una micra. La escasa toxicidad de este hierro ($\text{DL}_{50} = 50 \text{ g/Kg}$) ha sido corroborada en diversos estudios (Huebers y cols., 1986; Devathali y cols., 1991;

Chua-Anusorn y cols., 1999; Whittaker, 2002). Con respecto a la biodegradación del hierro utilizado en el presente trabajo de investigación, debido a su pequeño tamaño (radio 575 ± 160 nm, véase el apartado de resultados y discusión), la mayoría de las partículas permanecerán en el organismo, hasta ser eliminadas principalmente mediante filtración glomerular (Okon y cols., 1994).

Debido a que su distribución de tamaños inicial es muy polidispersa, con una elevada presencia de núcleos por encima de $1 \mu\text{m}$ de tamaño, lo que no es adecuado para la aplicación biomédica que pretendemos, seguimos el procedimiento de selección de tamaños desarrollado por Arias y cols. (2006) para reducir al máximo la polidispersión en la distribución de tamaños y eliminar las partículas con un tamaño $\geq 1 \mu\text{m}$. Este método está basado en una separación por gravedad. Brevemente, se realiza en primer lugar la sonicación de suspensiones de hierro carbonilo al 0.3 % (p/v) durante 5 minutos antes de dejarlas bajo la acción de la gravedad dentro de frascos de cristal de 1 L con un diámetro interno de unos 90 mm. El tiempo de sedimentación de las suspensiones fue de 60 minutos y se recogieron los 10 mm superiores del sobrenadante. La conductividad de este fue aproximadamente de $1 \mu\text{S/cm}$, sin que hubiera ningún otro sólido en suspensión más que el hierro carbonilo. Las partículas se secaron a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ en un horno de vacío y fueron almacenadas hasta su uso en un recipiente de polietileno y conservadas en un desecador.

La determinación de la forma y del tamaño de las partículas de hierro carbonilo, al igual que se realiza con los otros dos tipos de

materiales, implica la utilización de un microscopio electrónico de transmisión (TEM) (Zeiss EM 902, Alemania), un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM) con detectores de campo claro y de campo oscuro (STEM Philips CM20, Holanda) y un microscopio electrónico de barrido (SEM) (Zeiss DSM 950, Alemania). Antes de su observación, y al igual que se realiza con el resto de materiales, una suspensión diluida de las partículas [en torno al 0.1 % (p/v)] se sometió a ultrasonidos durante 5 minutos. A continuación, se depositaron unas gotas en rejillas de cobre con película de formvar, las cuales se secaron a 35 °C en un horno de convección. Para terminar, conviene aclarar que las imágenes de STEM se obtuvieron mediante un barrido de electrones transmitidos, empleando dos tipos de detectores: de campo claro (que permite la formación de imágenes utilizando únicamente el rayo transmitido) y de campo oscuro (que permite la formación de imágenes utilizando rayos difractados, de tal manera que lo que contribuye a la difracción en la imagen aparece oscuro y lo que no contribuye se observa claro).

❖ Forma y tamaño de las partículas

Las condiciones establecidas para la selección de las partículas de hierro carbonilo detalladas anteriormente (60 minutos de sedimentación y recogida de los 10 mm superiores del sobrenadante), permiten obtener núcleos magnéticos esféricos con una mínima heterogeneidad de tamaños y el máximo número de partículas magnéticas con un diámetro inferior a 1 μm (Arias y cols., 2006, 2007). Esto se confirma al observar las fotografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) obtenidas en el Centro

de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, que presentamos en la Figura 3. En cuanto al tamaño, se realizaron medidas sobre 100 partículas de hierro carbonilo para obtener el histograma de la Figura 4. Su diámetro medio y desviación típica, obtenidos ajustando al histograma una distribución normal logarítmica, es 570 ± 160 nm.

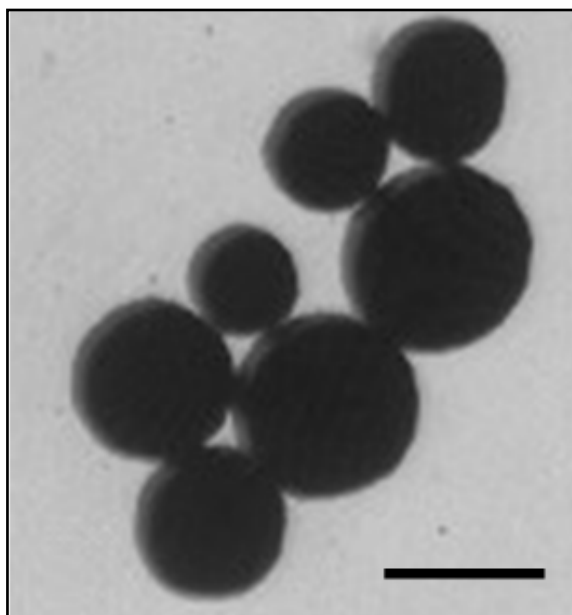


Figura 3. Microfotografía electrónica de transmisión de las partículas de hierro carbonilo. Longitud de barra: 500 nm.

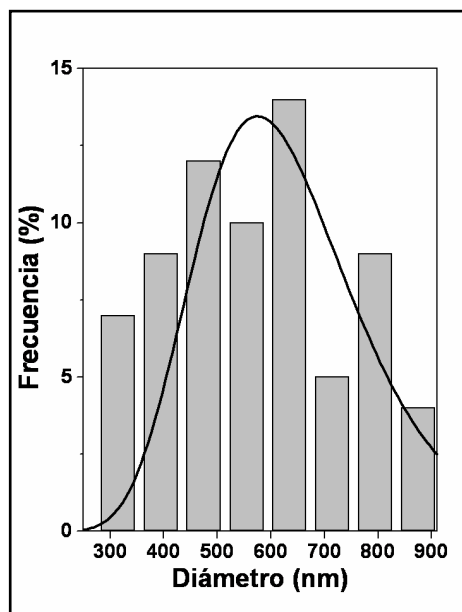


Figura 4. Histograma de frecuencias relativas de diámetros de las partículas de hierro carbonilo obtenidas. La curva corresponde a una distribución logarítmica normal ajustada.

2.1.2. Látex de etilcelulosa.

Se definen los látex como dispersiones acuosas de un polímero insoluble en agua (Champetier y Monnerie, 1969; Gurny y cols., 1979). Estas dispersiones coloidales heterogéneas e inestables pueden clasificarse según su método de obtención en:

- Látex verdaderos: obtenidos por polimerización de un monómero emulsionado o disuelto en la fase acuosa.

- Pseudolátex: obtenidos por emulsión de un polímero preformado disuelto en un disolvente orgánico adecuado

Los problemas que presentan los primeros en su aplicación biofarmacéutica (limitación en su preparación, posibilidad de reacciones tóxicas y ausencia de biodegradación) han provocado su desplazamiento en beneficio de los segundos (Gester y cols., 1973). Para la preparación de los pseudolátex suelen emplearse polímeros termoplásticos insolubles en agua, utilizándose con fines farmacéuticos la etilcelulosa, el acetofalato de celulosa y otros compuestos celulósicos, por su aceptación y utilidad en el diseño de formas de dosificación de liberación modificada (Morales y cols., 2007). Los pseudolátex de etilcelulosa se preparan disolviendo el polímero en un disolvente adecuado e interponiendo la fase orgánica con la acuosa a una temperatura entre 55 °C y 75 °C para formar una emulsión estable, empleando estabilizadores o emulsionantes como el laurilsulfato sódico y el alcohol cetílico. Posteriormente, el disolvente se evapora (de otro modo el material obtenido sería tóxico) y se obtiene una emulsión estable, constituida por partículas esféricas de aproximadamente una micra de diámetro. Esta técnica presenta la ventaja de poder utilizarse con derivados que no permiten la polimerización *in situ* y, por otro lado, evita la aparición de monómeros residuales que pueden tener consecuencias tóxicas. La adición de alcoholes grasos de cadena larga en la síntesis incrementa la capacidad de los agentes emulsionantes aniónicos para dispersar y estabilizar las emulsiones (Steuernagel, 1989).

Debido a que el tamaño medio de partícula es del orden de micras, en la técnica de emulsificación directa la sedimentación se produce de manera relativamente rápida, y puede ralentizarse si se aumenta la viscosidad de la fase acuosa. En el caso de los pseudolátex, la viscosidad es un parámetro independiente del peso molecular del polímero dispersado. Así pues, se pueden incorporar grandes cantidades de polímero (hasta un 30 %) manteniendo una baja viscosidad. Además, el pseudolátex es mucho más resistente al ataque microbiano, una propiedad importantísima en soluciones acuosas de polímeros, que generalmente requieren conservantes o una preparación inmediata antes de su uso para evitar la contaminación bacteriana (Harris y Ghebre-Sellassie, 1989).

El disolvente puede ser un líquido o una mezcla de líquidos, algunos de los cuáles pueden ser miscibles o solubles en agua, lo que permite mejorar la solubilidad del polímero. Para conseguir una mayor eficacia y rendimiento, la solución resultante del polímero debe contener una proporción de sólidos tan alta como sea posible, además de una baja viscosidad. El disolvente es generalmente un alcohol de bajo peso molecular (butanol), un éter, un hidrocarburo alifático (hexano), un hidrocarburo alicíclico, un hidrocarburo aromático (benceno) o, incluso, un derivado halogenado (cloroformo). Además, deberá ser inerte, salvo cuando sirva como reactivo, agente curativo o endurecedor de polímeros (como el glicilfenil éter, que actúa evitando el deterioro de polímeros epóxidos).

Respecto a los agentes emulsionantes empleados en el proceso, pueden ser iónicos o no iónicos, e incluso mezclas de ellos. Además,

deben ser activos en el medio acuoso a concentraciones relativamente bajas (0.2 – 3 %). Los más utilizados son:

- Entre los aniónicos, los alquil sulfato sódico (C_{10-20}), como el dodecil sulfato sódico.
- De los catiónicos, los halogenuros de amonio cuaternario como el bromuro de hexadecil trimetil amonio o el bromuro de octadecil piridina.
- Entre los no iónicos, los ácidos grasos de 5 a 50 moléculas de etileno, como el octafenol y el lauril alcohol.

Otros aditivos utilizados incrementan la estabilidad del sistema, inhibiendo la sedimentación de las partículas o su degradación. Son inertes y resistentes a la difusión acuosa y a cualquier proceso de eliminación del disolvente. Este tipo de aditivos puede incluirse tanto en la fase acuosa como en la polimérica, antes de proceder a su mezcla. En cuanto a su estructura química poseen un grupo hidrocarbonado alifático terminal de al menos 8 átomos de carbono preferiblemente saturado y lineal. Además, el peso molecular no debe ser demasiado elevado (no más de 5000 Da). A modo de ejemplo, se pueden señalar los n-alcanos (C_{10-20} como el n-decano, utilizado en este trabajo) y los n-alcoholes (C_{14-20}).

❖ **Propiedades del látex de etilcelulosa.**

La etilcelulosa es un polímero que se obtiene por reacción del cloruro de etilo con un álcali de celulosa (Figura 5). Los productos de la etilcelulosa pueden obtenerse con diferentes propiedades físicas, según el grado de esterificación. Su viscosidad, por ejemplo, depende de la longitud de la molécula de polímero (Rekhi y Jambherkar, 1995).

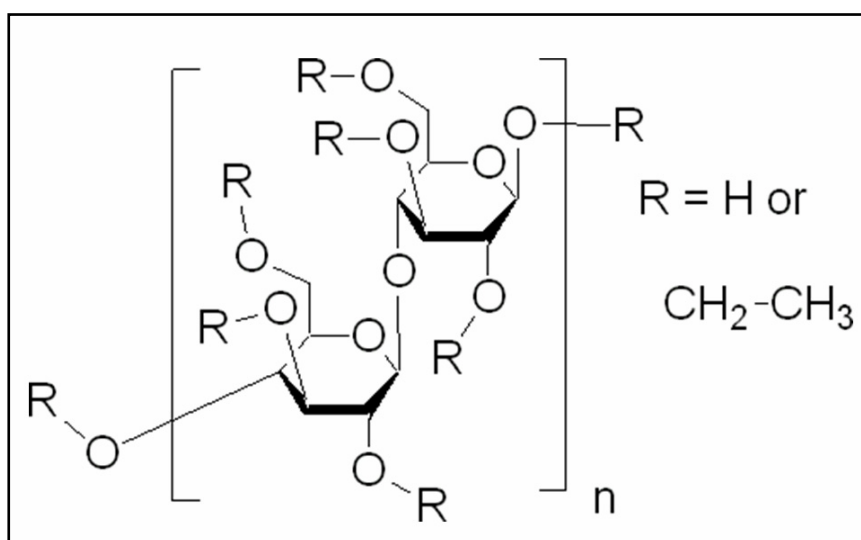


Figura 5. Estructura química del monómero de etilcelulosa.

La etilcelulosa es soluble en una amplia variedad de disolventes (ésteres, hidrocarburos aromáticos, alcoholes, cetonas, disolventes clorados, etc.) e insoluble en agua, glicerina y propilenglicol. Su temperatura de fusión es de 140 °C y depende del grado de sustitución del polímero (Rekhi y Jambherkar, 1995).

Las partículas de látex, presentan una forma prácticamente esférica, lo que nos permite diferenciarlas en función de sus diámetros. Sin embargo, debido a la falta de uniformidad en el tamaño, ya que son sistemas polidispersos, sólo puede asignarse un tamaño promedio al conjunto del látex cuya distribución de tamaños estará comprendida entre 10 y 1000 nm. El límite de tamaño superior próximo a 1 μm viene impuesto por la convección térmica y el movimiento browniano de las partículas. Ambos deben ser lo suficientemente elevados como para que la velocidad de sedimentación de las partículas se compense y no se produzca la sedimentación durante un período de tiempo prolongado. Además, los cambios en la distribución de tamaños con el tiempo son una medida de la inestabilidad del sistema (Lehmann, 1980; Quirantes y cols., 1997). La presencia y la concentración de emulgente es otro factor influyente, no sólo en el tamaño de partícula, sino también en la distribución de tamaños, lo que a su vez afecta a la estabilidad del sistema (Quirantes y cols., 1993).

Otra característica del látex de etilcelulosa es su capacidad para formar películas, las cuáles se utilizan frecuentemente para controlar la liberación de principios activos desde formulaciones farmacéuticas. Las características de las partículas de látex relacionadas con esta aplicación son la dureza, la concentración de plastificante requerida, la solubilidad (dependiendo del pH), la capacidad de gastrorresistencia y la permeabilidad. Son muchos los factores que pueden influir sobre estas características, como la distancia de pulverización, el flujo del sistema, la presión de atomización, la concentración de polímero y la temperatura de secado.

❖ Estabilidad del látex de etilcelulosa.

La naturaleza de la interfase entre las partículas de polímero y la fase acuosa determina, entre otras propiedades, la estabilidad del sistema. En los látex, las pequeñas partículas no tienden a sedimentar debido a que el movimiento browniano y la convección térmica compensan en gran medida a la gravedad. Sin embargo, en la práctica, la mayoría de las dispersiones contienen algunas partículas de tamaño grosero que formarán un sedimento débil tras unos meses y que, si son de un tamaño superior a $1\mu\text{m}$, generarán sedimento a las pocas horas (Vanderhoff y El-Aasser, 1988).

La estabilidad del látex está determinada por factores similares a los observados en las soluciones coloidales (Lehmann, 1980). En su formulación de sistemas deben evitarse el acercamiento de sus partículas entre sí y la ruptura de la película interfacial. A ello contribuye la repulsión electrostática entre las dobles capas eléctricas de las partículas, pero con frecuencia este mecanismo de estabilización por carga no es suficiente, ya sea porque la carga superficial sea pequeña o porque la concentración de partículas sea elevada. Otra fuente de desestabilización es la elevada fuerza iónica (típica de fluidos fisiológicos) que apantalla la capa superficial. Por todo ello, con frecuencia se recurre a los agentes emulsionantes, los cuales actúan por uno o varios mecanismos de acción: *i*) estabilización termodinámica (reducción de la tensión interfacial); *ii*) formación de una película interfacial que actúa como una barrera mecánica frente a la coalescencia; *iii*) estabilización electrostática (modificación de la doble capa eléctrica impidiendo el acercamiento de las partículas);

iv) estabilización estérica (asociada a variaciones en la conformación de cadenas poliméricas e interacciones entre estas); y *v*) modificación de las propiedades reológicas.

La etilcelulosa es el más estable de los derivados de la celulosa, aunque es sensible a los ácidos. Además, no es higroscópica, fotosensible o termolábil. No obstante, sus suspensiones deben estabilizarse para evitar procesos oxidativos (Rekhi y Jambherkar, 1995).

❖ Aplicaciones farmacéuticas del látex de etilcelulosa.

En nuestro trabajo de investigación seleccionamos la etilcelulosa como componente del sistema transportador debido a su carácter biocompatible, a su estabilidad química y a la ausencia de toxicidad inducida en pacientes. Como hemos indicado anteriormente, será el material responsable principal del transporte y de la liberación de los fármacos.

La etilcelulosa es ampliamente utilizada como forma de dosificación oral para la liberación modificada de fármacos y como agente para la quimioembolización de órganos tumorales, debido a su capacidad para prevenir la rápida revascularización del área embolizada (De Merlis et al., 2005; Dubernet et al., 1990; Grattard et al., 2002; Zinutti et al., 1996). Como consecuencia de su gran tolerabilidad y de su baja toxicidad, este polímero es muy utilizado como sistema transportador de fármacos anticancerígenos e induce un efecto sostenido, habiéndose demostrado su papel positivo en la

mejora de las expectativas de vida de pacientes tratados (Kato et al., 1996; Zinutti et al., 1996). Un amplio abanico de principios activos ha sido vehiculizado en este material, por ejemplo: el 5-fluorouracilo, el propranolol, la loratadina o el ketoprofeno, por citar algunos ejemplos (Martinac et al., 2005; Ubrich et al., 2004; Wu et al., 2003; Yamada et al., 2001; Zinutti et al., 1996).

❖ Procedimiento de síntesis de las partículas de etilcelulosa.

La obtención de las partículas de pseudolátex se realiza mediante el proceso de emulsión a partir de un polímero preformado, celulosa en nuestro caso. El polímero escogido es la etilcelulosa, que se caracteriza por un contenido en etoxilos del 48 – 49.5 %, y una viscosidad en tolueno o alcohol de 45 cPs. La síntesis se llevó a cabo introduciendo algunas modificaciones con respecto a los trabajos desarrollados por otros autores (Vanderhoff, y cols., 1979), en aras de lograr una mejora en el resultado obtenido. Partiendo del procedimiento de síntesis original de un látex de etilcelulosa, de características similares a las del látex comercial Aquacoat[®], se realizaron diversas modificaciones con objeto de elaborar un sistema lo más estable posible y de adecuadas características, tanto organolépticas como de estabilidad, forma y tamaño.

En concreto, el método de preparación de las nanopartículas de etilcelulosa consistió en (Arias y cols., 2007):

1. Preparación de la fase polimérica: se disuelven 4.68 g de etilcelulosa 9004-57-3 (ICN Ohio, USA) en una mezcla de disolventes orgánicos (22.57 g de benceno (Panreac, España) y 4 g de etanol (Panreac, España). Se deja en reposo durante 24 horas, a temperatura ambiente.
2. Preparación de la fase acuosa: disolución de una mezcla de emulgentes formadores [0.125 % (p/v) de dodecilsulfato sódico (NaDS) (Panreac, España) y 0.375 % (w/v) de PEG 4000 (Panreac, España)] en 94 g agua ultrapura (Milli-Q Academic, Millipore, Francia).
3. Transcurridas 24 horas, se adicionan a la fase polimérica 0.31 g de n-decano (Panreac, España), como disolvente estabilizador.
4. A continuación se calienta la fase acuosa durante 30 minutos a 67 °C en un baño termostatzado.
5. Acto seguido, se procede a la mezcla de fases bajo agitación mecánica a velocidad angular especificada (entre 8000 y 20500 rpm, véase más adelante) incorporando la fase acuosa sobre la polimérica, previamente calentada a la misma temperatura. Esta agitación continuará durante 48 horas.

6. Finalmente, se deja evaporar el disolvente orgánico bajo agitación mecánica a 2000 rpm durante al menos 24 horas. De esta forma, se consigue incrementar el contenido en sólidos del sistema y se evita la presencia de restos de disolventes orgánicos.

Tras el proceso de síntesis, se obtuvo una suspensión de aspecto blanquecino, cuya limpieza es un paso básico en la técnica de elaboración para eliminar los restos de electrolitos y los agregados formados durante la síntesis. Este proceso de limpieza consiste en la realización de repetidos ciclos de centrifugación a 9.000 rpm durante 20 minutos, con una centrífuga de alta velocidad (Centrikon T-124 Koutron, Francia) y redispersión en agua bidestilada. Para asegurar que la suspensión estaba lo suficientemente limpia, se midió la conductividad del sobrenadante.

Para analizar la influencia de las proporciones iniciales de NaDS/PEG 4000 en las características del látex obtenido, centrándonos en la forma y tamaño para su aplicación como sistema transportador de fármacos vía parenteral, se realizó la síntesis en un rango de concentraciones entre 4/0 y 0/4 para un total de 0.5 g., a una velocidad de agitación durante el proceso de mezcla de las fases acuosa y polimérica de 9500 rpm. Con el mismo objetivo, se determinó la influencia de la velocidad de agitación en el proceso de mezcla de las fases acuosa y polimérica. De esta manera, la síntesis fue repetida utilizando unas velocidades de agitación de 8000, 9500,

13500 y 20500 rpm, para la proporción inicial de NaDS/PEG 4000: 1/3.

❖ **Resultados. Características de las partículas obtenidas**

Para optimizar los resultados de la síntesis y lograr un mayor rendimiento y un tamaño de partícula adecuado para su administración parenteral, se ensayaron en primer lugar, diferentes proporciones de agente tensioactivo (NaDS /PEG 4000: desde 0/4 a 4/0 hasta un total de 0.5 g, utilizando una velocidad de agitación mecánica durante los 5 primeros minutos de 9500 rpm). Además, y con el mismo objetivo, se analizó la influencia de la velocidad de agitación mecánica en los 5 primeros minutos (8000, 9500, 13500 y 20500 rpm, utilizando una proporción 1/3 de NaDS /PEG 4000). Se investigó en todos los casos la formación de precipitados sólidos, el aspecto de la suspensión y de las partículas de látex y el diámetro medio y la desviación estándar de las partículas. Esta última determinación, se realizó mediante la medida, en fotografías de microscopía electrónica de barrido (S.E.M.) obtenidas en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, sobre 100 partículas de látex para obtener el histograma, al cual se ajustó una distribución logarítmica.

En la Tabla 1 se recogen los resultados del estudio de la utilización de diferentes proporciones de agente tensioactivo. Como puede apreciarse, esta variación no influye en el tamaño de partícula, el cuál en todos los casos es del orden de micras. Sin embargo, sí se observa un claro efecto sobre la formación de sólidos y sobre las características superficiales de las partículas. La utilización exclusiva

de PEG 4000 como tensioactivo provoca que la síntesis no alcance un rendimiento adecuado ya que se produce una formación considerable de sólidos y, además, se reduce la rugosidad superficial de las partículas lo que, por lo tanto, hace intuir una reducción en el área superficial de estas. La utilización de una proporción 1/3 de LSNa/PEG 4000 permite obtener el menor tamaño de partícula en el látex de etilcelulosa.

Tabla 1. Características de las diferentes partículas de látex de etilcelulosa obtenidas con diferentes proporciones de tensioactivos. (B: aspecto blanquecino; E: partícula esférica; L: superficie lisa; R: superficie rugosa).

Proporción de pesos inicial NaDS/PEG4000	Diámetro medio y desviación típica (μm)	Formación de precipitados sólidos	Suspensión/Partícula
4/0	5.7 ± 1.7	No	B/E-R
3/1	5.6 ± 3.1	No	B/E-R
2/2	14 ± 4	No	B/E-R
1/3	3.4 ± 2.7	No	B/E-R
0/4	4 ± 2.7	No	B/E-L

En la Tabla 2 se recogen los resultados del estudio de la utilización de diferentes velocidades de agitación mecánica, empleando una proporción 1/3 de NaDS/PEG 4000. Como puede observarse, la utilización de elevadas velocidades de agitación conduce a una abundante generación de precipitados sólidos y a la obtención de partículas de etilcelulosa con un tamaño del orden de magnitud de micras.

Tabla 2. Características de las diferentes partículas de látex de etilcelulosa obtenidas con diferentes velocidades de agitación mecánica. (B: aspecto blanquecino; E: partícula esférica; L: superficie lisa; R: superficie rugosa).

Velocidad de agitación mecánica (rpm)	Diámetro medio y desviación típica	Formación de precipitados sólidos	Suspensión/Partícula
8000	280 ± 140 nm	No	B/E-R
9500	3.4 ± 2.7 μm	No	B/E-R
13500	1.2 ± 0.9 μm	Sí (4.1 g)	B/E-L
20500	2.2 ± 1.7 μm	Sí (4.2 g)	B/E-L

Por lo tanto, puede concluirse que la síntesis de nanopartículas de etilcelulosa requiere de la utilización de una proporción 1/3 de los tensioactivos NaDS/PEG 4000 y la agitación mecánica de la síntesis a una velocidad de 8000 rpm. De esta manera, obtendremos un rendimiento óptimo en la obtención de partículas de látex de etilcelulosa con un tamaño adecuado para su administración parenteral (Arias y cols., 2007); aunque, como puede observarse en las Figuras 6 y 7, las nanopartículas obtenidas presentan una cierta polidispersión en la distribución de tamaños.

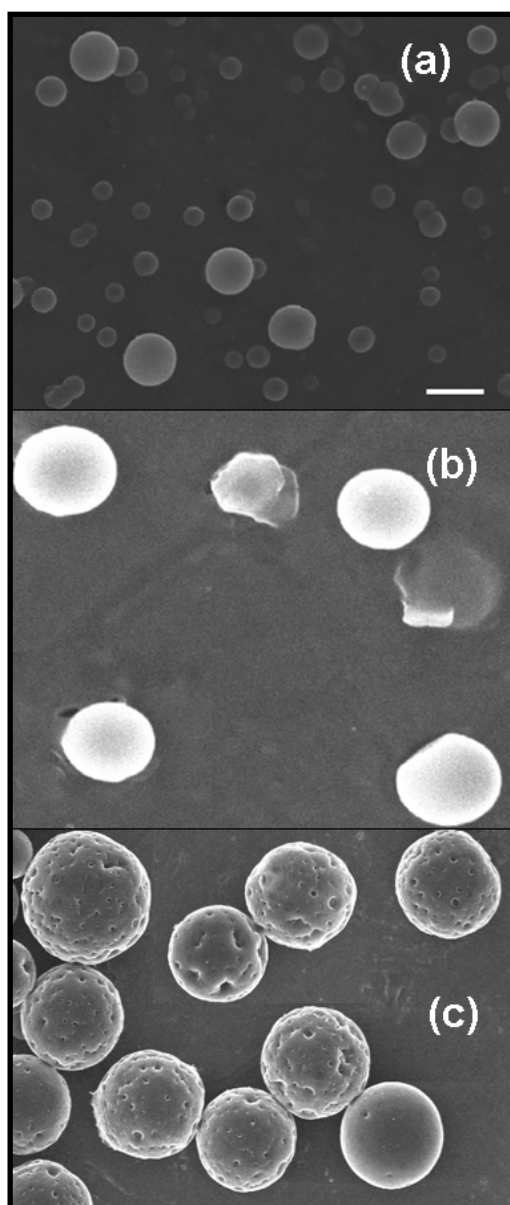


Figura 6. Microfotografías TEM (a), HRTEM de campo oscuro (b) y SEM (c) de las partículas de etilcelulosa obtenidas mediante la síntesis optimizada.

Longitud de barra: 500 nm.

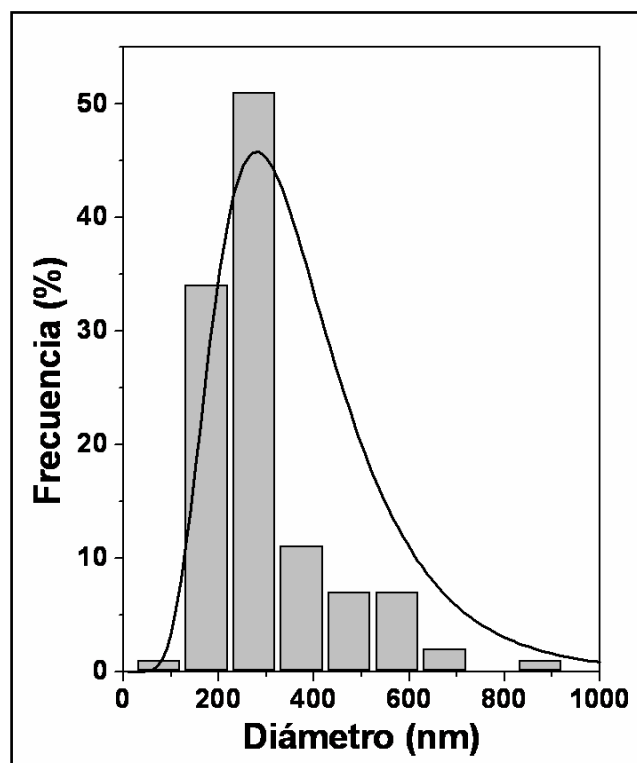


Figura 7. Histograma de frecuencias relativas de diámetros de las partículas de etilcelulosa obtenidas siguiendo la síntesis optimizada. La curva corresponde a una distribución logarítmica ajustada.

2.1.3. Partículas compuestas.

El procedimiento de síntesis de partículas con núcleo magnético, está basado en las condiciones utilizadas en la síntesis de las microesferas de látex de etilcelulosa, es decir, el método de emulsión a partir de un polímero preformado. En definitiva, se trata de realizar la emulsión del polímero bajo idénticas condiciones a las descritas en el apartado anterior, pero utilizando una fase acuosa ácida diluida (10^{-3} N de HCl) donde se encuentran los núcleos magnéticos

en suspensión. De esta manera, pretendemos que la emulsión del polímero preformado en presencia de hierro carbonilo provoque el recubrimiento de éste, aunque es obvio que también se puede producir la formación de partículas de pseudolátex independientes (Arias y cols., 2007).

Brevemente, las partículas recubiertas fueron preparadas basándonos en el método optimizado de síntesis, que implica la utilización de una proporción 1/3 de NaDS/PEG 4000 y la agitación del medio los primeros 5 minutos a 8000 rpm (véase el apartado 2.1.2). En concreto, la fase polimérica constituida por una disolución de etilcelulosa 9004-57-3 en una mezcla de disolventes orgánicos, se dejó en reposo durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se adicionó n-decano. A continuación se preparó la fase acuosa ácida diluida, constituida por una suspensión al 0.266 % (p/v) de hierro carbonilo en agua ultrapura 10^{-3} N de HCl, donde se encuentran dispersos el NaDS [0.125 % (p/v)] y el PEG 4000 [0.375 % (p/v)]. Finalmente, se calentaron ambas fases durante 30 minutos a 67 °C en un baño termostatzado y se deposita la fase acuosa sobre la polimérica bajo agitación mecánica a 8000 rpm. Esta agitación continuó durante 48 horas. Finalmente, se dejó evaporar el disolvente orgánico, bajo agitación mecánica a 2000 rpm durante al menos 24 horas.

Con el objetivo de eliminar las partículas de pseudolátex de etilcelulosa puras y los residuos de la síntesis que se hayan formado, se realizó una limpieza de la suspensión de látex magnético utilizando un imán permanente. La técnica consiste en la repetición sucesiva de

las siguientes operaciones: redispersión en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos (Ultrasons, J.P.Selecta, S.A.), sedimentación sobre imán permanente de 0.42 T, extracción del sobrenadante y sustitución con agua ultrapura. Este proceso de limpieza fue controlado midiendo la conductividad del sobrenadante con un conductímetro digital (Conductimeter 525, Crison, España) y se consideró finalizado cuando la conductividad eléctrica del sobrenadante era inferior a 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$, y el sobrenadante dejaba de ser blanquecino (color debido a las partículas de látex no magnéticas).

❖ **Morfología de las partículas**

Las partículas recubiertas se sintetizaron siguiendo el procedimiento optimizado de emulsión a partir del preformado utilizado en la síntesis de las partículas de etilcelulosa. Así se obtuvieron nanopartículas de morfología esférica con una moderada polidispersión en tamaños determinada por los núcleos de hierro carbonilo, como puede apreciarse en las fotografías de microscopía electrónica obtenidas en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (Figura 8).

Las microfotografías TEM (Figura 8a) no permitieron distinguir el recubrimiento de etilcelulosa que presentan los núcleos magnéticos, tampoco resultaron de utilidad las fotografías HRTEM de campo claro (Figura 8b), si bien en ambos casos la cubierta polimérica se intuye. Por el contrario, las microfotografías HRTEM de campo oscuro de las partículas compuestas (Figura 8c) muestran claramente la existencia de un anillo blanquecino en torno a los núcleos

magnéticos, el cual es efectivamente látex de etilcelulosa si tenemos en cuenta la apariencia del polímero en las microfotografías HRTEM de campo oscuro (Figura 6b). Esto es debido a que en esta técnica el recubrimiento es más transparente a la radiación y, por lo tanto, se observa con color claro, a diferencia del núcleo de hierro carbonilo. De esta manera, podemos decir que los núcleos magnéticos se encuentran rodeados por una cubierta de látex de ≈ 20 nm de grosor (Arias y cols., 2007). Finalmente, las microfotografías SEM (Figura 8d) confirman todo lo indicado, ya que la morfología y el aspecto de la superficie de las partículas compuestas coinciden plenamente con las partículas de etilcelulosa (Figura 6c).

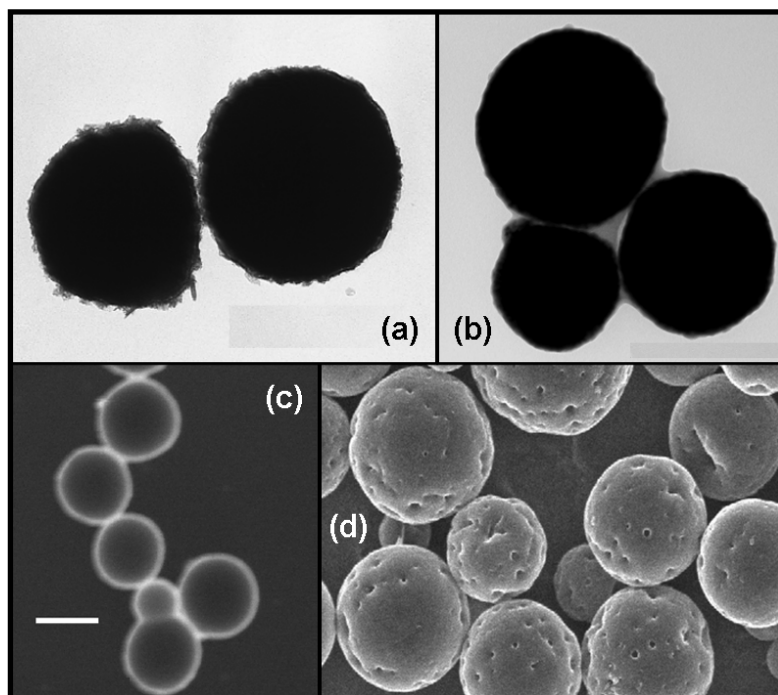


Figura 8. Microfotografías TEM (a), HRTEM de campo claro (b), HRTEM de campo oscuro (c) y SEM (d) de las partículas compuestas.

Longitud de barra: 500 nm.

Con respecto al tamaño, se realizaron medidas sobre 100 partículas recubiertas, para obtener el histograma de la Figura 9. El diámetro medio y su desviación estándar (620 ± 140 nm) se obtuvieron ajustando al histograma una distribución normal logarítmica (Arias y cols., 2007).

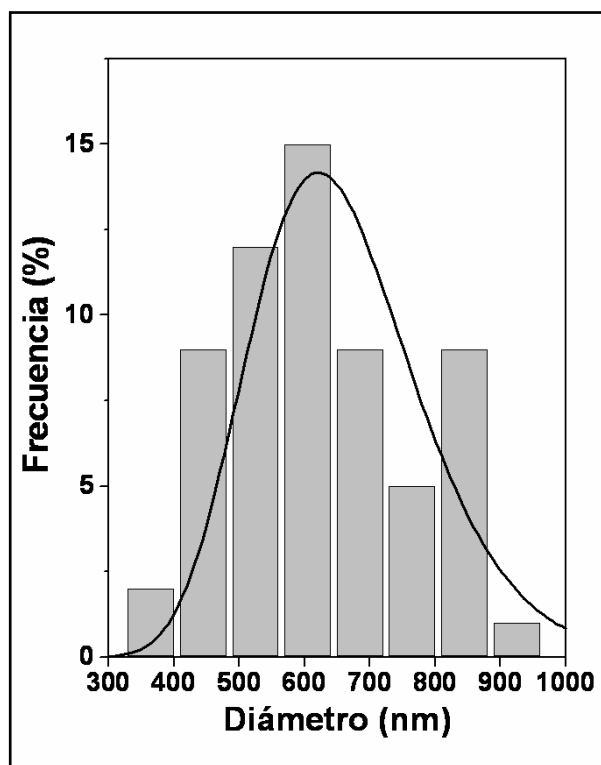


Figura 9. Histograma de frecuencias relativas de diámetros de las partículas compuestas. La curva corresponde a una distribución logarítmica ajustada.

En este momento, es preciso realizar una serie de consideraciones en relación al tamaño y la aplicación para la que están concebidas las partículas recubiertas. Debemos partir de la base de que la capacidad de respuesta magnética de las partículas compuestas, es

decir, su momento magnético, será tanto mayor cuanto mayor sea su tamaño. En cualquier caso, el tamaño no sólo afecta a las propiedades físicas, entre ellas las magnéticas, sino también, y lo que es más importante, a su comportamiento en el organismo tras su administración. De acuerdo con Gupta y Gupta (2005), las partículas con un diámetro por encima de 200 nm son fácilmente captadas por el bazo y retiradas de la circulación por las células del sistema retículo endotelial. Por otro lado, los sistemas transportadores muy pequeños (de menos de 10 nm), serán rápidamente aclarados tras sufrir una extensa extravasación. Por lo tanto, el rango ideal de tamaños para que un sistema transportador coloidal presente una adecuada distribución sistémica se encuentra en torno a 10 – 100 nm. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la acción terapéutica se consigue con sólo lograr la retención de las partículas mediante un campo magnético en los capilares que alimentan el órgano o tejido diana, y que éstas liberen el principio activo, el cual difundirá desde la pared capilar hasta el interior del lugar de acción. Teniendo en cuenta este mecanismo, no sólo es crucial en el conjunto del proceso el tamaño de partícula, sino también el peso molecular del fármaco (Maeda y cols., 2003). Finalmente, si para que el sistema transportador de fármacos realice su acción se requiere su extravasación, diversos autores señalan que este proceso se observa en partículas de tamaño inferior a 0.5 – 5 μm , incluso tras retirar el campo magnético aplicado (Goodwin y cols., 1999; Gupta y Gupta, 2005; Maeda y cols., 2003). Según esto, el sistema transportador diseñado, cuyo tamaño medio es 620 ± 140 nm, debería sufrir también una extensa extravasación en el órgano o tejido diana tras su concentración en este mediante un campo magnético aplicado.

2.2. Estructura, composición química y magnetismo.

2.2.1. Superficie específica.

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 principio activo 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.

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

El modo en el que un material adsorbe un gas se asemeja a una isoterma de adsorción. El tipo de isoterma más común y útil para las medidas B.E.T. es la isoterma tipo II (Figura 10). El punto de inflexión de esta isoterma generalmente indica el recubrimiento monocapa del adsorbato.

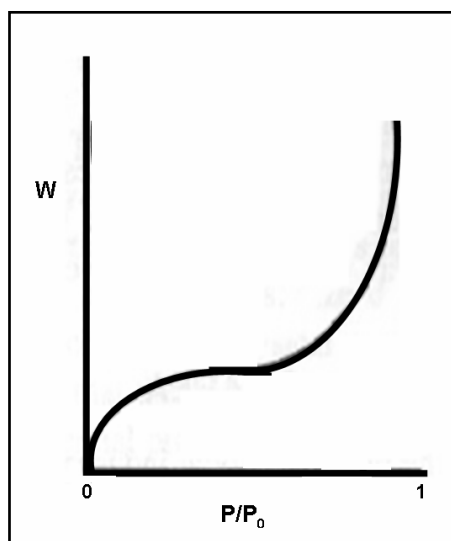


Figura 10. Isoterma de adsorción tipo II. W : Masa adsorbida;
 P/P_0 : Presión relativa. La saturación se produce a $P/P_0 \geq 1$.

La ecuación B.E.T. del área superficial está basada en la teoría de Langmuir de la cinética de adsorción superficial en monocapa de un gas. Como es sabido Brunauer, Emmett y Teller extendieron la teoría de Langmuir a la adsorción de multicapas moleculares y establecieron su conocida ecuación:

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

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

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

siendo 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. De aquí es inmediato obtener la superficie esférica (S).

❖ 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, en concreto, 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, que

implica la adsorción y desorción repetida de un adsorbato a una presión relativa de aproximadamente 0.3 (López-González y cols., 1955). Generalmente, con la realización de al menos 5 ciclos obtenemos una superficie limpia.

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 en todos los casos: polímero, hierro carbonilo y 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 de la muestra empleando la ecuación B.E.T.

❖ Resultados

La superficie específica obtenida para el hierro carbonilo fue $1.72 \pm 0.23 \text{ m}^2/\text{g}$, mucho mayor que la del látex de etilcelulosa ($0.79 \pm 0.17 \text{ m}^2/\text{g}$) y que la de las partículas compuestas ($0.86 \pm 0.08 \text{ m}^2/\text{g}$). Esta reducción del área superficial de los núcleos de hierro carbonilo, al ser recubiertos por el látex, es una prueba más de la eficacia del recubrimiento. La similitud entre las superficies específicas del látex y de las partículas compuestas, indica la existencia de un recubrimiento eficaz, teniendo en cuenta que nuestros tres tipos de partículas (hierro, látex y compuestas) tienen un tamaño similar. Además, los cambios producidos en el área superficial de los núcleos magnéticos tras un adecuado recubrimiento por el látex reflejan un verdadero cambio en las propiedades físicas de éstos (Arias y cols., 2007). Para terminar, no podemos dejar de comentar que sería de esperar un mayor valor de superficie específica en las partículas poliméricas y compuestas, consecuencia de la elevada porosidad de su superficie (ver Figuras 6c y 8d) (Petrov y cols., 2006; Yang y cols., 2000). Esto quizás no se haya producido como consecuencia del proceso de secado de las muestras, el cual parece provocar la formación de una capa polimérica continua y uniforme en el plato de desecación

2.2.2. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier.

La radiación infrarroja se encuentra localizada en el espectro electromagnético entre la zona del visible y la zona del microondas. Una molécula orgánica absorbe y convierte la

radiación infrarroja entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} (zona de gran interés en Química Orgánica) en energía de vibración molecular. Esta absorción es cuantificable y el espectro aparece en forma de bandas porque un cambio simple de energía vibracional es acompañado por diversos cambios de energía rotacional. Las posiciones de las bandas en el espectro de infrarrojos se suelen presentar en función del número de ondas (κ), y las intensidades de las bandas pueden expresarse como transmitancia (T) o absorbancia (A).

Hay dos tipos de vibraciones moleculares (Silverstein y Webster, 1998): 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, el mecanismo que acopla la vibración de la molécula con el campo eléctrico oscilante de la radiación electromagnética: si el campo eléctrico de la onda electromagnética no modifica el momento dipolar, no se producirá absorción. 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 de 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.).

❖ 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 (Silverstein y Webster, 1998).

Para la obtención del interferograma se utilizó un espectrómetro de infrarrojos (Nicolet 20 SXB, USA), con una resolución de 2 cm^{-1} . La técnica implica la división de una radiación que contiene todas las longitudes de onda (en nuestro caso: 4000 – 400 cm^{-1}) en dos rayos (Silverstein y Webster, 1998). 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.

Aunque no hay reglas establecidas para la interpretación de espectros de infrarrojos, existen ciertos requisitos previos a la interpretación de un espectro (Silverstein y Webster, 1998):

- 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 la longitud de onda de absorción dependen de las masas relativas de los átomos, de las constantes de fuerza de los enlaces, de la geometría de los átomos y del entorno molecular. 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 infrarrojos se distinguen 3 zonas características (Silverstein y Webster, 1998):

- 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.

❖ Resultados y discusión

Debemos comentar en primer lugar que sólo mediante la combinación de diversas técnicas analíticas se puede realizar una correcta determinación de la estructura molecular de un material, por ejemplo, una adecuada caracterización se alcanzaría con la utilización de la espectroscopía de infrarrojos en combinación con la resonancia magnética nuclear o la espectrometría de masas. Es

por ello que hemos realizado una caracterización extensa de las partículas de etilcelulosa mediante la realización de las dos primeras técnicas. Sin embargo, este no era nuestro principal objetivo ya que lo que pretendemos realmente es utilizar la espectroscopía de infrarrojos como una nueva prueba de la eficacia de la síntesis de las partículas compuestas.

En la Figura 11 se recoge el espectro de infrarrojos de nuestros tres tipos de partículas. El espectro del látex de etilcelulosa coincide con el obtenido por otros autores (Fernández-Urrusuno y cols., 2000). Su análisis constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento, dado que permite la identificación de los grupos funcionales del látex de etilcelulosa, en las partículas compuestas. Sin embargo, las bandas son menos intensas como consecuencia de la menor cantidad de látex presente en éstas (Arias y cols., 2007). Las bandas observadas son:

- **A y C:** debidas a la humedad que adquieren las muestras como consecuencia de su proceso de manipulación.

En las partículas de látex de etilcelulosa, se sitúan a 3489 cm^{-1} y 1632 cm^{-1} .

- **B:** grupo de bandas que corresponden a la vibración de estiramiento del grupo C–H de la estructura polimetilénica del tetrahidropirano. En el látex se localiza entre 2981 y 2808 cm^{-1} .

- **D:** grupo de bandas que corresponden a la vibración molecular de flexión del C–H de la estructura polimetilénica del alcano cíclico. En las partículas de látex aparece entre 1485 y 1279 cm^{-1} .
- **E:** entre 1109 y 1057 cm^{-1} , en las muestras que contienen látex, aparece un grupo de bandas de intensidad alta que corresponde a la vibración de estiramiento del grupo éter C–O–C en un anillo de seis átomos.
- **F:** en las muestras que contienen etilcelulosa, entre 918 y 881 cm^{-1} aparece un grupo de bandas de intensidad media característico de un alcano.
- **G:** a 579 cm^{-1} , banda que confirma que la banda carbonílica observada entre 1109 y 1057 cm^{-1} corresponde a un éter.

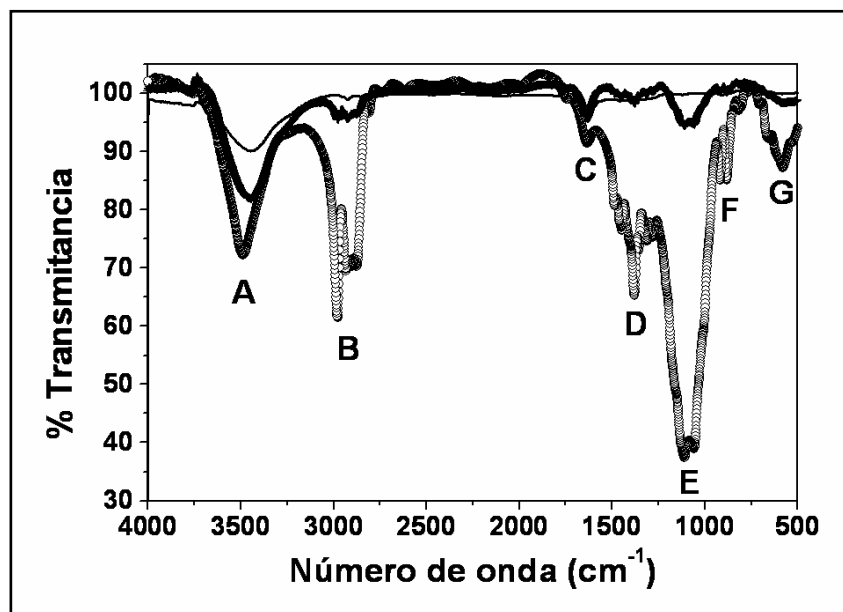


Figura 11. Espectro de infrarrojos de las partículas de hierro carbonilo (-), látex de etilcelulosa (o) y partículas compuestas (+).

2.2.3. Resonancia magnética nuclear.

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 (Skoog y cols., 2001).

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 investigación farmacéutica 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 (Bugay, 1995).

❖ Metodología experimental de la 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

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 el cloroformo deuterado (CDCl_3), el cual no tiene resonancias en la región de interés, aunque da lugar a un pequeño pico a $\delta = 7.26$ ppm que no interferirá seriamente el análisis (Skoog y cols., 2001).

En nuestro estudio 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 traduce al dominio de la frecuencia mediante una transformación de Fourier.

La frecuencia de la radiación 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 de 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 se expresa en términos de desplazamiento relativo (ppm); y el desdoblamiento espín-espín (Hz), que se produce cuando el momento magnético de un núcleo interacciona con los momentos magnéticos de núcleos adyacentes.

❖ **Resultados y discusión**

El espectro de RMN de protones de un compuesto es su huella dactilar y la identificación se logra mediante la comparación con espectros simples o con los desplazamientos químicos aproximados de protones de determinados grupos funcionales asociados al tetrametilsilano (TMS), (Silverstein y Webster, 1998).

El primer paso en un análisis de este tipo es determinar si los máximos 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 por grupos de líneas llamadas multipletes, que surgen por interacciones a través de enlace entre momentos magnéticos de núcleos vecinos. La información contenida en un espectro RMN incluye los desplazamientos químicos, las constantes de acoplamiento espín-espín y, algunas veces, señales relativas a las constantes de acoplamiento. Los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento son extremadamente sensibles a la estructura molecular y constituyen la base para la aplicación de la RMN a la identificación de la estructura molecular.

La Figura 12 recoge el espectro ^1H -RMN de las partículas de látex de etilcelulosa. Como puede apreciarse, se diferencian claramente tres picos que se interpretan como sigue: la intensa banda *A* ($\delta = 0.8 - 1.2$ ppm) corresponde a los protones de los grupos metilo y metileno de la cadena lateral de la molécula. La amplia banda *B* ($\delta = 3.0 - 4.3$ ppm) es generada por los hidrógenos de los grupos C-H de la estructura polimetilénica del tetrahidropirano. Por último, el pequeño pico puntiagudo *C* ($\delta = 7.2$ ppm) es producido por el disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3), el cual no interfiere en el análisis.

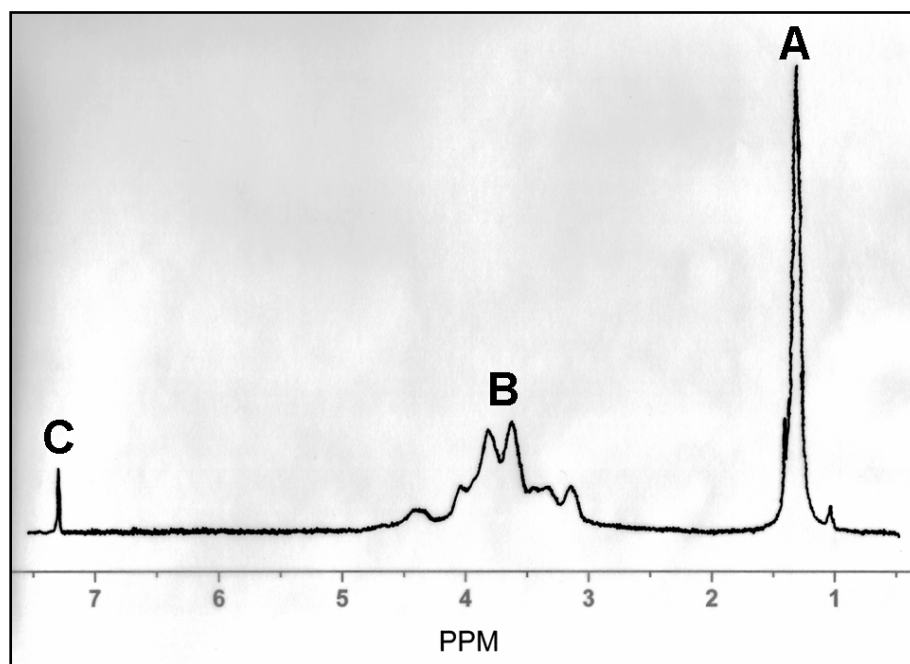


Figura 12. Espectro de ^1H -RMN del látex de etilcelulosa.

❖ Metodología experimental de la RMN de carbono 13 (¹³C-RMN).

Para la obtención de espectros de ¹³C-RMN es preciso disponer de instrumentos suficientemente sensibles que permitan la detección de las débiles señales del núcleo del ¹³C. 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 ¹³C-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.

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 CDCl₃ a $\delta = 77$ ppm, que no debe interferir en el análisis.

❖ Resultados y discusión

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 ¹³C-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 (Silverstein y Webster, 1998).

En la Figura 13 se representa el espectro de ^{13}C -RMN de las partículas de etilcelulosa. Las bandas *A* (17.9 ppm) y *D* (66.5 ppm) pertenecen, respectivamente, a los carbonos de los grupos metilo y metileno de la cadena sustituyente de la molécula. Las bandas *B* (32.4 ppm), *C* (34.7 ppm) y *E* (68.8 ppm) pertenecen a los carbonos de la estructura polimetilénica del tetrahidropirano situados, respectivamente, en posición γ , β y α con respecto al átomo de oxígeno. La banda *F* es característica del disolvente (77.1 ppm). La banda observada a 83.6 ppm (*G*), pertenece al carbono localizado entre el átomo de oxígeno del heterociclo y el átomo de oxígeno que actúa como enlace entre las estructuras tetrahidropiránicas.

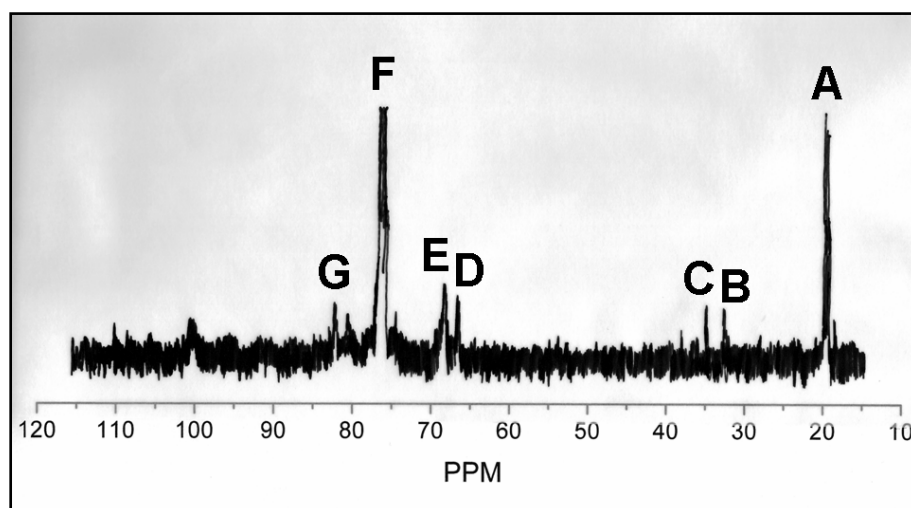


Figura 13. Espectro de ^{13}C -RMN del látex de etilcelulosa

2.2.4. Propiedades magnéticas.

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 (Callister, 1996).

- **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 que definen estas magnitudes: la susceptibilidad χ es una magnitud característica de cada material (en general, depende de la temperatura, de la orientación de la muestra respecto al campo aplicado y del valor de éste) y relaciona la imanación M (momento magnético por unidad de volumen) y el campo magnético H :

$$M = \chi \cdot H \quad (8)$$

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

$$B = \mu_0 (H + M) \quad (9)$$

Siendo μ_0 la permeabilidad magnética del vacío. Aplicando la Ec. 8:

$$B = \mu_0 (1 + \chi) H = \mu_0 \mu_r H = \mu H \quad (10)$$

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 imanación cuando, mediante rotación, se alineen de forma preferente con un campo externo. La susceptibilidad es positiva y depende de la temperatura, y la permeabilidad relativa 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.

❖ **Metodología experimental.**

Las propiedades magnéticas de las partículas de 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 en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Cualquier material ferromagnético o ferrimagnético (Callister, 1996; Mercouruff, 1969) a temperaturas inferiores a la temperatura de Curie está formado por pequeñas regiones tridimensionales en las cuales todos los momentos magnéticos están alineados en la misma dirección. Estas regiones se denominan dominios y cada uno está magnetizado hasta la saturación. Los dominios adyacentes están separados por paredes de dominio, a través de las cuales la dirección de imanación cambia gradualmente. La densidad de flujo (B) y la intensidad del campo magnético (H) no son proporcionales en el caso de los materiales ferromagnéticos y ferrimagnéticos. Si el material está inicialmente no imanado, entonces B varía en función de H según se muestra en la Figura 14. 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 Figura 14 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 Figura 14.

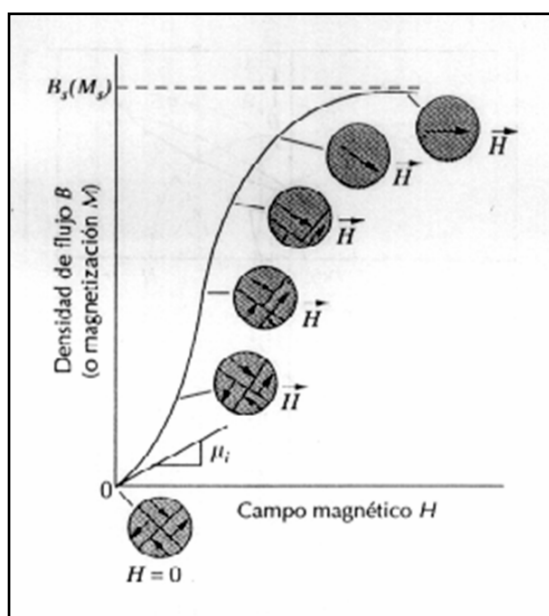


Figura 14. Comportamiento de B frente a H de un material ferromagnético o ferrimagnético que estaba inicialmente desmagnetizado. Se representan las configuraciones de los dominios durante varios estadios de la imanación.

A medida que aumenta 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 Figura 14. Inicialmente, los momentos de los dominios constituyentes están orientados al azar de tal manera que no existe imanación neta. 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 .

A partir de la saturación, punto S de la Figura 15, 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 .

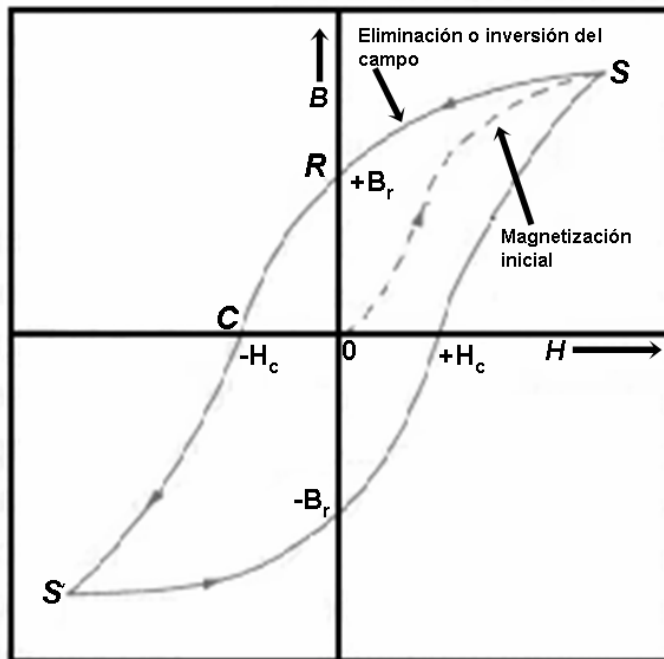


Figura 15. Densidad de flujo magnético frente a la intensidad del campo magnético de un material ferromagnético para la saturación en ambas direcciones (puntos S y S'). La curva de histéresis viene representada por la curva sólida y la curva discontinua indica la primera imanación. La remanencia B_r y el campo coercitivo H_c también se indican.

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 Figura 15), el proceso mediante el cual cambia la estructura de los dominios se invierte. En primer lugar, existe rotación del dominio único con el campo invertido. Más tarde, los dominios con los momentos magnéticos alineados con el nuevo campo crecen a expensas de los primeros. Para esta explicación es crucial la

resistencia al movimiento de las paredes de los dominios que ocurre en respuesta al aumento del campo magnético en la dirección opuesta; esto explica el desfase entre B y H , es decir, la histéresis. Cuando el campo aplicado se hace nulo, todavía existe una fracción neta de dominios orientados en la dirección inicial, lo cual explica la existencia de la remanencia B_r .

Para reducir a cero el campo B dentro de la muestra (punto C de la Figura 15), 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 o campo coercitivo. 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 Figura 14 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.

Para investigar la capacidad de respuesta de las partículas recubiertas a un campo magnético externo aplicado además, se llevaron a cabo observaciones microscópicas (cualitativas) de la capacidad de respuesta de las partículas recubiertas a un campo magnético externo. Para ello, se preparó una suspensión acuosa de

partículas compuestas con una concentración del 0.5 % (p/v), la cual fue sometida a un imán permanente de 0.2 T. La visualización de la muestra se realizó utilizando un microscopio con zoom estereoscópico Nikon SMZ800 (Japón).

❖ **Resultados: imanación de las partículas recubiertas**

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 (Arias y cols., 2007). En la Figura 16 representamos la curva de primera imanación o curva $M-H$ de las partículas de hierro carbonilo y de las partículas compuestas (hierro carbonilo – látex de etilcelulosa). Además se aprecia cómo el recubrimiento polimérico reduce la imanación de la muestra, aunque el comportamiento del hierro carbonilo y de las partículas recubiertas es muy similar. Así, la susceptibilidad inicial es $\chi_i = 22.1 \pm 0.2$ para el hierro carbonilo y $\chi_i = 9.1 \pm 0.1$ para las partículas compuestas; mientras que la imanación de saturación es 1698 ± 5 para el hierro carbonilo y 703.3 ± 0.8 kA/m para las partículas recubiertas.

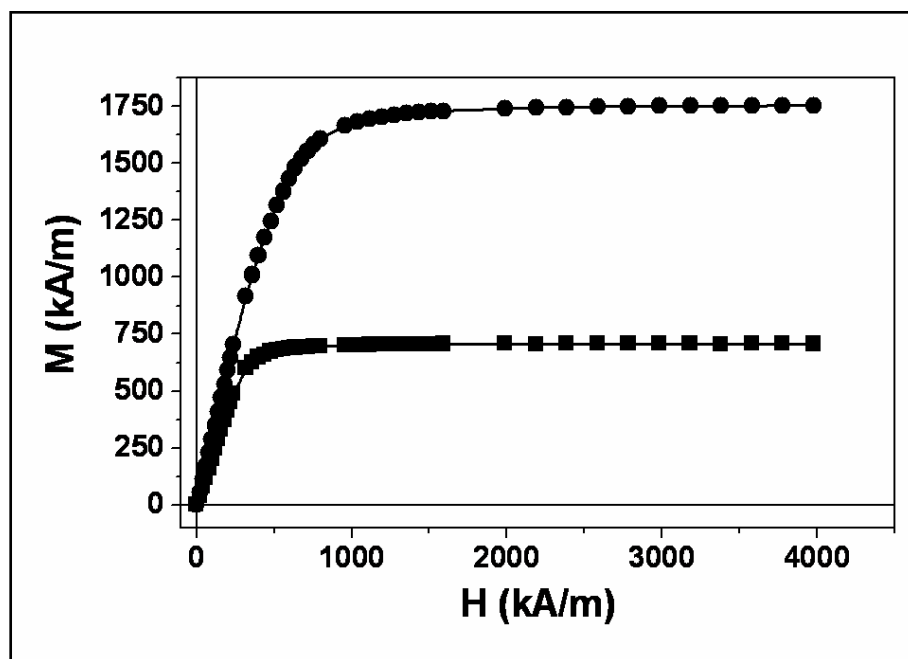


Figura 16. Curva de primera imanación del hierro carbonilo (●) y de las partículas compuestas (■).

La obtención del ciclo de histéresis permite completar la caracterización (a nivel macroscópico) del comportamiento magnético de las partículas (Arias y cols., 2007). En la Figura 17 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 estos 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 y con pérdidas de energía pequeñas; es decir, son fácilmente magnetizables y desmagnetizables.

Nuevamente se observa cómo el recubrimiento reduce las propiedades magnéticas de la muestra, aunque el comportamiento del hierro carbonilo y de las partículas recubiertas es muy similar. De esta forma, las partículas compuestas cumplen pues con el requisito marcado: su superficie es comparable a la del látex, pero tienen la propiedad de ser imanables, con lo que constituyen un vehículo ideal para el transporte de fármacos.

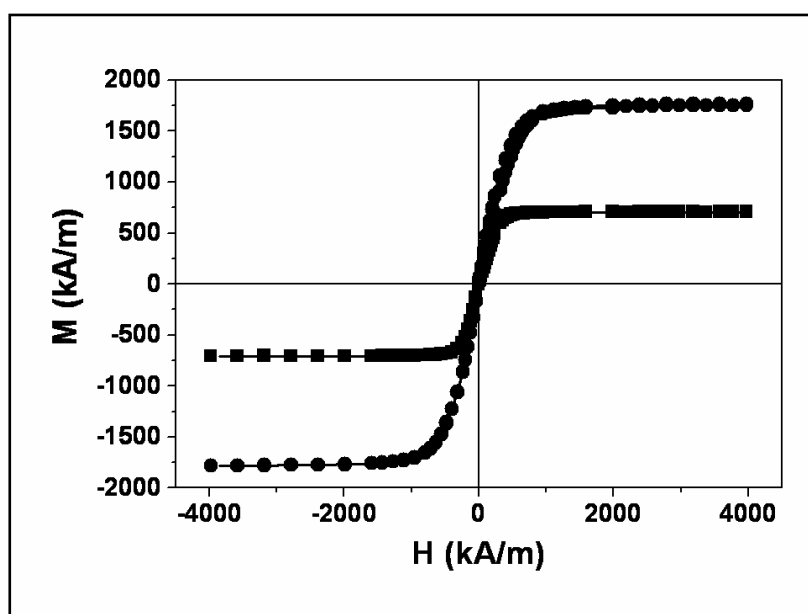


Figura 17. Curva de histéresis del hierro carbonilo (●) y de las partículas compuestas (■).

Para terminar con la caracterización de las propiedades magnéticas de las partículas recubiertas investigamos el comportamiento de sus suspensiones en respuesta a un campo magnético aplicado. En este estudio se observó cómo la distribución inicialmente homogénea de las partículas en suspensión (Figura 18 a)

se alteraba claramente cuando se las sometía a un campo magnético externo, produciéndose la formación de agregados en forma de cadenas paralelas a la dirección del campo magnético aplicado (Figura 18 b). Este comportamiento puede explicarse si tenemos en cuenta la mayor importancia de las interacciones magnéticas en comparación con las interacciones coloidales de tipo DLVO (interacciones electrostáticas tipo van der Waals y de hidratación o ácido-base) que se producen entre las partículas compuestas, a pesar de la presencia del recubrimiento polimérico entorno a los núcleos magnéticos.

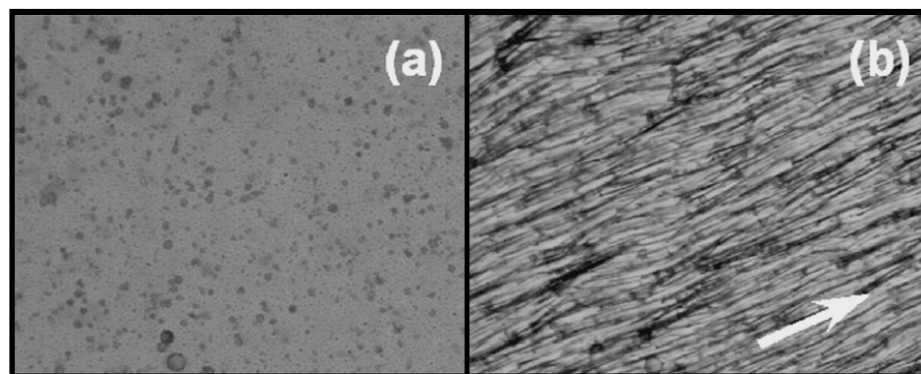


Figura 18. Fotografías de microscopio óptico (magnificación $63\times$) de una suspensión acuosa de nanopartículas recubiertas en ausencia (a) o bajo la influencia de un campo magnético externo ($B = 0.2$ T) en la dirección de la flecha.

CAPÍTULO 3

PROPIEDADES ELÉCTRICAS

3.1. Introducción.

Consideremos una partícula sólida esférica de 1 cm de diámetro. Su superficie S y su volumen V son $3.14 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ y $5.24 \times 10^{-7} \text{ m}^3$, respectivamente, y la relación superficie/volumen es $S/V \approx 600 \text{ m}^{-1}$. 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 $S/V \approx 3 \times 10^7 \text{ m}^{-1}$. 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 $F^{EL} \approx 2.12 \times 10^{-12}$ N. Esta fuerza tiene que compararse con otras interacciones que deben o pueden existir entre ellas. Así, su atracción gravitatoria a la misma distancia será $F^G \approx 6.3 \times 10^{-15}$ N, si su densidad es 10^3 Kg/m³; y la atracción de van der Waals $F^{LW} \approx 8 \times 10^{-13}$ N, utilizando los valores típicos de la constante de Hamaker (Hunter, 1987). Estos ejemplos muestran que, en la mayoría de los casos, las interacciones electrostáticas son fundamentales en la determinación 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 (al igual que 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 (u_e) de

los tres tipos de partículas (núcleos magnéticos, polímero puro y partículas compuestas), 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 látex de etilcelulosa son claramente diferentes, como veremos (Arias y cols., 2007). Por lo tanto, cabe la posibilidad de que una partícula de hierro carbonilo recubierta adecuadamente de látex de etilcelulosa 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 látex.

3.2. Descripción clásica de la doble capa eléctrica.

Admitiremos como un hecho experimental que la mayoría de los sólidos adquieren una carga eléctrica superficial cuando se dispersan en un disolvente polar, en particular, en una disolución de electrolito. Los orígenes de esta carga son diversos (Hunter, 1981, 1987; Lyklema, 1987, 1995):

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 que 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 (Van Olphen, 1977).

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

Cerca de la superficie o sobre ella, se pueden encontrar cargas responsables de la carga superficial σ_0 . En su proximidad inmediata, podrían localizarse los iones capaces de sufrir adsorción específica: la distancia al sólido será del orden de un radio iónico, dado que se puede suponer que han perdido su capa de hidratación, al menos en la dirección de la superficie del sólido. Llamemos σ_i a la carga superficial en un determinado plano de átomos, localizados a una distancia β_i desde el sólido (Figura 19). 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):

$$\Psi_0 - \Psi_i = \frac{\sigma_0}{C_i} \quad (11)$$

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. (Lyklema, 1987). 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.

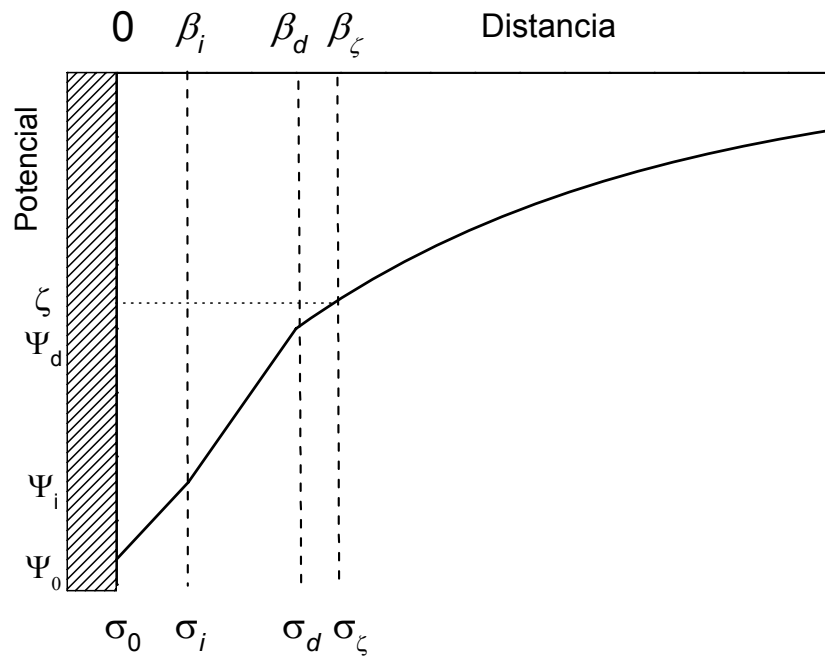


Figura 19. Representación esquemática de la distribución de potencial en una interfase cargada negativamente.

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:

$$\sigma_d = \int_{\beta_d}^{\infty} \rho(x) dx \quad (12)$$

para una interfase plana, o:

$$\sigma_d = \frac{1}{(a + \beta_d)^2} \int_{\beta_d}^{\infty} r^2 \rho(r) dr \quad (13)$$

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

Debido a la electroneutralidad:

$$\sigma_0 = -\sigma_i - \sigma_d \quad (14)$$

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.
4. Al potencial en $x = \beta_d$ se le llama potencial Helmholtz o potencial de difuso.

La capa difusa puede describirse matemáticamente de una manera simple: la condición de equilibrio para los iones en esta capa puede escribirse (Russel y cols., 1989):

$$-ez_i \nabla \psi - k_B T \nabla \ln n_i = 0, \quad i = 1, \dots, N \quad (15)$$

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 Ecuación 15 bajo la condición $n_i = n_i^0(\infty)$ para $\psi = 0$, da lugar a la distribución de Boltzmann:

$$n_i(\vec{r}) = n_i^0(\infty) \exp[-ez_i \psi(\vec{r}) / k_B T], \quad i = 1, \dots, N \quad (16)$$

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:

$$\nabla^2 \psi(\vec{r}) = -\frac{1}{\epsilon_{rs}\epsilon_0} \rho(\vec{r}) = -\frac{1}{\epsilon_{rs}\epsilon_0} \sum_{i=1}^N e z_i n_i^0(\infty) \exp\left[-\frac{e z_i \psi(\vec{r})}{k_B T}\right] \quad (17)$$

siendo $\epsilon_{rs}\epsilon_0$ la permitividad eléctrica del medio de dispersión. La Ecuación 17 (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, (Dukhin, 1974; Russel y cols., 1989), por lo que nos limitaremos a mostrar cualitativamente el modo típico de variación del potencial con la distancia a la partícula. La Figura 20 ilustra esta variación para una interfase plana y permite compararla con el valor aproximado de Debye-Hückel, válido para bajos valores de ψ_d :

$$\psi = \psi_d e^{-\kappa x} \quad (18)$$

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

$$\kappa^{-1} = \left\{ \frac{\epsilon_{rs}\epsilon_0 k_B T}{\sum_{i=1}^N e^2 z_i^2 n_i^0(\infty)} \right\}^{1/2} \quad (19)$$

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.

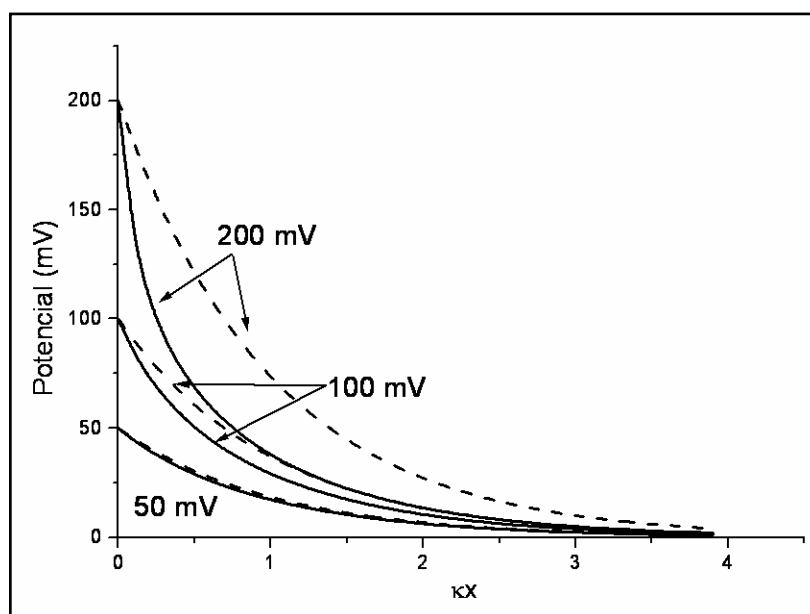


Figura 20. Distribución del potencial en una interfase plana, calculado mediante la fórmula aproximada de Debye-Hückel [Ecuación 18, (---)] y el cálculo completo para los valores de ψ_d indicados. Electrolitos monovalentes.

3.3. Fenómenos electrocinéticos. Potencial zeta.

Supongamos que se aplica un campo eléctrico paralelamente a la interfase sólido/disolución de la Figura 19 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 Figura 19) 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 (Lyklema, 1977), (Delgado, González-Caballero, Hunter, Koopal, Lyklema, 2007) ya que se basan en la aceptación de que la viscosidad del medio líquido varía discontinuamente desde un valor 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 (Dukhin, 1974; Lyklema, 1977), 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 (Dukhin, 1974).

Los avances de la teoría de los fenómenos electrocinéticos (Delgado, González-Caballero, Hunter, Koopal, Lyklema, 2007; Zukoski y Saville, 1986; Mangelsdorf y White, 1990; Mangelsdorf y White, 1998 a, b; Lyklema y Minor, 1998) 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.

❖ **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, el campo aplicado 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 se de la condición (llamada de doble capa delgada):

$$\kappa^{-1} \ll a \text{ o } \kappa a \gg 1 \quad (20)$$

Puede demostrarse que la velocidad del fluido lejos de la partícula, tomada como referencia, es (Shilov, Delgado, Gonzalez-Caballero, Grosse., 2000):

$$v_{\infty} = -\frac{2}{3} \frac{\varepsilon_{rs} \varepsilon_0}{\eta} \zeta [1 - C] \quad (21)$$

siendo C el llamado coeficiente dipolar, cuyo valor es $\frac{1}{2}$ si la partícula no está muy cargada y, como se dijo su permeabilidad es mucho menor que la del fluido. Por lo tanto, la velocidad del líquido lejos de la partícula será:

$$v_{\infty}^{\rho} = -\frac{\varepsilon_{rs} \varepsilon_0}{\eta} \zeta E^{\rho} \quad (22)$$

La Ecuación 22 es conocida como la ecuación de Helmholtz para la electroósmosis. Si cambiamos al sistema de referencia del

laboratorio, se tendrá la velocidad electroforética de la partícula,
 $v_e = -v_\infty$:

$$v_e = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \zeta E = u_e E \quad (23a)$$

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

$$u_e = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \zeta \quad (23b)$$

Conviene insistir en que la Ecuación 23 b es válida para cualquier geometría a condición de que (Morrison, 1970; Overbeek, 1950):

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

- La partícula no es conductora y los efectos de la conductancia superficial son despreciables.
- La constante dieléctrica y la viscosidad del medio son independientes de la posición.
- 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.

❖ **Electroforesis: tratamientos más elaborados.**

Henry (1931) fue el primer autor que eliminó la tercera restricción anterior, y resolvió el problema para esferas (también para cilindros infinitos) de cualquier radio a , es decir, cualquier valor de κa , aunque para pequeños potenciales zeta. Restringiéndonos al caso de la esfera, la ecuación de Henry para partículas no conductoras es:

$$u_e = \frac{2}{3} \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0}{\eta} \zeta f(\kappa a) \quad (24)$$

donde:

$$f(\kappa a) = 1 + \frac{(\kappa a)^2}{16} - 5 \frac{(\kappa a)^3}{48} + \dots \quad (25)$$

Una fórmula aproximada para $f(\kappa a)$ ha sido publicada por Ohshima (1998).

Una contribución crucial para entender y evaluar la movilidad electroforética y, en general, la física del fenómeno electrocinético se debió a Overbeek (1943, 1950). Booth (1948 a, b, 1950) también elaboró una teoría que siguió líneas similares, para esferas en ambos casos. Estos autores, fueron los primeros en considerar que durante la migración electroforética la doble capa pierde su simetría original, y se polariza: la distribución del potencial fuera del equilibrio no es la simple adición del creado por el campo externo en torno a la esfera no conductora y el de la doble capa eléctrica en equilibrio (Dukhin y Derjaguin, 1974). El problema matemático es mucho más complejo y hasta la aparición de los ordenadores sólo estaban disponibles teorías aproximadas (bajo ζ , gran κa (Booth, 1948 a, b; Overbeek 1943, 1950). 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. (1966) y O'Brien y White (1978).

Como no es relevante describir estos tratamientos, simplemente mostraremos algunos resultados en la Figura 21. La validez de la fórmula de Smoluchowski para valores elevados de κa y potenciales zeta de bajos a moderados es apreciable; también es evidente que el tratamiento de Henry es válido para ζ bajo, independientemente del grosor de la doble capa.

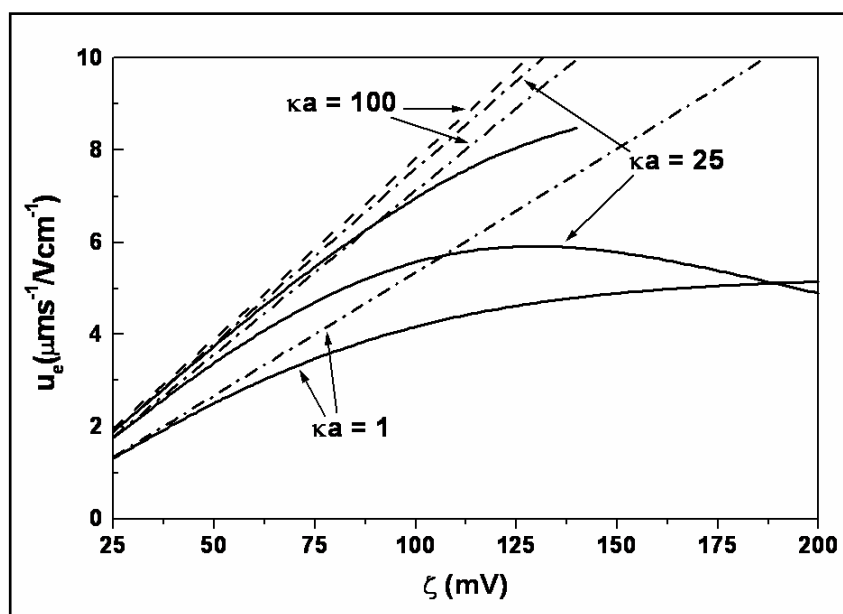


Figura 21. Movilidad electroforética vs. potencial zeta para partículas esféricas de radio $a = 100$ nm y para $\kappa a = 1, 25$ y 100 en disoluciones de KCl. Línea discontinua (---): ecuación de Smoluchowski; líneas discontinuas-punteadas (-.-): fórmula de Henry (1931); líneas continuas (-): teoría de O'Brien y White (1978).

3.4. Metodología experimental.

La determinación de la movilidad electroforética de los tres tipos de partículas en suspensión (hierro, etilcelulosa y compuestas) se llevó a cabo a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) utilizando un dispositivo Malvern Zetasizer 2000 (Malvern Instruments, Inglaterra), cuyo funcionamiento está basado en el análisis de la autocorrelación de la luz láser dispersada por las partículas en movimiento. Este aparato permite determinar u_e con errores del 5 % o inferiores. La temperatura se mantiene constante

durante las determinaciones (hasta ± 0.2 °C) utilizando un módulo Peltier.

Las suspensiones estudiadas tienen una concentración de partículas aproximada del 0.1 % (p/v). Antes de preparar la suspensión se fijó la concentración de electrolito deseada y se ajustó, en su caso, el pH con HCl y NaOH. Debido a la laboriosidad del ajuste de ciertos pHs, 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 para la estabilidad de sus propiedades eléctricas superficiales (fenómenos de oxidación y de degradación, principalmente). Las medidas se realizaron 24 horas después, comprobando y reajustando previamente el pH si era necesario. Los datos presentados son el promedio entre nueve y quince determinaciones, cambiando la muestra cada tres.

3.5. Resultados y discusión

En primer lugar, centramos nuestro estudio en el análisis del efecto del pH sobre la movilidad electroforética (u_e) y el potencial zeta (ζ) de las partículas. Utilizamos la teoría de O'Brien y White (1978) para convertir los valores de u_e en valores de ζ . La Figura 22 muestra los valores de potencial zeta en función del pH del medio y en presencia de NaCl 10^{-3} M. Como puede observarse, las partículas de hierro carbonilo presentan un punto isoeléctrico o pH de potencial zeta cero bien definido en las

proximidades de $\text{pH} = 5$. Este comportamiento no se aprecia en las partículas de látex de etilcelulosa, las cuales presentan una carga superficial neta negativa en todo el intervalo de pHs estudiado (de 3 a 9). Sólo a pHs inferiores a 3, los datos sugieren la presencia del pH de potencial zeta cero.

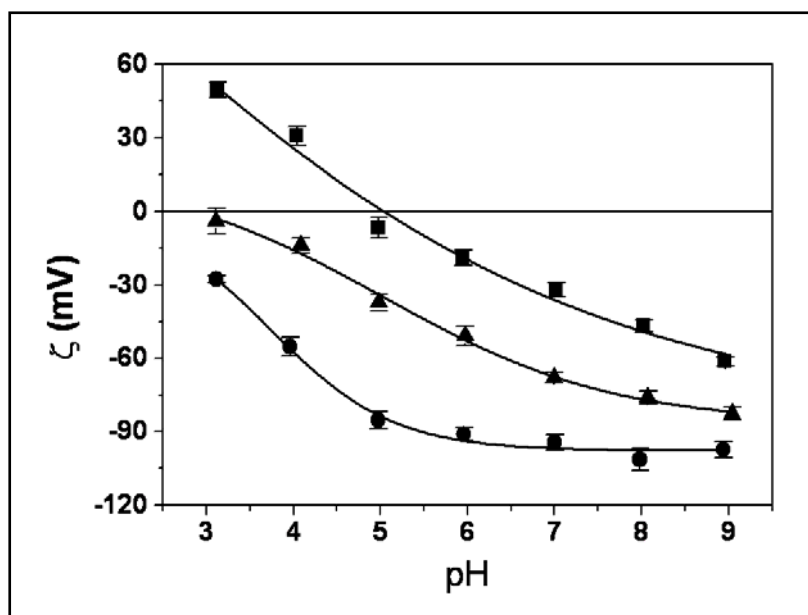


Figura 22. Potencial zeta del hierro carbonilo (■), el látex de etilcelulosa (●) y las partículas compuestas (▲) en función del pH, en presencia de $\text{NaCl } 10^{-3} \text{ M}$.

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 Figura 22 muestra claramente que las partículas compuestas presentan un comportamiento similar a las de etilcelulosa. Por lo tanto, el

recubrimiento de látex oculta eficazmente el núcleo magnético, haciendo que la superficie de las partículas compuestas sea casi indistinguible de la de las partículas de látex.

Dentro de esta investigación, un aspecto muy interesante es el análisis del origen de las cargas superficiales de las partículas. En el caso de las partículas metálicas, el origen de la carga superficial y su dependencia con el pH tiene relación con la similitud existente entre los puntos isoeléctricos de los metales y los de sus óxidos correspondientes (Kallay y cols., 1991). Estas similitudes se basan en que la carga superficial de la interfase metal/solución es generada por una capa de óxido anfotérica cuya formación es inevitable en entornos con carácter oxidante. En concreto, el punto isoeléctrico del hierro es similar al de la hematites ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Ya que, como se sabe, este óxido tiene un punto isoeléctrico entre 6 y 8 (Matijević, 2002), es lógico que las partículas de hierro presenten un pH de potencial zeta cero en las proximidades de la neutralidad.

En cuanto a las partículas de látex, el potencial zeta es negativo en todo el intervalo de pH investigado y se incrementa en valores absolutos hasta un pH cercano a la neutralidad. Teniendo en cuenta los resultados de la valoración de la carga del Aquacoat[®], un látex comercial muy similar a nuestras partículas (Gallardo y cols., 1993; Vera y cols., 1994, 1996), podemos esperar que las especies químicas responsables de la generación de esta carga negativa superficial en nuestro látex sean los grupos terminales disociados del NaDS. Esto es posible ya que es

predecible que parte del dodecilsulfato sódico utilizado en la síntesis permanezca adsorbido en la superficie de las partículas, incluso tras el proceso de limpieza descrito. Además, los grupos ácidos débiles superficiales, presumiblemente carboxílicos, serán también responsables de la dependencia de la carga superficial con el pH. Estos grupos proceden de la disociación del sustituyente que forma la cadena lateral de la estructura polimérica.

Para confirmar estos resultados, realizamos la determinación del potencial zeta en función de la concentración de NaCl a pH natural (≈ 5.5), siguiendo la misma metodología. Los resultados de este análisis se representan en la Figura 23, y de nuevo se aprecian las diferencias entre las partículas recubiertas y el hierro carbonilo.

Finalmente, debemos realizar un breve comentario sobre el efecto de la concentración de electrolito en los valores de potencial zeta de las partículas de látex. El incremento inicial de estos valores con la concentración de NaCl es sólo aparente, y se puede achacar a la falta de validez de la teoría de Smoluchowski cuando la conductividad eléctrica de la parte interna de la doble capa eléctrica (también llamada *stagnant layer conductivity*, *SLC*) es significativa.

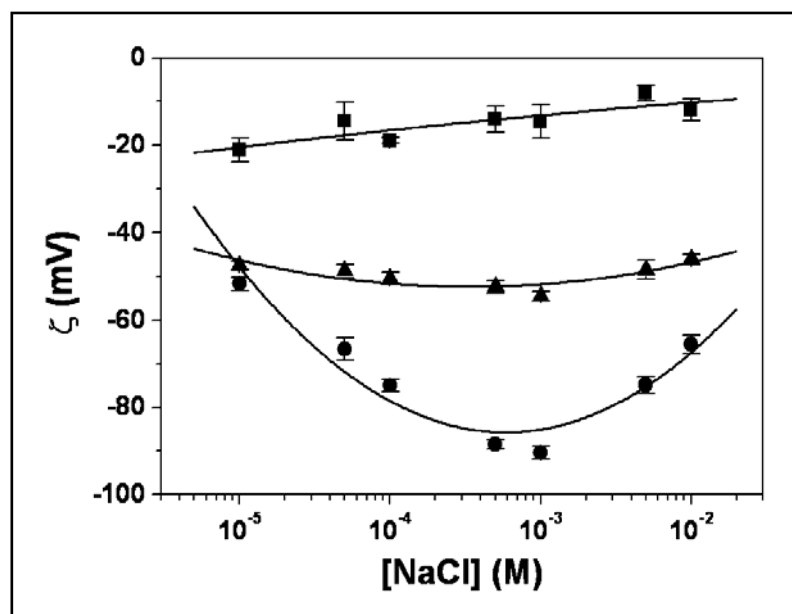


Figura 23. Potencial zeta del hierro carbonilo (■), el látex de etilcelulosa (●) y las partículas compuestas (▲) en función de la concentración de NaCl, a pH = 5.5.

La realización de un cálculo apropiado de los valores de ζ en el caso de SLC no nula no es objeto de nuestro trabajo y, de hecho, no es posible obtener información sobre los dos parámetros desconocidos (ζ y SLC) realizando sólo un experimento. Cuando la fuerza iónica es suficientemente alta ($> 10^{-3}$ M de NaCl), el efecto de la SLC es despreciable y los valores de potencial zeta pueden estimarse perfectamente mediante teorías estándar como la de Smoluchowski. Nótese que el fenómeno de SLC no se observa en el caso del hierro carbonilo, mientras que sí es notable cuando la superficie es polimérica, probablemente debido a la presencia de cadenas de polímero cargadas en la superficie.

El estudio electrocinético realizado nos sirve también para dar algo de luz al mecanismo por el que se forma el recubrimiento polimérico de los núcleos magnéticos: parece claro que se producirá una interacción electrostática atractiva entre las partículas de hierro carbonilo con carga superficial positiva y el polímero con carga negativa en las condiciones de acidez (10^{-3} N de HCl: $\text{pH} \approx 3$) en las que se realiza la síntesis (Figura 22). Debido a esta atracción electrostática, los alrededores de los núcleos magnéticos positivos se van a enriquecer en especies polimérica negativas en este rango de pHs, favoreciéndose así el recubrimiento de etilcelulosa por los núcleos magnéticos (Arias y cols., 2007).

CAPÍTULO 4

TERMODINÁMICA

SUPERFICIAL

4.1. Introducción

En este apartado pretendemos la identificación y la 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 polares 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 los 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, se prestará especial atención al análisis comparativo de la energía libre superficial de los diferentes tipos de materiales utilizados.

4.2. Interacciones superficiales.

La principal interacción interfacial admitida entre partículas coloidales cargadas, inmersas en un medio acuoso, es la interacción electrostática (*EL*) entre dobles capas eléctricas. 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), (Lyklema, 2005) 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: que se refiere a interacciones. El modelo teórico que nos permitirá analizarlas es el desarrollado por van Oss y cols. (1986).

❖ **Interacciones dispersivas.**

Van der Waals fue el primer autor en sugerir que en los líquidos y gases no ideales, existe entre los átomos y las 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 (1921), Debye (1921) y London (1930).

Las interacciones de London tienen lugar entre dipolos instantáneos originados por fluctuaciones de carga eléctrica y dipolos inducidos. Son universales y aparecen entre cualquier par

de átomos o moléculas en fase condensada (Fowkes, 1963). En este tipo de sistemas su contribución es muy superior a las otras fuerzas de origen dispersivo (Chaudhury y Good, Fowkes y Mostaza, 1983, 1978). 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 (Israelachvili, 1991). Resumiendo, las características esenciales de estas interacciones son:

- Pueden ser efectivas entre 0.2 y 10 nm de distancia.
- 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.
- 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 (Ninhan y Parsegian, 1970; Parsegian y Ninhan, 1969) y se denomina componente LW o Lifshitz-van der Waals (γ^{LW}) a la componente de la tensión superficial o energía libre superficial asociada a estas interacciones.

❖ **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 (Van Olphen, 1977). Tampoco se explica por qué las dispersiones de sílice no coagulan en el punto isoeléctrico en el seno de disoluciones salinas concentradas (Allen y Matijević, 1969). En nuestro grupo de investigación se han encontrado comportamientos similares en suspensiones de sulfato de zinc (Durán y cols., 1995) o de látex de etilcelulosa (Vera y cols., 1995), y en general aparecen en la bibliografía numerosas observaciones de esta naturaleza en los últimos años (Laskowski y cols., 1992; Pashley, 1992).

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 atracción por diferencias de presión osmótica en suspensiones muy concentradas de polímeros no adsorbidos sobre las partículas. 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.

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 por su capacidad de empaquetamiento. Cuando las interfases presentes son líquido – líquido o sólido – líquido se producen claras oscilaciones de densidad, pero en el caso de una interfase líquido – vapor tales oscilaciones no existen, como ha demostrado Israelachvili (1991).

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

(Christenson, 1988; Christenson y Horn, 1985; Horn e Israelachvili, 1981).

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 una 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 las 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 incluso 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 denominado ácido-base (γ^{AB}).

❖ **Contribuciones a la energía libre superficial. Teoría de van Oss, Good y colaboradores.**

a) *Tensión superficial.*

Para poder predecir el valor que adquieren las interacciones ya descritas [Lifshitz-van der Waals (LW) y ácido-base (AB)] es necesario hacer previamente una caracterización termodinámica de la superficie. Para ello, consideraremos el proceso reversible de acercar dos sistemas físicos en el vacío, formados por un sólido o líquido, I , hasta formar una fase continua (entran en contacto superficies iguales unitarias) (Good, 1993). 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 I (γ_1) de la forma:

$$\Delta G_{C,1} = -W_{C,1} = -2\gamma_1 \quad (26)$$

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 $1 - \text{vacío}$ y $2 - \text{vacío}$, pero se crea la $1 - 2$. Se define entonces la tensión interfacial (γ_{12}) mediante la ecuación:

$$\Delta G_{A,12} = -W_{A,12} = \gamma_{12} - \gamma_1 - \gamma_2 \quad (27)$$

conocida como ecuación de Dupré (Adamson, 1982).

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:

$$\Delta G_{123} = \gamma_{13} - \gamma_{12} - \gamma_{23} \quad (28)$$

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 :

$$\Delta G_{121} = -2\gamma_{12} \quad (29)$$

Este es el caso de la 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 el alcance de las interacciones de origen no electrostático en la interfase.

b) Modelo de van Oss, Good y Chaudhury.

Las investigaciones más recientes sobre la tensión superficial y sus componentes, han sido realizadas por van Oss (van Oss, 1993, 1994; van Oss y Good, 1989; van Oss y cols., 1986, 1987 a, b, 1988 a, b). 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):

$$\gamma_1 = \gamma_1^{LW} + \gamma_1^{AB} \quad (29)$$

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 Ecuación 29 se puede hacer extensiva a la energía libre de la interfase $I/2$:

$$\gamma_{12} = \gamma_{12}^{LW} + \gamma_{12}^{AB} \quad (30)$$

A continuación, se expresará matemáticamente cada uno de los dos sumandos de la tensión superficial de la Ecuación 30. Utilizando la regla de Good y Girifalco (1960), el primer término γ_{12}^{LW} queda de la forma:

$$\gamma_{12}^{LW} = \left(\sqrt{\gamma_1^{LW}} - \sqrt{\gamma_2^{LW}} \right)^2 = \gamma_1^{LW} + \gamma_2^{LW} - 2\sqrt{\gamma_1^{LW}\gamma_2^{LW}} \quad (31)$$

La obtención del segundo sumando (γ_{12}^{AB}) no puede hacerse mediante la regla anterior, pues como ya indicó Fowkes (van Oss, 1994) no es aplicable a las interacciones AB , que son esencialmente asimétricas. Se postula entonces, y esta es una contribución esencial de estos autores, la siguiente regla de combinación para la componente AB de la tensión interfacial:

$$\gamma_{12}^{AB} = 2 \left(\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+} \right) = 2 \left(\sqrt{\gamma_1^+} - \sqrt{\gamma_2^+} \right) \left(\sqrt{\gamma_1^-} - \sqrt{\gamma_2^-} \right) \quad (32)$$

donde γ_i^+ y γ_i^- representan, respectivamente, la contribución electrón-aceptor (ácido de Lewis) y electrón-donante (base de Lewis) a la tensión superficial de la fase i . La Ecuación 32 para una fase queda de la forma:

$$\gamma_1^{AB} = 2\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_1^-} \quad (33)$$

Sustituyendo la Ecuación 33 en la Ecuación 29:

$$\gamma_1 = \gamma_1^{LW} + 2\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_1^-} \quad (34)$$

Sustituyendo las Ecuaciones 31 y 32 en la Ecuación 30, y teniendo en consideración la Ecuación 34, se obtiene:

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 2\sqrt{(\gamma_1^{LW} \gamma_2^{LW})} - 2\sqrt{(\gamma_1^+ \gamma_2^-)} - 2\sqrt{(\gamma_1^- \gamma_2^+)} \quad (35)$$

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_1^{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.

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

$$\Delta G_{121} = -2\gamma_{12} = -2\left(\sqrt{\gamma_1^{LW}} - \sqrt{\gamma_2^{LW}}\right)^2 - 4\left(\sqrt{\gamma_1^+ \gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+}\right) \quad (36)$$

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, 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* ($\gamma = \gamma^{LW}$; $\gamma^{AB} = 0$, usualmente $\gamma^+ = 0$ y $\gamma^- \neq 0$) (van Oss y cols., 1988a), el elevado valor del carácter básico

de estas superficies las hace muy hidrófilas, existiendo fuertes interacciones repulsivas (*presión de hidratación*), por la presencia del factor $(\gamma_1^- \gamma_2^+)^{1/2}$, y por tanto se verifica que $|\Delta G_{121}^{AB}| > |\Delta G_{121}^{LW}|$.

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

4.3. Metodología experimental.

La tensión superficial de un líquido y la tensión interfacial entre dos líquidos son dos magnitudes a las que se puede tener acceso experimental de forma directa. Sin embargo, en el caso de los sólidos, es necesario recurrir a medidas de otras magnitudes para poder obtener a partir de ellas los valores de las tensiones superficiales. Junto con la técnica de penetración de líquidos en capa fina, la técnica de medida de ángulos de contacto es la más importante y habitual. Ambas han sido descritas con detalle en trabajos anteriores (Chibowski y cols., 1993; Durán y cols., 1994, 1995). Sin embargo, nos centraremos en una breve descripción de la técnica de medida de ángulos de contacto, ya que es la utilizada 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 que cumple la ecuación de Young (Neumann y cols., 1972):

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_L \cos \theta \quad (37)$$

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 Ecuación 37 se puede escribir de la forma:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta + \pi_e \quad (38)$$

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

$$\pi_e \equiv \gamma_S - \gamma_{SV} \quad (39)$$

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 (Janczuk y cols., 1987, 1989).

Bajo estas condiciones límite, $\pi_e = \gamma_S - \gamma_L$ (Janczuk y cols., 1989). 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:

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta \quad (40)$$

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 (la gota se retrae tras ser depositada y se desplaza sobre zonas ya mojadas), siendo los respectivos ángulos de contacto θ_a (avance) y θ_r (retroceso). Se verifica que θ_r es siempre inferior a θ_a . Este fenómeno puede dificultar la estimación del verdadero ángulo de contacto, pues existe una gran dependencia entre la amplitud de la histéresis y el volumen de la gota utilizado. Este efecto se puede

minimizar disminuyendo el volumen de la gota de líquido. Nuestras medidas experimentales se han realizado sobre el ángulo de avance.

Good (1977) justifica el fenómeno de la histéresis como una consecuencia de la heterogeneidad 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 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 (Chibowski y González-Caballero, 1993).

Una vez medidos los ángulos de contacto es posible determinar las componentes de la energía superficial del sólido. Sustituyendo en la Ecuación 40 el valor de γ_{SL} dado por la Ecuación 35, se obtiene:

$$2\sqrt{\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_S^+\gamma_L^-} + 2\sqrt{\gamma_S^-\gamma_L^+} = \gamma_L(1 + \cos\theta) \quad (41)$$

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 Ecuación 41 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 realizado en los tres tipos de partículas utilizadas: núcleo magnético (hierro), recubrimiento (látex de etilcelulosa) y partículas compuestas. Los líquidos empleados son: α -bromonaftaleno (Merck, Alemania), agua doblemente destilada y desionizada (Milli-Q Academic, Millipore, Francia) y formamida (Carlo Erba, Italia). En la aplicación del modelo de van Oss se utilizaron los datos bibliográficos recogidos en la Tabla 3, donde se especifican los valores de las componentes de la tensión superficial de los líquidos de prueba utilizados (van Oss y Good, 1989).

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

Líquido	γ^{LW}	γ^+	γ^-	γ
Agua	21.8	25.5	25.5	72.8
Formamida	39.0	2.28	39.6	58.0
α -Bromonaftaleno	43.6	0.0	0.0	43.6

La medida de los ángulos de contacto se ha realizado a $25.0 \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$ a partir de imágenes (tomadas con una cámara digital Pixelink PLA-662 conectada a un ordenador) de gotas depositadas mediante una microjeringa Wilson, que permite controlar el volumen de la gota entre 2 y 4 μL . Para el cálculo de θ se programó una rutina en Matlab 7.0 que automáticamente obtiene el perfil de la gota en la zona de contacto y su pendiente con la superficie plana de la muestra. La Figura 24 es un ejemplo. 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 tenían un radio de 1.3 cm.



Figura 24. Ejemplo de determinación de ángulo de contacto.
Parte superior: fotografía de gota depositada; parte inferior: ajuste del perfil de la gota y evaluación del ángulo.

4.4. Resultados y discusión. Análisis de la naturaleza hidrófila/hidrófoba.

Mediante este estudio pretendemos no sólo completar la caracterización superficial de las partículas, sino obtener una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento. La caracterización de las propiedades termodinámicas superficiales de los materiales utilizados en nuestro trabajo comienza con la determinación de los valores de los ángulos de contacto formados por tres líquidos seleccionados en la superficie de estos.

En la Tabla 4 se recogen los valores de ángulo de contacto promedio de 12 determinaciones realizadas midiendo sobre una nueva gota después de cada dos medidas. Como puede observarse, estos resultados ponen de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los tres tipos de partículas.

Tabla 4. Ángulos de contacto (grados) de los líquidos utilizados en las determinaciones en comprimido con hierro carbonilo, látex de etilcelulosa y partículas compuestas.

	Agua	Formamida	α -Bromonaftaleno
Hierro Carbonilo	27.9 \pm 1.1	21.5 \pm 0.7	16.7 \pm 0.5
Látex de Etilcelulosa	65.3 \pm 0.7	62.9 \pm 0.8	30.1 \pm 3.1
Compuestas	64.1 \pm 1.3	60.3 \pm 1.5	29.4 \pm 1.2

Sin embargo, es la evaluación de las componentes γ_s , recogidas en la Tabla 5, la que aporta una información física veraz sobre la termodinámica de los tres tipos de superficies. Esta Tabla confirma en gran medida nuestras estimaciones basadas en las propiedades electrocinéticas; en particular, para cualquier componente considerada, sus valores para las partículas compuestas son similares a los del polímero. Además, a pesar de que la componente Lifshitz-van der Waals es la menos afectada por el tratamiento superficial, como suele ser habitual (Plaza y cols., 1998), su valor para las partículas compuestas es casi el mismo que en el caso del polímero. Respecto a la componente electrón-aceptor (γ_s^+), a pesar de ser pequeña en los tres casos, adquiere valores menores para el látex de etilcelulosa y para las partículas compuestas. La contribución electrón-donante (γ_s^-) presenta un valor elevado en el hierro carbonilo, mucho mayor que el encontrado para el polímero y para las partículas recubiertas. Los tres tipos de partículas son ejemplos de materiales monopoles electrón-donantes, en el sentido dado al término por van Oss: pueden tener interacciones ácido-base con fases de cualquier polaridad (γ^+ , γ^- , o ambas, diferentes de cero) pero las fuerzas AB no contribuyen a su energía libre de cohesión. Debemos decir que es bastante general el comportamiento monopolar en los materiales inorgánicos (Durán y cols., 1994, 1995; Chibowski, 1992; Chibowski y Holysz, 1992), si bien Janczuk y cols. (1989, 1993) han encontrado un carácter bipolar en la calconita y la galena.

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

	γ_s^{LW}	γ_s^+	γ_s^-
Hierro Carbonilo	41.8 ± 0.1	0.75 ± 0.01	45.4 ± 0.8
Látex de Etilcelulosa	37.9 ± 1.1	0.41 ± 0.05	26.7 ± 0.4
Compuestas	38.2 ± 0.4	0.22 ± 0.05	26.1 ± 0.6

Al igual que ocurre con la caracterización electrocinética de las partículas, el análisis termodinámico de estas sugiere que el recubrimiento es completo, ya que las componentes de γ_s de las partículas recubiertas coinciden casi totalmente con las correspondientes al polímero puro.

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

igualmente las contribuciones no-DLVO a la energía total, que se relacionan con la componente AB de la tensión superficial tanto del sólido en suspensión como del líquido.

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

$$\Delta G_{121} = \Delta G_{121}^{LW} + \Delta G_{121}^{AB} \quad (42)$$

Haciendo uso de la Ecuación 36, pueden obtenerse los valores de ΔG_{121}^{LW} y ΔG_{121}^{AB} que se muestran en la Tabla 6. En la misma, se puede apreciar que para el hierro carbonilo, el intercambio energético debido a la componente LW es bastante menor que el asociado a la componente AB , siendo, además, de signos contrarios. Por tanto, la variación de la energía libre de interacción total es debida, principalmente, a la componente AB (Plaza y cols., 1998).

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} (Arias y cols., 2007).

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

	ΔG_{121}^{LW} (mJ/m ²)	ΔG_{121}^{AB} (mJ/m ²)	ΔG_{121} (mJ/m ²)
Hierro Carbonilo	-6.4 ± 0.1	28.2 ± 1.3	21.8 ± 1.1
Látex de Etilcelulosa	-4.4 ± 0.3	2.1 ± 1.1	-2.4 ± 1.2
Compuestas	-4.6 ± 0.1	1.2 ± 1.3	-3.5 ± 1.3

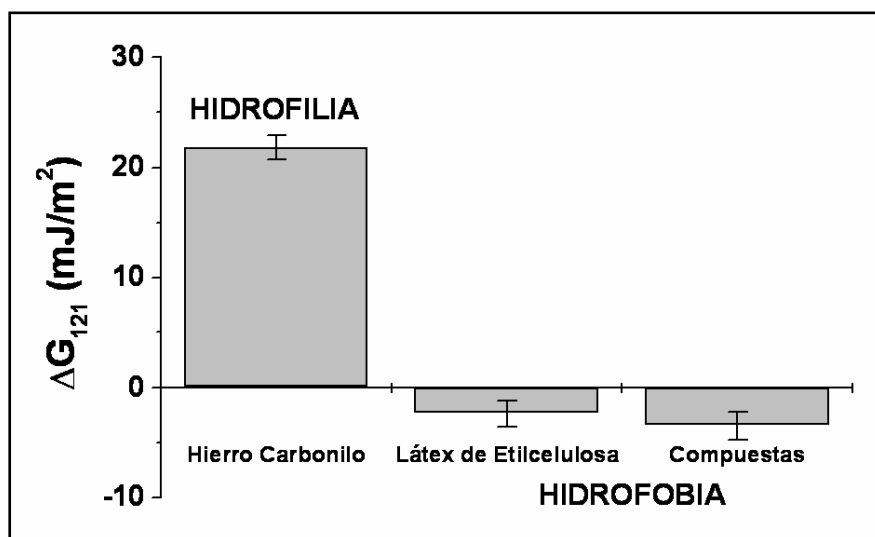


Figura 25. Valores de ΔG_{SLS} y carácter hidrófobo/hidrófilo de los núcleos magnéticos, del polímero y de las partículas compuestas

Obviamente, estos cambios en la energía libre superficial se manifiestan en las características hidrófobas/hidrófilas de los materiales estudiados. De acuerdo con van Oss (1994), puede utilizarse el siguiente criterio para determinar cuándo un material puede considerarse hidrófilo o hidrófobo. Si ΔG_{121} resulta ser negativo, las interacciones interfaciales favorecen la atracción entre sí de las partículas, y son consideradas hidrófobas. Por el contrario, el carácter hidrofílico y la consiguiente repulsión estarán asociados a valores positivos de ΔG_{121}^{TOT} .

La Figura 25 muestra los resultados obtenidos para los tres tipos de partículas. Como puede apreciarse, la naturaleza hidrófila del hierro carbonilo se pierde, al ser recubierta por el látex hidrófobo, una clara indicación, de nuevo, de que dicho recubrimiento es eficaz.

CAPÍTULO 5

TRANSPORTE Y LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

5.1. Introducción

La utilización de un sistema de liberación modificada constituido por un núcleo magnético (hierro carbonilo) y un recubrimiento polimérico biocompatible (etilcelulosa) puede permitir el transporte magnéticamente controlado de fármacos de diversa naturaleza (como el anticancerígeno 5-fluorouracilo o el antiinflamatorio diclofenaco sódico) hasta el órgano diana de interés. De esta manera, a los principales beneficios derivados del uso de este

sistema transportador magnético ya comentados (Pouliquen y Chouli, 1999; Senyei y cols., 1978), se sumarían los derivados de la mejora de los problemas de estabilidad, por ejemplo, la cardiotoxicidad de los productos de degradación del 5-fluorouracilo generados en el medio básico de los viales inyectables (Lemaire y cols., 1994), y, también, los derivados del incremento de la concentración de principio activo en el lugar diana (mejora del perfil farmacocinético: rápida metabolización, semivida plasmática muy corta; Departamento Técnico del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2008). También se solucionaría la posible aparición de resistencias, en el caso del antineoplásico, al localizarse el 5-fluorouracilo en elevada concentración en las inmediaciones de la célula cancerosa, llegando así a saturar los principales mecanismos celulares de resistencia.

En el presente apartado realizaremos, en primer lugar, un estudio de la absorbancia óptica de las disoluciones del anticancerígeno 5-fluorouracilo y del antiinflamatorio no esteroideo (AINE) diclofenaco sódico 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 principio activo. Además, desarrollaremos la validación del método analítico espectrofotométrico y justificaremos la metodología espectrofotométrica de medida empleada en la determinación de la incorporación de fármaco por las partículas, la cual está basada en la aplicación 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.

La determinación de la capacidad de vehiculización de los principios activos se realizó en los tres tipos de materiales estudiados: *i*) los núcleos magnéticos, de esta forma se investigó la capacidad de este material como sistema transportador, y también la posible contribución del hierro carbonilo a la incorporación de fármaco por las partículas recubiertas y su efecto sobre el proceso de liberación *in vitro* desde estas; *ii*) las partículas poliméricas, su contribución en la incorporación de los fármacos es clave como material de recubrimiento en las partículas compuestas; además analizaremos su capacidad como sistema transportador *per se*; y *iii*) las partículas compuestas, objetivo central de nuestro trabajo.

Dos son los mecanismos identificados de incorporación de fármaco por las partículas: la absorción o encapsulamiento en el interior de la partícula al añadirse el fármaco durante su proceso de formación (este proceso no se produce en los núcleos magnéticos ya que partimos de un material presintetizado), y la adsorción superficial tras la incubación de las nanopartículas en una solución de fármaco. Ambas técnicas se investigarán mediante determinaciones de la movilidad electroforética de las partículas y mediante medidas espectrofotométricas. Es previsible que la mayor captación de fármaco se consiga mediante el método de absorción (Arias y cols., 2008a, b, c; Soppimath y cols., 2001). Además, nuestra experiencia previa nos hace pensar que el principal factor determinante de la vehiculización de diclofenaco sódico y de 5-fluorouracilo por las

partículas será la concentración de fármaco (Arias y cols., 2008 a, b, c). Las condiciones óptimas de vehiculización de principio activo fueron las seleccionadas para realizar los estudios de liberación *in vitro* desde las partículas poliméricas y recubiertas.

5.2. Procedimiento de determinación experimental de la vehiculización de fármaco.

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:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc \quad (43)$$

donde A es la absorbancia, T es la transmitancia, I y I_0 son las intensidades transmitida e incidente, respectivamente, ϵ es el coeficiente de absorción 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 (Skoog y cols., 2001).

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 (Skoog y cols., 2001). Siempre que se cumpla la ley de Beer y que las distintas especies se comporten de forma independiente unas respecto de otras, la absorbancia total para un sistema multicomponente viene dada por:

$$A_{total} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 b c_1 + \varepsilon_2 b c_2 + \dots + \varepsilon_n b c_n \quad (44)$$

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 (Skoog y cols., 2001). 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, se observan algunas excepciones entre ciertos iones o moléculas orgánicas grandes.

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 lo tanto, válida para identificar grupos funcionales en una molécula. Sin embargo, son más importantes las aplicaciones en la determinación cuantitativa de compuestos que contienen grupos absorbentes.

El espectrofotómetro utilizado en nuestro trabajo (PerkinElmer UV/Vis Lambda 40, USA) está equipado con una lámpara de deuterio que produce un espectro continuo útil para la región comprendida entre 200 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 200 nm hasta los 1100 nm. La cubeta utilizada es de cuarzo, transparente en la región espectral de interés, y posee un camino óptico de 1 cm de longitud. Su mantenimiento es crítico para garantizar la calidad de las medidas, por lo que la limpieza completa antes y después de su uso es fundamental. Por este motivo, el proceso de limpieza se realizó siempre con agua destilada y acetona.

Los experimentos que se describirán se han realizado con los principios activos 5-fluorouracilo (Sigma-Aldrich, Alemania) y diclofenaco sódico (Guinama, España), que en su forma comercial se presentan en forma de polvo cristalino blanco, inodoro y estables al aire.

❖ **Metodología.**

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 espectrofotométrica 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 un buen seguimiento de la ley de Beer y las medidas son menos sensibles a las incertidumbres que surgen de las limitaciones del instrumento (Skoog y cols., 2001).

Si bien la metodología seguida en la síntesis de las nanopartículas compuestas determina las condiciones de trabajo, un aspecto crucial previo es la clarificación de las condiciones de preparación y de conservación de las disoluciones de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico. Este estudio se realizó prestando especial atención a las concentraciones de fármaco y al pH de las disoluciones utilizadas. El carácter fotosensible de las disoluciones de 5-fluorouracilo (Barberi-Heyob, 1995), determina que deban prepararse con gran diligencia bajo una adecuada protección de la luz ambiental. 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 (Lemaire y cols., 1994).

En nuestro estudio el primer paso es preparar una curva de calibrado de cada principio activo a partir de una batería de disoluciones acuosas de éstos (pH natural = 5), cuyas concentraciones molares son: 10^{-5} , 3×10^{-5} , 5×10^{-5} , 7×10^{-5} , 8.5×10^{-5} , 10^{-4} , 2×10^{-4} , 3×10^{-4} , 5×10^{-4} , 7×10^{-4} , 10^{-3} , 5×10^{-3} y 10^{-2} . De esta manera, determinaremos la longitud de onda de máxima absorbancia y se realizará el cálculo del coeficiente de absortividad molar, imprescindible en los estudios

de incorporación y de liberación *in vitro* de fármaco por las partículas. Tras 24 horas a 25.0 ± 0.5 °C y bajo agitación mecánica (50 rpm), se procedió a la determinación del espectro de absorción ultravioleta – visible de cada una de las disoluciones acuosas de fármaco, realizando un barrido de longitudes de onda desde 1100 a 200 nm, con intervalos de 1.0 nm. Se utilizó como blanco en la calibración previa del aparato agua ultrapura, para eliminar las posibles interferencias en el espectro de absorción del fármaco generadas por el medio de disolución.

❖ Validación del método espectrofotométrico.

El método espectrofotométrico utilizado para el análisis de la cantidad de fármaco vehiculizado o liberado por las partículas debe ser validado previamente, verificando su exactitud, precisión y linealidad, antes de su utilización en estos ensayos. Con el objetivo de comprobar que las soluciones de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico son estables en todo el margen de pHs utilizado y de demostrar la validez del coeficiente de absorptividad molar para todos estos valores de pH, se prepararon 6 réplicas de soluciones estándar de fármaco, de concentración entre 10^{-5} y 10^{-2} M, a pH = 5 (natural) y a pH = 7.4 ± 0.1 (utilizado en los ensayos de liberación de fármaco). Las concentraciones de principio activo por encima de 3×10^{-4} M en el caso del 5-fluorouracilo, y por encima de 2×10^{-4} M, en el caso del diclofenaco sódico, fueron adecuadamente diluidas, al igual que se hace en los experimentos de absorción, adsorción y liberación de principio activo, con el objetivo de poder trabajar en el rango de linealidad absorbancia – concentración de fármaco.

❖ **Determinación de la incorporación y la liberación de fármaco.**

La determinación cuantitativa de la incorporación del antineoplásico 5-fluorouracilo y del AINE diclofenaco sódico por nuestro sistema transportador 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 (McCarron y cols., 2000; Zhuo y cols., 1999). 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 (Fawaz y cols., 1997; Müller y cols., 1991; Sullivan y Birkinshaw, 2004). Esta metodología ha sido ampliamente estudiada y puesta a punto por nuestro grupo de investigación (Arias y cols., 2008 a, b, c) y está basada en la aplicación de la ley de Beer a un medio que contenga más de una clase de sustancias absorbentes. Como ya se ha descrito en la Ecuación 44, 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 éstas. De esta manera, se acepta la contribución de cada una de las sustancias presentes en el medio donde se ha producido la síntesis a la absorbancia total del sistema o de las sustancias que se han generado en el proceso de liberación de los principios activos.

Respecto al proceso de vehiculización del 5-fluorouracilo y del diclofenaco sódico, podemos citar como sustancias susceptibles de contribuir a esta absorción total los propios principios activos no incorporados por las nanopartículas, los residuos de la síntesis de estos materiales y los restos de otros componentes del medio (p. ej., NaDS y PEG 4000, agentes estabilizadores de las partículas de polímero y recubiertas). Por lo tanto, podría estimarse la cantidad de fármaco que no ha sido incorporado por estos sistemas restando a la absorción total del sistema la correspondiente al resto de sustancias presentes (residuos de la síntesis de las partículas y restos de otros componentes del medio); y, por diferencia entre la concentración inicial y final en el medio del antineoplásico o del AINE, conoceremos la cantidad total incorporada por nuestros materiales (Arias y cols., 2008 a, b, c).

En cuanto al proceso de liberación de fármaco desde las nanopartículas de polímero y compuestas, 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 (tampón NaOH-KH₂PO₄ de pH = 7.4). Es por ello lógico plantear también la determinación de la cantidad de 5-fluorouracilo o de diclofenaco sódico liberado por las partículas poliméricas restando a la absorbancia total del sistema la correspondiente al resto de especies absorbentes (Arias y cols., 2008 a, b, c).

5.2.1. Incorporación superficial de fármaco.

❖ Determinación espectrofotométrica de la adsorción.

Para estimar la adsorción del antineoplásico y del AINE objeto de estudio, realizamos la determinación de la absorbancia óptica de los sobrenadantes obtenidos tras poner en contacto los tres tipos de partículas con los que trabajamos (hierro carbonilo, etilcelulosa y compuestas) con soluciones de concentraciones prefijadas de estos principios activos, durante 24 horas, a 25.0 ± 0.5 °C y bajo agitación mecánica (50 rpm). Para ello, preparamos una serie de disoluciones de 5 mL de volumen con diferente concentración molar de fármaco (10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} , 5×10^{-3} y 10^{-2}), respetando su pH natural (pH = 5). Una vez retirada una muestra del medio para la posterior comparación, se procedió a añadir las nanopartículas correspondientes 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 9000 rpm durante 20 minutos, para la determinación del espectro de absorción de éstos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

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

❖ Análisis electrocinético de la adsorción.

La electroforesis es una herramienta adecuada para la determinación cualitativa de la vehiculización de fármaco debido a la elevada sensibilidad de esta técnica, incluso a cambios superficiales mínimos atribuibles a la adsorción de cantidades muy pequeñas de especies cargadas. En este estudio, realizamos una estimación cualitativa del proceso de adsorción mediante la determinación de la movilidad electroforética de los tres tipos de partículas en suspensiones diluidas [$\approx 0.1\%$ (p/v)] con diferentes concentraciones de principio activo. Para ello, utilizamos el aparato de electroforesis Malvern Zetasizer 2000 (Inglaterra). Una vez fijadas las diferentes concentraciones molares de 5-fluorouracilo o de diclofenaco sódico (10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} , 5×10^{-3} y 10^{-2}), y con objeto 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 (NaCl 10^{-3} M) y el otro sin fijar fuerza iónica. Las medidas se realizaron tras 24 horas de almacenamiento de las suspensiones a 25.0 ± 0.5 °C, protegidas de la luz ambiental y bajo agitación constante (50 rpm), comprobando previamente el pH. Los datos presentados son el promedio de quince determinaciones, cambiando la muestra cada tres.

5.2.2. Absorción de fármaco.

Una vez estudiada la adsorción de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico en la superficie de los tres tipos de materiales, 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 (esto excluye a los núcleos magnéticos, pues son partículas presintetizadas). Para ello, analizaremos la influencia del que consideramos será el principal factor determinante de la eficacia de la absorción: la concentración de principio activo utilizada (Arias y cols., 2008 a, b, c). De esta manera, pretendemos determinar las condiciones óptimas que permiten una incorporación máxima de fármaco y desarrollaremos una síntesis optimizada de las nanopartículas compuestas con principio activo incorporado.

La influencia de la concentración de principio activo presente en el medio donde se produce la síntesis del sistema transportador 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 (Arias y cols., 2008 a, b, c; Fawaz y cols., 1997; Fontana y cols., 1998; Losa y cols., 1991; McCarron y cols., 2000). En nuestro caso, el análisis de la influencia de la concentración de 5-fluorouracilo o de diclofenaco sódico sobre su incorporación por las partículas de etilcelulosa o las partículas compuestas 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 el protocolo de síntesis fue la fijación de

una determinada concentración de uno de estos principios activos en el medio de síntesis. Las concentraciones molares utilizadas fueron: 10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} , 5×10^{-3} y 10^{-2} . Como queda justificado en el apartado 5.5., la fase acuosa ácida diluida de la síntesis debe prepararse con 24 horas de antelación para así permitir que los núcleos de hierro carbonilo estén en contacto con el fármaco disuelto (bajo agitación mecánica a 50 rpm) y que, por lo tanto, éste se adsorba en su superficie. Así se logrará incrementar la vehiculización de principio activo en las partículas compuestas ya que los núcleos magnéticos contribuirán a la absorción. Los experimentos se repitieron tres veces con cada una de las concentraciones molares de fármaco.

5.3. Liberación *in vitro* de fármaco.

En los apartados anteriores se han descrito las condiciones óptimas de vehiculización del fármaco antineoplásico y del AINE en las partículas de etilcelulosa y en las partículas compuestas, mediante dos métodos: *i*) la adición del principio activo en el momento en el que se forman las nanopartículas; y *ii*) la adsorción tras la formación e incubación de las nanopartículas en una disolución de fármaco. El paso siguiente fue utilizar las condiciones que permiten una mayor carga de fármaco para preparar las nanopartículas de etilcelulosa o las compuestas que se utilizarán en los ensayos de liberación *in vitro*. Tales condiciones fueron: absorción en matriz de una concentración 10^{-2} M de 5-fluorouracilo o de diclofenaco sódico (véanse los apartados 5.5 y 5.6).

Las suspensiones de las partículas con fármaco vehiculizado se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 minutos, con el objetivo de eliminar el principio activo no incorporado. Los sedimentos obtenidos fueron resuspendidos en un medio de liberación constituido por 10 mL de tampón NaOH – KH₂PO₄ (pH = 7.4: 125 mL de KH₂PO₄ 10⁻¹ M y 97.75 mL de NaOH 10⁻¹ M, hasta 250 mL con agua ultrapura). 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 (0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 6, 9 y 24 horas, y 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 días), fueron centrifugadas a 9000 rpm durante 20 minutos para realizar el análisis de su absorbancia óptica a 266 nm, en el caso de la liberación de 5-fluorouracilo, o a 276 nm, en el caso de la liberación de diclofenaco sódico. 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. La misma metodología de medida utilizada en la estimación de la vehiculización de fármaco (Arias y cols., 2008 a, b, c) fue seguida en los ensayos de liberación. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

5.4 Absorbancia óptica de las disoluciones de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico.

Antes de abordar la preparación de una curva de calibrado que relacione la absorbancia con la concentración de la especie a estudiar, estableceremos las condiciones de trabajo con las disoluciones acuosas de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico a lo largo de nuestro estudio. La metodología de trabajo general con ambos fármacos es la misma, con el fin de poder establecer comparaciones, y está condicionada por el carácter fotosensible del anticancerígeno y por la formación de cristales en las disoluciones acuosas de este con una concentración por encima de 10^{-2} M o conservadas en el frigorífico (Arias y cols., 2005; Barberi-Heyob, 1995). Por lo tanto, la preparación, manipulación y conservación de las disoluciones de ambos fármacos se realizará a temperatura ambiente, protegiéndolas de la luz ambiental y no se utilizarán concentraciones elevadas ($>10^{-2}$ M).

La Figura 26 recoge los resultados del análisis espectrofotométrico de una batería de disoluciones acuosas de 5-fluorouracilo, realizado como paso previo a la preparación de una curva de calibrado del fármaco. Los resultados de este estudio muestran como 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 máximos 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 que se genera a menor longitud de onda; lo mismo hacemos con los espectros obtenidos a concentraciones superiores a 3×10^{-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 3×10^{-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. En estas condiciones, 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 (Arias y cols., 2005, Olsen, 1975).

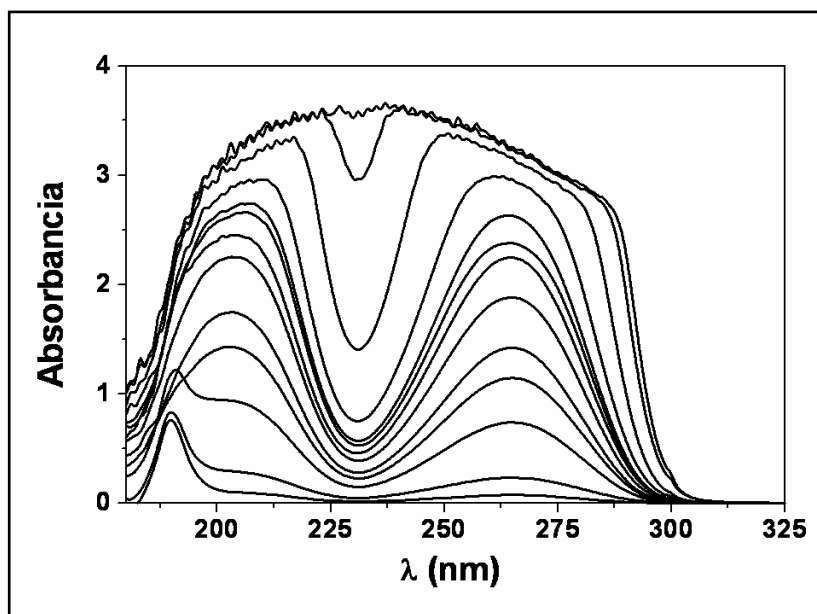


Figura 26. Espectro de absorción UV-Vis de las disoluciones acuosas de 5-fluorouracilo. Las concentraciones molares de anticancerígeno en orden creciente de absorbancia son: 10^{-5} , 3×10^{-5} , 5×10^{-5} , 7×10^{-5} , 8.5×10^{-5} , 10^{-4} , 2×10^{-4} , 3×10^{-4} , 5×10^{-4} , 7×10^{-4} , 10^{-3} , 5×10^{-3} y 10^{-2} .

La determinación del coeficiente de absorción molar (ϵ) se realizó ajustando los datos de absorbancia y de concentración mediante el método de los mínimos cuadrados. El resultado obtenido fue $\epsilon = 7720 \pm 180 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. En la Figura 27 se muestran los datos y la recta de ajuste. Es destacable cómo hasta concentraciones de 0.1 mM los valores de absorbancia a diferentes concentraciones, obtenidos para la longitud de onda de máxima absorbancia, cumplen la ley de Beer. 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 3×10^{-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* de este principio activo.

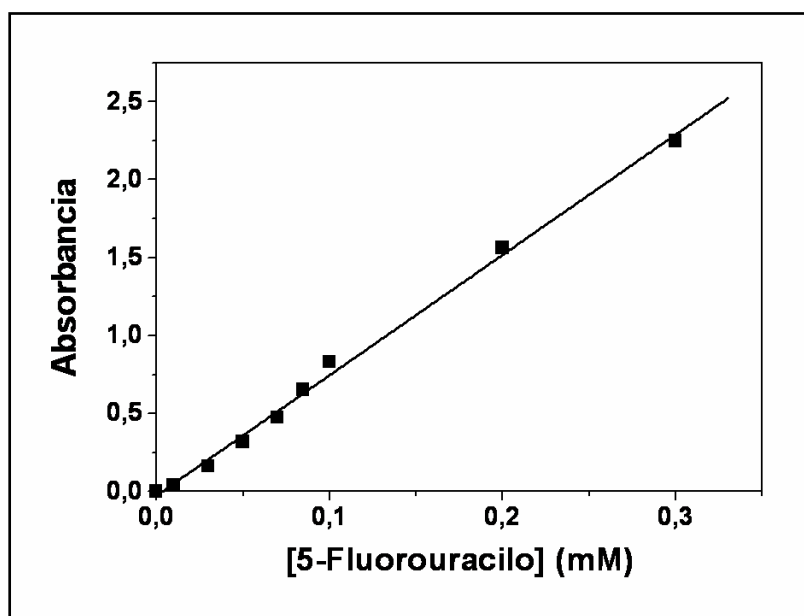


Figura 27. Absorbancia a 266 nm frente a la concentración molar en disoluciones de 5-Fluorouracilo.

En cuanto a los resultados obtenidos para el diclofenaco sódico, en la Figura 28 se pueden observar los espectros de absorción de las diferentes soluciones de este AINE, para longitudes de onda inferiores a ≈ 350 nm. A pesar de que en el espectro son patentes 2 máximos, sólo el que aparece a 276 nm permanece estable a esta longitud de onda en un amplio margen de concentraciones (hasta $\approx 2 \times 10^{-4}$ 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 (Arias y cols., 2005, Olsen, 1975).

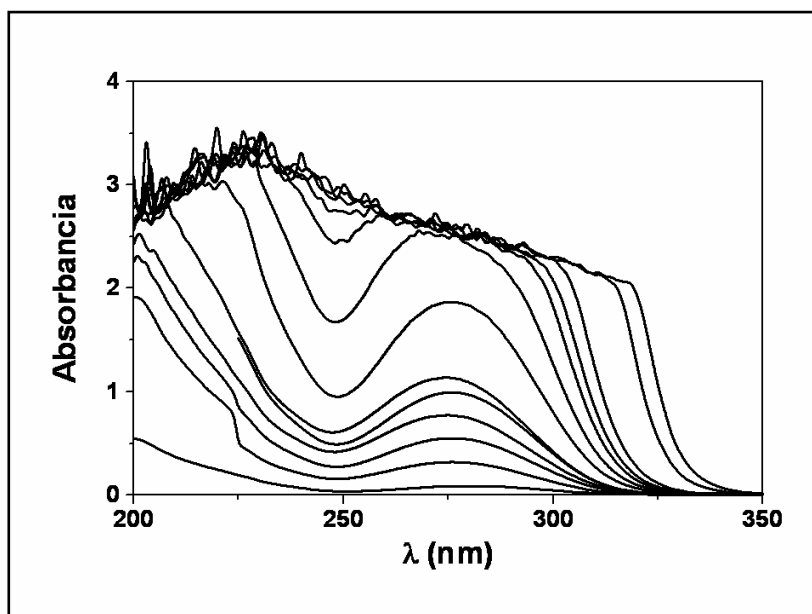


Figura 28. Espectro de absorción UV-Vis de las disoluciones acuosas de diclofenaco sódico. Las concentraciones molares de antiinflamatorio no esteroideo en orden creciente de absorbancia son: 10^{-5} , 3×10^{-5} , 5×10^{-5} , 7×10^{-5} , 8.5×10^{-5} , 10^{-4} , 2×10^{-4} , 3×10^{-4} , 5×10^{-4} , 7×10^{-4} , 10^{-3} , 5×10^{-3} y 10^{-2} .

La determinación del coeficiente de absortividad molar (ϵ) se realizó ajustando los datos de absorbancia y de concentración correspondientes a concentraciones inferiores a 3×10^{-4} M, mediante el método de los mínimos cuadrados. El resultado obtenido fue $\epsilon = 9600 \pm 500 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. En la Figura 29 se muestran los datos y la recta de ajuste. Como es el caso del 5-Fu será necesario diluir para determinar concentración a partir de absorbancia por encima de 0.2 M.

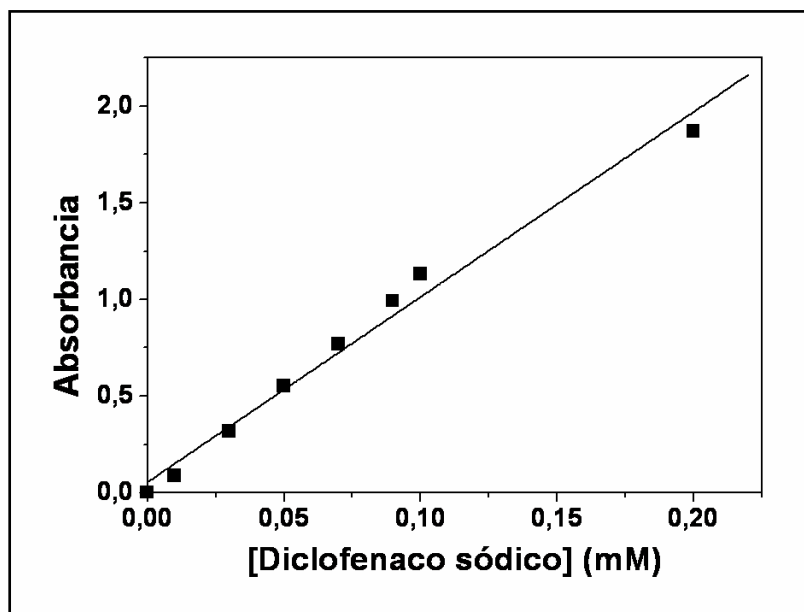


Figura 29. Absorbancia a 276 nm frente a la concentración molar en disoluciones de diclofenaco sódico.

Con el objetivo de estudiar el espectro las disoluciones acuosas de ambos fármacos en el pH utilizado en los estudios de liberación *in vitro* (pH = 7.4), investigamos la influencia del tampón NaOH – KH₂PO₄ de pH = 7.4 ± 0.1 en las propiedades de absorbancia óptica de las disoluciones de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico. Preparamos para ello, una batería de soluciones acuosas de ambos principios activos con una concentración 10⁻⁴ M y con un pH = 7.4, fijado con el tampón NaOH – KH₂PO₄ 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 diclofenaco sódico y de 5-fluorouracilo a este pH, y la independencia del coeficiente de

absortividad molar con respecto al pH, al menos en el intervalo de interés.

5.4.1. Validación del método espectrofotométrico.

En la Tabla 7 se recogen los valores de absorbancia de las soluciones acuosas 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 bajos valores de los coeficientes de variación (< 5 %, en todos los casos) indican la adecuada precisión del método. La linealidad de la relación absorbancia (A) – concentración molar (C) es adecuada [$A = (0.03 \pm 0.02) + (7720 \pm 180) \times C$], con un coeficiente de correlación $r = 0.999$. El ajuste lineal es estadísticamente significativo, con una probabilidad superior al 99.9 %.

Con el propósito de comprobar la exactitud del método analítico, utilizamos los datos de absorbancia de las concentraciones de la Tabla 7 (“concentración actual” en la Tabla 8), para obtener las concentraciones estimadas para cada una de las 6 réplicas. Las concentraciones medias y sus D.E. quedan recogidas en la Tabla 8 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.

Tabla 7. Absorbancia (media \pm D.E.) de las soluciones acuosas de 5-fluorouracilo para cada una de las concentraciones indicadas.

Las concentraciones por encima de 3×10^{-4} M fueron 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}	0.0764 ± 0.0015	1.96
3×10^{-5}	0.233 ± 0.005	2.15
5×10^{-5}	0.391 ± 0.011	2.81
7×10^{-5}	0.543 ± 0.017	3.13
8.5×10^{-5}	0.661 ± 0.012	1.82
10^{-4}	0.773 ± 0.018	2.33
2×10^{-4}	1.553 ± 0.039	2.51
3×10^{-4}	2.259 ± 0.025	1.11
5×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.783 ± 0.016	2.04
7×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.797 ± 0.014	1.76
10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.769 ± 0.012	1.56
5×10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.771 ± 0.015	1.94
10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.811 ± 0.029	3.58

Tabla 8. Comparación de las concentraciones “actuales” de 5-fluorouracilo en solución acuosa con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas. Las concentraciones por encima de 3×10^{-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 [(estimado – actual) / estimado], también se muestran los C.V.

Actual (M)	Estimada (M)	Error relativo (%)	C.V. (%)
10^{-5}	$(9.89 \pm 0.22) \times 10^{-6}$	1.11	2.22
3×10^{-5}	$(3.02 \pm 0.01) \times 10^{-5}$	0.66	0.33
5×10^{-5}	$(5.06 \pm 0.14) \times 10^{-5}$	1.18	2.77
7×10^{-5}	$(7.03 \pm 0.09) \times 10^{-5}$	0.43	1.28
8.5×10^{-5}	$(8.56 \pm 0.13) \times 10^{-5}$	0.71	1.52
10^{-4}	$(1.01 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	0.99	1.98
2×10^{-4}	$(2.02 \pm 0.08) \times 10^{-4}$	0.99	3.96
3×10^{-4}	$(2.93 \pm 0.11) \times 10^{-4}$	2.39	3.75
5×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.01 \pm 0.03) \times 10^{-4}$	0.99	2.97
7×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.03 \pm 0.04) \times 10^{-4}$	2.91	3.88
10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(9.96 \pm 0.19) \times 10^{-5}$	0.41	1.91
5×10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(9.99 \pm 0.23) \times 10^{-5}$	0.11	2.31
10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.05 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	4.76	1.91

Con respecto al diclofenaco sódico, en la Tabla 9 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 bajos

valores 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 [$A = (0.05 \pm 0.04) + (9580 \pm 480) \times C$], con un coeficiente de correlación $r = 0.999$. El ajuste lineal es de nuevo estadísticamente significativo, con un nivel de confianza superior al 99.9% .

Tabla 9. Absorbancia (media \pm D.E.) de las disoluciones acuosas de diclofenaco sódico para cada una de las concentraciones indicadas. Las concentraciones por encima de 2×10^{-4} M fueron 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}	0.0952 ± 0.0019	1.99
3×10^{-5}	0.291 ± 0.007	2.41
5×10^{-5}	0.484 ± 0.012	2.48
7×10^{-5}	0.678 ± 0.021	3.09
8.5×10^{-5}	0.821 ± 0.016	1.95
10^{-4}	0.954 ± 0.022	2.31
2×10^{-4}	1.947 ± 0.028	1.44
3×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.996 ± 0.029	2.91
5×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	1.001 ± 0.019	1.89
7×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.991 ± 0.018	1.82
10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.995 ± 0.014	1.41
5×10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.978 ± 0.012	1.23
10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.956 ± 0.031	3.24

Para comprobar la exactitud del método analítico, utilizamos los datos de absorbancia de las concentraciones de la Tabla 9 (“concentración actual” en la Tabla 10), para obtener las concentraciones estimadas para cada una de las 6 réplicas. En la Tabla 10 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.

Tabla 10. Comparación de las concentraciones “actuales” de diclofenaco sódico con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las medidas espectrofotométricas. Las concentraciones por encima de 2×10^{-4} M fueron 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 [(estimado – actual)/estimado], también se muestran los C.V.

Actual (M)	Estimada (M)	Error relativo (%)	C.V. (%)
10^{-5}	$(9.94 \pm 0.17) \times 10^{-6}$	0.61	1.71
3×10^{-5}	$(3.04 \pm 0.05) \times 10^{-5}$	1.32	1.64
5×10^{-5}	$(5.05 \pm 0.11) \times 10^{-5}$	0.99	2.18
7×10^{-5}	$(7.08 \pm 0.12) \times 10^{-5}$	1.13	1.69
8.5×10^{-5}	$(8.57 \pm 0.09) \times 10^{-5}$	0.82	1.05
10^{-4}	$(9.96 \pm 0.13) \times 10^{-5}$	0.41	1.31
2×10^{-4}	$(2.03 \pm 0.06) \times 10^{-4}$	1.48	2.96
3×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.04 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	3.85	1.92
5×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.05 \pm 0.04) \times 10^{-4}$	4.76	3.81
7×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.03 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	2.91	1.94
10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.04 \pm 0.05) \times 10^{-4}$	3.85	4.81
5×10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.02 \pm 0.03) \times 10^{-4}$	1.96	2.94
10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(9.98 \pm 0.12) \times 10^{-5}$	0.21	1.21

En cuanto a las 6 réplicas preparadas a $\text{pH} = 7.4$ ($\text{NaOH} - \text{KH}_2\text{PO}_4$) que contenían una cantidad conocida de 5-fluorouracilo o diclofenaco sódico, se obtuvieron resultados similares, como mostramos a continuación, con lo que queda demostrada la exactitud, precisión y linealidad del método espectrofotométrico a este pH para ambos principios activos.

La Tabla 11 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 [$A = (0.02 \pm 0.01) + (7680 \pm 150) \times C$], con un coeficiente de correlación $r = 0.999$. El ajuste lineal es estadísticamente significativo, con una probabilidad superior al 99.9% .

Tabla 11 Absorbancia (media \pm D.E.) de las soluciones acuosas de 5-fluorouracilo para cada una de las concentraciones indicadas, en un tampón NaOH – KH₂PO₄ de pH = 7.4. Las concentraciones por encima de 3×10^{-4} M fueron diluidas hasta 10^{-4} M antes de realizar la medida. El C.V. se calculó mediante el cociente entre la D.E. y el valor medio.

Concentración (M)	Absorbancia	C.V. (%)
10^{-5}	0.0783 ± 0.0011	1.41
3×10^{-5}	0.227 ± 0.007	3.08
5×10^{-5}	0.381 ± 0.016	4.19
7×10^{-5}	0.539 ± 0.012	2.23
8.5×10^{-5}	0.649 ± 0.013	2.01
10^{-4}	0.764 ± 0.016	2.09
2×10^{-4}	1.566 ± 0.027	1.72
3×10^{-4}	2.274 ± 0.029	1.28
5×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.792 ± 0.021	2.65
7×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.798 ± 0.015	1.88
10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.782 ± 0.013	1.66
5×10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.777 ± 0.016	2.06
10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.766 ± 0.019	2.48

La exactitud del método analítico fue comprobada utilizando los datos de absorbancia de las concentraciones de la Tabla 11 (“concentración actual” en la Tabla 12, para obtener las concentraciones estimadas para cada una de las 6 réplicas. Las concentraciones medias y sus D.E. quedan recogidas en la Tabla 12 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.

Tabla 12. Comparación de las concentraciones “actuales” de 5-fluorouracilo en solución acuosa con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las determinaciones espectrofotométricas. Las concentraciones por encima de 3×10^{-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 [(estimado- actual)/estimado], también se muestran los C.V.

Actual (M)	Estimada (M)	Error relativo (%)	C.V. (%)
10^{-5}	$(1.02 \pm 0.02) \times 10^{-5}$	1.96	1.96
3×10^{-5}	$(2.96 \pm 0.04) \times 10^{-5}$	1.35	1.35
5×10^{-5}	$(4.96 \pm 0.09) \times 10^{-5}$	0.81	1.81
7×10^{-5}	$(7.02 \pm 0.12) \times 10^{-5}$	0.28	1.71
8.5×10^{-5}	$(8.45 \pm 0.15) \times 10^{-5}$	0.59	1.78
10^{-4}	$(9.95 \pm 0.14) \times 10^{-5}$	0.51	1.41
2×10^{-4}	$(2.04 \pm 0.08) \times 10^{-4}$	1.96	3.92
3×10^{-4}	$(2.96 \pm 0.13) \times 10^{-4}$	1.35	4.39
5×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.03 \pm 0.04) \times 10^{-4}$	2.91	3.88
7×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.04 \pm 0.03) \times 10^{-4}$	3.85	2.88
10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.02 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	1.96	1.96
5×10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(1.01 \pm 0.03) \times 10^{-4}$	0.99	2.97
10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$)	$(9.97 \pm 0.11) \times 10^{-5}$	0.31	1.11

En cuanto al diclofenaco sódico, la Tabla 13 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 [$A = (0.03 \pm 0.02) + (9430 \pm 330) \times C$], con un coeficiente de correlación $r = 0.999$. El ajuste lineal es estadísticamente significativo, con una probabilidad superior al 99.9 %.

Tabla 13. Absorbancia (media \pm D.E.) de las disoluciones de diclofenaco sódico para cada una de las concentraciones indicadas, en un tampón NaOH – KH_2PO_4 de $\text{pH} = 7.4$. Las concentraciones por encima de 2×10^{-4} M fueron diluidas hasta 10^{-4} M antes de medir. El C.V. se calculó mediante el cociente entre la D.E. y el valor medio.

Concentración (M)	Absorbancia	C.V. (%)
10^{-5}	0.0967 ± 0.0022	2.28
3×10^{-5}	0.287 ± 0.008	2.79
5×10^{-5}	0.466 ± 0.013	2.79
7×10^{-5}	0.654 ± 0.024	3.67
8.5×10^{-5}	0.798 ± 0.017	2.13
10^{-4}	0.959 ± 0.028	2.92
2×10^{-4}	1.943 ± 0.016	0.82
3×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.941 ± 0.021	2.23
5×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.992 ± 0.014	1.41
7×10^{-4} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.982 ± 0.019	1.94
10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.937 ± 0.015	1.61
5×10^{-3} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.976 ± 0.018	1.84
10^{-2} ($\rightarrow 10^{-4}$)	0.961 ± 0.011	1.14

La exactitud del método analítico fue estudiada utilizando los datos de absorbancia de las concentraciones de la Tabla 13 (“concentración actual” en la Tabla 14), para obtener las concentraciones estimadas para cada una de las 6 réplicas. En la Tabla 14 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.

Tabla 13. Comparación de las concentraciones “actuales” de diclofenaco sódico con las concentraciones “estimadas” deducidas a partir de las medidas espectrofotométricas. Las concentraciones por encima de 2×10^{-4} M fueron 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 [(estimado – actual)/estimado], también se muestran los C.V.

Actual (M)	Estimada (M)	Error relativo (%)	C.V. (%)
10^{-5}	$(1.02 \pm 0.03) \times 10^{-5}$	1.96	2.94
3×10^{-5}	$(3.04 \pm 0.09) \times 10^{-5}$	1.32	2.96
5×10^{-5}	$(4.94 \pm 0.06) \times 10^{-5}$	1.22	1.22
7×10^{-5}	$(6.94 \pm 0.11) \times 10^{-5}$	0.86	1.58
8.5×10^{-5}	$(8.46 \pm 0.14) \times 10^{-5}$	0.47	1.65
10^{-4}	$(1.02 \pm 0.03) \times 10^{-4}$	1.96	2.94
2×10^{-4}	$(2.06 \pm 0.07) \times 10^{-4}$	2.91	3.39
$3 \times 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(9.98 \pm 0.29) \times 10^{-5}$	0.21	2.91
$5 \times 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.05 \pm 0.04) \times 10^{-4}$	4.76	3.81
$7 \times 10^{-4} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.04 \pm 0.03) \times 10^{-4}$	3.85	2.88
$10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	$(9.94 \pm 0.15) \times 10^{-5}$	0.61	1.51
$5 \times 10^{-3} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.04 \pm 0.05) \times 10^{-4}$	3.85	4.81
$10^{-2} (\rightarrow 10^{-4})$	$(1.02 \pm 0.01) \times 10^{-4}$	1.96	0.98

Finalmente, resaltaremos que el análisis de los espectros obtenidos de ambos fármacos durante el proceso de validación del método de medida, revela la estabilidad espectrofotométrica de éstos en solución, independientemente del pH de ésta. En concreto, los máximos de absorbancia (5-fluorouracilo: 266 nm; diclofenaco sódico: 276 nm) permanecen inalterados a estos pHs, siendo imposible encontrar diferencias entre los espectros obtenidos a pH ácido y pH 7.4. De esta manera, puede asumirse la validez del coeficiente de absorción molar calculado en el apartado 5.4 en todo este intervalo de pHs.

5.5. Adsorción superficial de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico.

Uno de los posibles métodos de vehiculización de fármacos en sistemas transportadores es la adsorción del principio activo tras la formación e incubación de las partículas portadoras en una disolución de éste. Cabe esperar que el enlace formado sea más débil que en la vehiculización mediante el método de absorción en matriz (Arias y cols., 2005, 2008 a, b, c; Calvo y cols., 2001; Soppimath y cols., 2001), y que la cantidad incorporada sea menor. No obstante realizamos también el estudio de la adsorción de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico en los tres tipos de partículas con los que trabajamos. De esta manera, podremos estimar la capacidad de vehiculización de estos fármacos por: *i*) los núcleos magnéticos, para así determinar sus posibilidades como transportadores “per se” y su posible contribución en la vehiculización de estos principios activos por las partículas compuestas; *ii*) el látex de etilcelulosa, lo que nos

permitirá realizar un estudio comparativo con las partículas recubiertas, ya que éste es el principal responsable del transporte de los principios activos por éstas; y *iii*) las partículas compuestas, objetivo central de nuestro trabajo. Para ello, el análisis de la incorporación superficial de los fármacos se realizará mediante determinaciones espectrofotométricas, técnica de carácter cuantitativo, junto con un estudio electroforético, técnica que consideramos cualitativa.

❖ **Determinación espectrofotométrica de la adsorción.**

Los resultados del ensayo de adsorción de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico en los tres tipos de partículas quedan recogidos en las Figuras 30 y 31, respectivamente. La cantidad de 5-fluorouracilo vehiculizada por los núcleos magnéticos, el látex de etilcelulosa y las partículas recubiertas crece con su concentración en el medio, alcanzando valores máximos (en el intervalo ensayado) de $24 \pm 3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$, $48 \pm 4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ y $45 \pm 4 \mu\text{mol}/\text{m}^2$, respectivamente. Los datos correspondientes al diclofenaco sódico (Fig 31) indican que este fármaco se adsorbe en mayor medida que el 5-FU, alcanzándose valores máximos de 54 ± 4 , 90 ± 4 y $86 \pm 3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ para el hierro carbonilo, etilcelulosa y compuestas, respectivamente. Estas diferencias pueden justificarse de modo cualitativo considerando que los dos anillos bencénicos de la molécula de diclofenaco (Figura 2; compárese con Figura 1) le darán cierto carácter hidrofóbico, que favorecerá su adsorción, principalmente sobre el látex y las partículas recubiertas, dada la naturaleza hidrófoba de ambas (Figura 25).

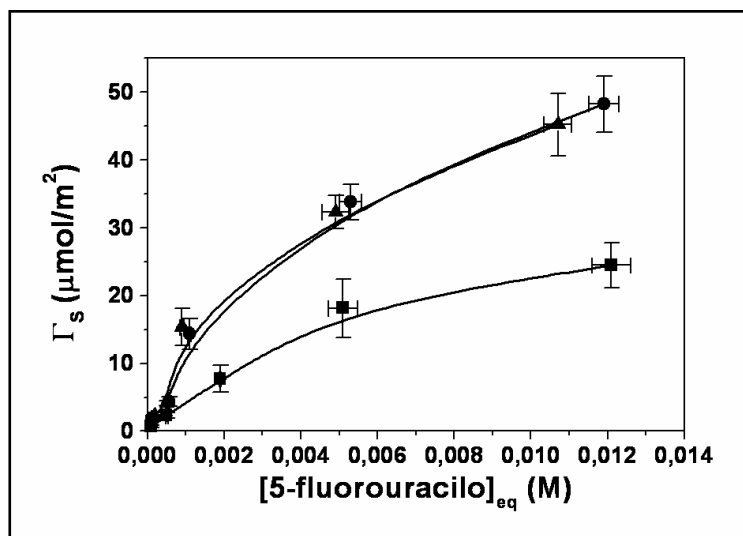


Figura 30. Densidad de adsorción, Γ_s , de 5-fluorouracilo por los núcleos de hierro carbonilo (■), el látex de etilcelulosa (●) y las partículas compuestas (▲), en función de la concentración de equilibrio de principio activo.

En todos los casos se aprecia un efecto positivo de la concentración de principio activo en el grado de adsorción de éste por estos materiales: la adsorción aumenta con la cantidad de fármaco en solución, sugiriéndose una saturación de este proceso a concentraciones superiores a las investigadas. En efecto, los datos parecen ajustarse adecuadamente a una isoterma de adsorción de Langmuir (Tabla 13),

$$\Gamma_s = \frac{\Gamma_{\max} kC}{1 + kC} \quad (45)$$

donde Γ_s es la cantidad adsorbida por unidad de área, C es la concentración en el equilibrio, Γ_{\max} es la cantidad máxima de fármaco adsorbida (equivalente a una monocapa de adsorción) y k es la constante de disociación de los sitios de adsorción.

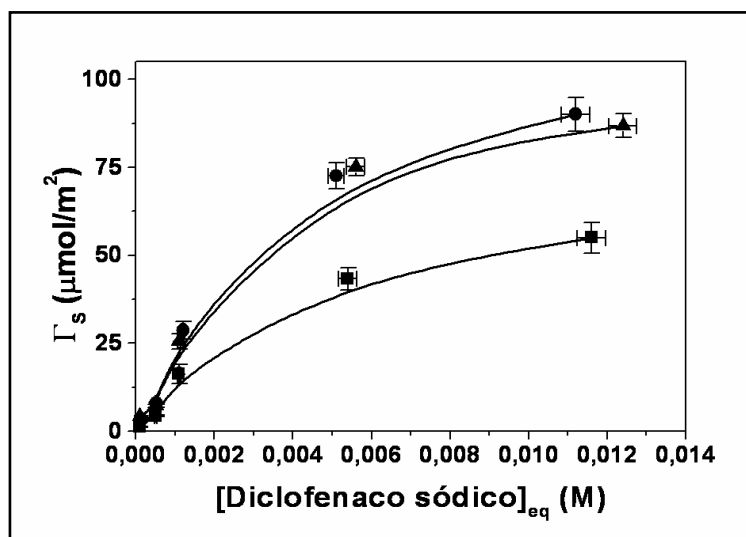


Figura 31. Densidad de adsorción, Γ_s , de diclofenaco sódico por los núcleos de hierro carbonilo (■), el látex de etilcelulosa (●) y las partículas compuestas (▲), en función de la concentración de equilibrio de principio activo.

Tabla 13. Parámetros de ajuste de la isoterma de Langmuir aplicada al proceso de adsorción de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico por los núcleos magnéticos, el polímero y las partículas recubiertas (intervalo de confianza del 95 %).

MATERIAL	FARMACO	Γ_{\max} ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	k (L/mol)
Hierro carbonilo	5-fluorouracilo	35 ± 3	34 ± 1
	Diclofenaco sódico	71 ± 3	75 ± 6
Etilcelulosa	5-fluorouracilo	61 ± 4	58 ± 2
	Diclofenaco sódico	123 ± 10	118 ± 4
Partículas compuestas	5-fluorouracilo	64 ± 5	60 ± 2
	Diclofenaco sódico	118 ± 10	113 ± 4

De esta manera, podemos decir que la vehiculización en superficie de este principio activo es muy similar en el caso del polímero y de las partículas compuestas, consecuencia lógica de que ambos tipos de sistemas son indistinguibles en cuanto a propiedades superficiales; y, además, que la vehiculización en el látex y en las partículas recubiertas es mucho mayor que en el caso del hierro carbonilo, debido posiblemente a la elevada superficie específica asociada al gran número de poros que presentan estas partículas en su superficie (ver Figuras 6c y 8d) (Petrov y cols., 2006; Yang y cols., 2000). Finalmente, debemos resaltar el papel que pueden jugar los núcleos de hierro carbonilo en la incorporación de fármaco en matriz por las partículas recubiertas: debe lograrse una mayor carga si se utilizan núcleos magnéticos cargados de fármaco como materia prima de las partículas compuestas y, también, se debe lograr así una

liberación más sostenida de principio activo ya que el asociado a los núcleos magnéticos sólo se liberará una vez degradado el recubrimiento polimérico. Es por esto que indicamos la necesidad de suspender los núcleos de hierro carbonilo en la fase acuosa ácida diluida de la síntesis con antelación suficiente (p. ej., 24 horas) antes de llevar a cabo la preparación de las partículas compuestas.

❖ **Análisis electrocinético de la adsorción.**

Las Figuras 32 y 33 muestran la evolución de la movilidad electroforética de los núcleos de hierro carbonilo, del látex de etilcelulosa y de las partículas compuestas, en presencia y en ausencia del electrolito añadido (10^{-3} M NaCl, en su caso), con la concentración de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico, respectivamente.

De forma general, para ambos fármacos y en los tres tipos de nanopartículas, los valores de u_e tienden a evolucionar hacia valores progresivamente menos negativos cuando la concentración de fármaco aumenta. Teniendo en cuenta la escasa carga eléctrica (en todo caso, positiva, debido a la protonización del grupo NH, Figura 1), es de esperar que la variación de concentración de fármaco en el medio no produzca grandes cambios en la fuerza iónica del mismo. En consecuencia, la tendencia de la movilidad hacia valores menos negativos debe ser indicativa de adsorción de 5-FU. Esta hipótesis se ve reforzada por el claro efecto de la adición de NaCl al medio. El electrolito apantalla la atracción entre las nanopartículas y las moléculas de fármaco y, por lo tanto, la reducción de la u_e al aumentar

la concentración de principio activo es más significativa cuando no hay NaCl en el medio.

En el caso del diclofenaco sódico, la adsorción superficial estará dificultada por la repulsión electrostática entre las cargas negativas de las partículas y el principio activo, pero a cambio debe producirse un aumento de la fuerza iónica del medio al aumentar la concentración del AINE. Es probable que la disminución observada en $|u_e|$ sea consecuencia, ante todo, de compresión de la doble capa, cuando la concentración total de iones en el medio (altas concentraciones de fármaco) sea elevada.

Debe notarse también que la presencia de NaCl provoca una reducción de la movilidad de los núcleos magnéticos (debido a la compresión de la doble capa eléctrica); en cuanto a las partículas poliméricas y a las partículas compuestas, el aumento aparente de la movilidad electroforética en presencia de NaCl confirma lo comentado en el Capítulo 3 sobre falta de validez de la teoría de Smoluchowski cuando la conductividad eléctrica de la parte interna de la doble capa eléctrica es significativa (Arias y cols., 2007). En cualquier caso, nuestros datos confirman que la electroforesis demuestra ser una técnica útil para la investigación de los procesos que tienen lugar en la interfase como consecuencia de la adsorción de principio activo por las nanopartículas (Arias y cols., 2005, 2008 a, b, c).

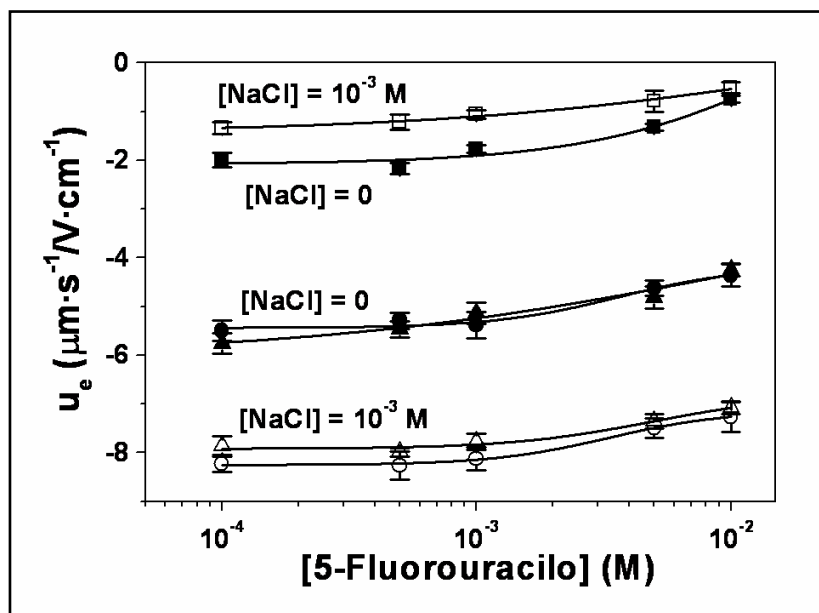


Figura 32. Movilidad electroforética (u_e) de los núcleos de hierro carbonilo (■, □), del látex de etilcelulosa (●, ○) y de las partículas compuestas (▲, Δ) en función de la concentración de 5-fluorouracilo, en presencia (símbolos abiertos) y en ausencia (símbolos cerrados) de NaCl 10^{-3} M. Las líneas son una guía para los ojos.

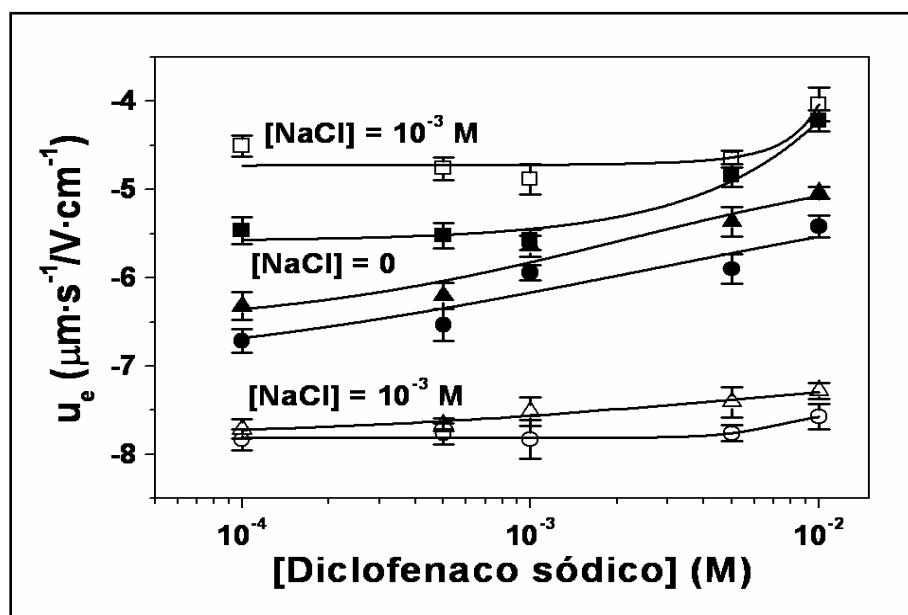


Figura 33. Movilidad electroforética (u_e) de los núcleos de hierro carbonilo (■, □), del látex de etilcelulosa (●, ○) y de las partículas compuestas (▲, Δ) en función de la concentración de diclofenaco sódico, en presencia (símbolos abiertos) y en ausencia (símbolos cerrados) de NaCl 10^{-3} M. Las líneas son una guía para los ojos.

5.6. Absorción de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico.

Una vez estudiada la adsorción de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico en la superficie de los tres tipos de partículas, nos centramos en el estudio de la contribución del, a priori, principal método de vectorización de fármacos en sistemas transportadores: la incorporación del principio activo en el momento en que se produce su formación, analizando además el efecto del principal factor que

influencia la captación de principio activo en la matriz de las partículas: la propia concentración de fármaco. De esta manera, determinaremos, al comparar los resultados con los obtenidos en el análisis de la adsorción superficial de fármaco, la metodología de vehiculización óptima que permite una máxima incorporación de estos principios activos en el sistema transportador magnético coloidal que proponemos.

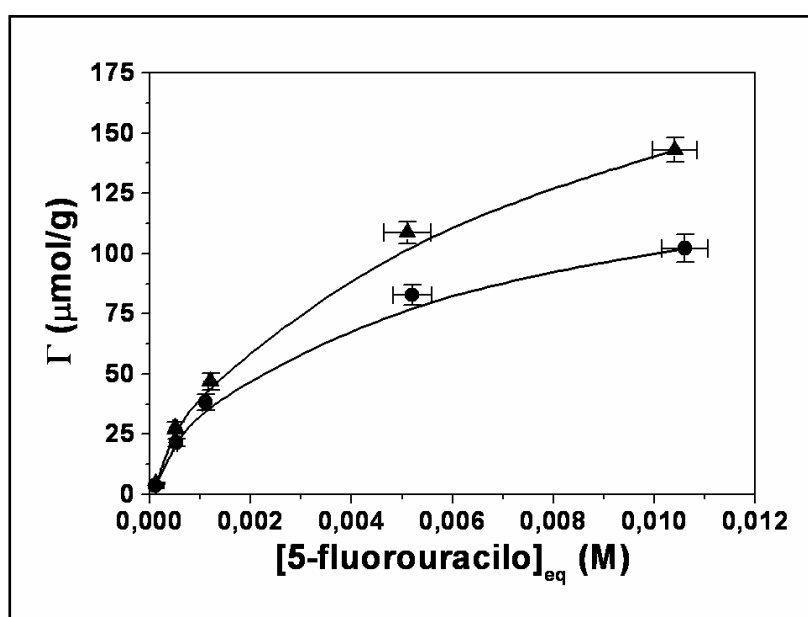


Figura 34. Densidad de absorción ($\mu\text{mol/g}$) de 5-fluorouracilo por las partículas de etilcelulosa (\bullet) y por las partículas compuestas (\blacktriangle) en función de la concentración de éste. Las líneas son una guía para los ojos.

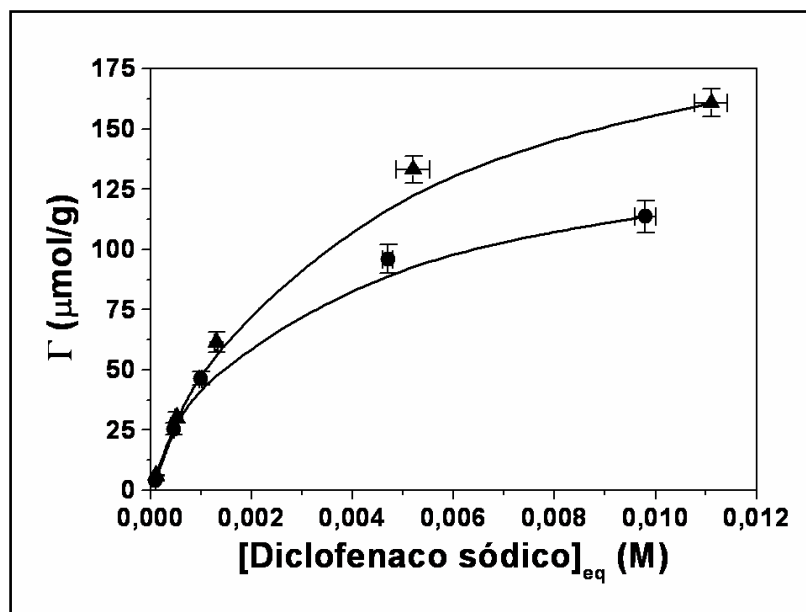


Figura 35. Densidad de absorción ($\mu\text{mol/g}$) de diclofenaco sódico por las partículas de etilcelulosa (\bullet) y por las partículas compuestas (\blacktriangle) en función de la concentración de éste. Las líneas son una guía para los ojos.

La cantidad de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico absorbida por las partículas poliméricas y por las partículas compuestas queda recogida en las Figuras 34 y 35. Como puede apreciarse en ambos casos, la absorción aumenta con la concentración de fármaco presente en el medio de síntesis, sugiriéndose una tendencia a la saturación para concentraciones superiores a las ensayadas. En definitiva, existe un efecto positivo del aumento de la concentración de fármaco sobre la eficacia de la vehiculización (Arias

y cols., 2005, 2008 a, b, c; Fawaz y cols., 1997; Fontana y cols., 1998; Losa y cols., 1991; McCarron y cols., 2000; Ubrich y cols., 2004).

Los valores obtenidos de incorporación de ambos fármacos son superiores a los alcanzados mediante el procedimiento de adsorción en superficie, lo que justifica la selección de este método de vehiculización para la síntesis de las partículas compuestas cargadas con estos fármacos (Arias y cols., 2005, 2008 a, b, c; Calvo y cols., 2001; Soppimath y cols., 2001). Además, se aprecia claramente que la vehiculización es superior en las partículas recubiertas en comparación con las partículas de etilcelulosa. En concreto, los valores máximos de densidad de absorción obtenidos en el caso del 5-fluorouracilo (concentración inicial: 10^{-2} M) pasan de 102 ± 6 $\mu\text{mol/g}$ en el caso de la etilcelulosa a 143 ± 5 $\mu\text{mol/g}$ para las partículas compuestas; y, en el caso del diclofenaco sódico (concentración inicial: 10^{-2} M), pasan de 114 ± 6 $\mu\text{mol/g}$ para las partículas poliméricas a 161 ± 6 $\mu\text{mol/g}$ en las partículas recubiertas. Este hecho encuentra una explicación lógica si tenemos en cuenta que los núcleos magnéticos utilizados en la obtención de las nanopartículas compuestas cargadas de fármaco ya tienen principio activo adsorbido en su superficie (apartado 5.5). Quizá por este motivo las diferencias en cuanto a la vehiculización de estos fármacos no sean tan acusadas en las partículas poliméricas, y sí lo sean en las partículas compuestas debido a la mayor capacidad de adsorción de diclofenaco sódico por el hierro carbonilo (Figuras 34 y 35).

Finalmente, debemos señalar que, en el caso del 5-fluorouracilo, los resultados de vehiculización obtenidos en las

partículas compuestas mejoran los ya logrados en otro tipo de sistemas transportadores (Arias y cols., 2005, 2008 b; Gulati y cols., 1998; McCarron y cols., 2000).

5.7. Liberación *in vitro* de 5-fluorouracilo y de diclofenaco sódico.

Las Figuras 36 y 37 muestran la liberación (%) en función del tiempo desde el látex de etilcelulosa y las partículas compuestas de los fármacos 5-fluorouracilo y diclofenaco sódico, respectivamente. Recuérdese que las partículas de partida contienen 102 y 143 $\mu\text{mol/g}$ (poliméricas y recubiertas, respectivamente) de 5-FU, y 114 y 161 $\mu\text{mol/g}$ de diclofenaco. En ambos casos se observa claramente un proceso bifásico: en primer lugar, una fase de liberación rápida que probablemente significa la pérdida de principio activo asociado a la superficie o débilmente atrapado (adsorbido en los poros superficiales) (Arias y cols., 2008 a, b, c; Brasseur y cols., 1991; Ubrich y cols., 2004). Sin embargo, la liberación más lenta que ocurre durante la segunda fase puede deberse a la difusión del fármaco a través de la matriz polimérica (Chow y cols., 1998; Lenaerts y cols., 1984; Müller y cols., 1992; Page y cols., 1996; Yamada y cols., 2001). En su conjunto, el proceso puede parecer rápido, lo cual es lógico si tenemos en cuenta que la superficie de estas partículas es muy porosa (Petrov y cols., 2006; Yang y cols., 2000), pero la cinética en su conjunto parece adecuada para lograr una acción prolongada en el tiempo de ambos principios activos.

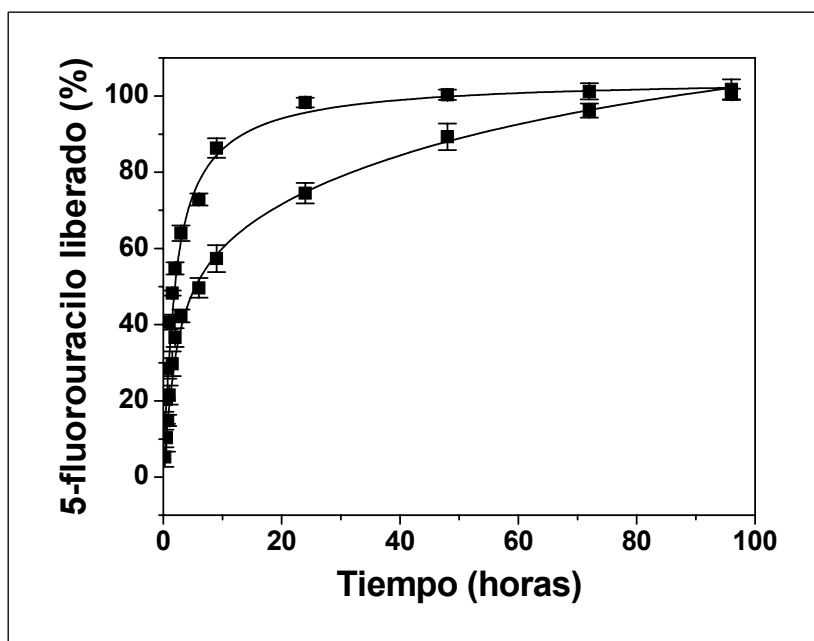


Figura 36. Liberación de 5-fluorouracilo (%) desde el látex de etilcelulosa (●) y desde las partículas compuestas (▲) en función del tiempo de incubación en una solución tampón NaOH – KH₂PO₄ (pH = 7.4 ± 0.1).

Las líneas son los ajustes a una función logística con dos tiempos característicos (Ec. 45).

En concreto, en el caso del 5-fluorouracilo liberado desde las partículas poliméricas, alrededor del 60 % es cedido en las primeras 3 horas, mientras que el 40 % restante se libera lentamente durante las siguientes 21 horas. Cuando la liberación se produce desde las partículas compuestas, el proceso se realiza de una forma más lenta: ≈ 75 % se libera en las primeras 24 horas y el 25 % restante se libera en las siguientes 48 horas. Si los datos se ajustan a una función logística con dos tiempos característicos:

$$y = -\frac{A_1}{1+t/t_1} + \frac{A_1 - A_2}{1+t/t_2} + A_2 \quad (45)$$

los tiempos para el fármaco 5-FU son 1.4 y 6 h para partículas poliméricas y 2 y 78 h para partículas compuestas.

En cuanto al diclofenaco sódico, ocurre de forma similar pero con una cinética ligeramente diferente. En el caso de las partículas poliméricas, solo pudo encontrarse un tiempo característico, de 1.3 h; esto explica que se libere $\approx 60\%$ en las primeras 2 horas y el 40 % restante en las siguientes 20 horas o incluso antes. Por el contrario, en las partículas compuestas de nuevo se obtiene el perfil con dos tiempos, del orden de 1.3 y 35 horas. En consecuencia, aproximadamente un 80 % se libera durante el primer día y el 20 % restante en las siguientes 24 horas. La menor velocidad de liberación observada para los dos fármacos en el caso de las partículas compuestas puede explicarse si tenemos en cuenta que parte del principio activo puede ser adsorbida en la superficie del hierro carbonilo cuando se produce el recubrimiento de éste con el látex para formar las partículas compuestas. De esta manera, la parte de fármaco localizada en la superficie de los núcleos magnéticos debe difundir a través de toda la cubierta polimérica para poder salir al exterior, lo que ralentiza el proceso de cesión de 5-fluorouracilo y de diclofenaco desde las partículas recubiertas. Por último, la cinética del proceso es algo más rápida en el caso del diclofenaco sódico debido a que las partículas vehiculizan una mayor cantidad de éste (Arias y cols., 2008 a, b, c; Brasseur y cols., 1991).

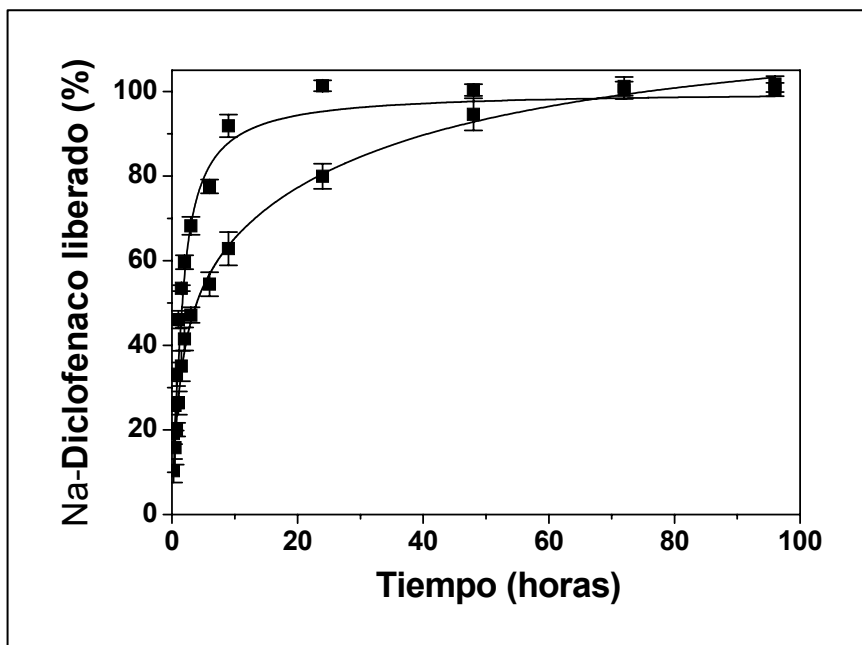


Figura 37. Liberación de diclofenaco sódico (%) desde el látex de etilcelulosa (●) y desde las partículas compuestas (▲) en función del tiempo de incubación en una solución tampón NaOH – KH₂PO₄ (pH = 7.4 ± 0.1).

Las líneas son los ajustes a una función logística con dos tiempos característicos (Ec. 45).

Este perfil bifásico sugiere que la mayor parte del fármaco se localiza a nivel superficial (Müller y cols., 1990; Nèmati y cols., 1996; Radwan, 1995; Stein y Hamacher, 1992), un hecho característico del polímero etilcelulosa que ha sido observado en fármacos de muy diversa naturaleza, por ejemplo, clorhidrato de propranolol, ketoprofeno, nifedipino, pentoxifilina, amoxicilina, cefaclor o

clorhidrato de morfina (Chow y cols., 1998; Freichel y Lippold, 2001; Guyot y Fawaz, 1998; Morales y cols., 2004; Song y cols., 2005; Ubrich y cols., 2004; Yamada y cols., 2001). Finalmente, en el caso concreto del 5-fluorouracilo se logra una cesión más sostenida en comparación con otros sistemas transportadores magnéticos coloidales basados en los polímeros de la familia de los poli(alquilocianoacrilatos) (Arias y cols., 2008 b, c).

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

A continuación exponemos un resumen de las principales conclusiones que se pueden extraer de los datos que hemos presentado, referentes a la síntesis y caracterización de partículas compuestas hierro/etilcelulosa y a su uso como transportadores de fármacos:

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 que constituye un sistema de liberación modificada de fármacos adecuado para la vía

de administración parenteral. Este sistema está constituido por un núcleo magnético (hierro carbonilo), responsable de las propiedades magnéticas de las partículas obtenidas, y un recubrimiento polimérico biocompatible (etilcelulosa), muy apropiado para el transporte y liberación modificada de fármacos.

Se ha llevado a cabo un completo análisis químico de las partículas sintetizadas (incluyendo, a modo de comparación, las esferas de etilcelulosa). Los métodos basados en espectroscopía infrarroja y resonancia magnética nuclear han demostrado que las partículas compuestas poseen grupos funcionales del polímero. Además, la superficie específica del látex de etilcelulosa resultó casi idéntica a la de las partículas recubiertas.

La caracterización magnética de las partículas indicó que los sistemas núcleo/recubrimiento tienen suficiente respuesta magnética, con una imanación de saturación que es alrededor de la mitad de la del hierro puro. Las partículas resultantes son magnéticamente blandas, como el propio hierro.

2. Sobre las propiedades eléctricas superficiales y la termodinámica superficial.

El estudio electroforético comparativo de las propiedades eléctricas superficiales de los tres tipos de partículas constituye una nueva prueba de la eficacia del recubrimiento: la cubierta de látex de etilcelulosa oculta muy eficazmente el núcleo magnético, haciendo que la superficie de las partículas compuestas sea indistinguible de la

de las partículas de polímero. Además, este estudio sirve para proponer el mecanismo por el que se produce el recubrimiento polimérico de los núcleos magnéticos: existe una interacción electrostática atractiva entre las partículas de hierro carbonilo, con carga superficial positiva, y el polímero con carga negativa en las condiciones en que se realiza la síntesis.

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. La diferente naturaleza de las superficies de hierro carbonilo, etilcelulosa y partículas compuestas se manifiesta en general en las diferentes contribuciones a la energía superficial total de cada tipo de sólido. Estos cambios en la energía libre superficial se manifiestan en las características de hidrofobicidad/hidrofilicidad de los diferentes materiales estudiados. La naturaleza hidrófila del hierro carbonilo se pierde al ser recubierto por el polímero hidrófobo, lo que confirma nuevamente la eficacia del recubrimiento polimérico.

3. Sobre la capacidad de transporte y liberación controlada de los fármacos 5-fluorouracilo y diclofenaco sódico.

La determinación de la incorporación de principios activos (el antitumoral 5-fluorouracilo y el antiinflamatorio diclofenaco sódico) por el sistema transportador ha sido cuantificada de forma reproducible mediante un método espectrofotométrico validado, que también se ha utilizado en la determinación de la cantidad de fármaco

cedida al medio en los ensayos de liberación. La utilización de medidas electrocinéticas constituye una aproximación original y de utilidad en la caracterización cualitativa de la adsorción de fármaco por los materiales.

Las condiciones óptimas de vehiculización del fármaco antineoplásico y del AINE en las partículas transportadoras se han investigado planteando dos métodos posibles: la adición del principio activo en el momento en el que se forman las nanopartículas, y la adsorción tras la formación e incubación de las nanopartículas en una disolución de fármaco. Esta investigación demuestra que se logra una mayor vehiculización de los principios activos mediante la absorción en matriz y la utilización de la mayor concentración posible de éstos (se encuentra un efecto positivo de la concentración en este proceso). Además, la absorción es superior en las partículas recubiertas en comparación con las partículas de etilcelulosa, lo que es debido a que los núcleos magnéticos utilizados en la obtención de las nanopartículas compuestas ya tienen principio activo adsorbido en su superficie.

El estudio realizado demuestra que nuestros sistemas transportadores magnéticos son más eficientes en la incorporación de 5-FU que otros descritos en la bibliografía. Las cantidades máximas de fármaco incorporado están en torno a 100 $\mu\text{mol/g}$ (5-Fluorouracilo) y 150 $\mu\text{mol/g}$ cuando el principio activo es diclofenaco.

Los estudios de liberación *in vitro* revelan para ambos fármacos un perfil de cesión bifásico (excepto en el caso de

diclofenaco y polímero puro): una primera fase de liberación rápida debida a la pérdida de principio activo asociado a la superficie o débilmente atrapado, y una fase más lenta debida a la difusión del fármaco a través de la matriz polimérica. Se observa también que se logra una cesión más sostenida y, por lo tanto, adecuada para nuestros fines, en el caso de las partículas compuestas.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

ADAMSON, A. W., "Physical Chemistry of Surfaces", 4º Ed.,
John Wiley & Sons, Nueva York (1982).

AIROLDI, M., PEDANI, F., BRANDO, V., GABRIELE, P.,
GIORDANO, G., Tumori 75, 252 (1989).

ALKSNE, J. F., FINGERHUT, A. G., RAND, R. W., J. Neurol.
Neurosurg. Psychiat. 30, 159 (1967).

ALLEN, L. M., MATIJEVIĆ, E., J. Colloid Interface Sci. 31, 287
(1969).

ALLEN, T. M., CULLIS, P. T., *Science* 303, 1818 (2004).

ARIAS, J. L., GALLARDO, V., GÓMEZ-LOPERA, S. A., PLAZA, R. C., DELGADO, A. V., *J. Control. Rel.* 77, 309 (2001).

ARIAS, J. L., GALLARDO, V., GÓMEZ-LOPERA, S. A., DELGADO, A. V., *J. Biomed. Nanotech.* 1(2), 214 (2005).

ARIAS, J. L., GALLARDO, V., LINARES MOLINERO, F., DELGADO, A. V., *J. Colloid. Interface Sci.* 299, 599 (2006).

ARIAS, J. L., LÓPEZ-VIOTA, M., RUIZ, M. A., LÓPEZ-VIOTA, J., DELGADO, A. V., *Int. J. Pharm.* 339, 237 (2007).

ARIAS, J. L., GALLARDO, V., RUIZ, M. A., DELGADO, A. V., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 54 (2008a).

ARIAS, J. L., LINARES-MOLINERO, F., GALLARDO, V., DELGADO, A. V., *Eur. J. Pharm. Sci.* 33, 252 (2008b).

ARIAS, J. L., RUIZ, M. A., GALLARDO, V., DELGADO, A. V., *J. Control. Rel.* 125, 50 (2008c).

ARRUEBO, M., FERNÁNDEZ-PACHECO, R., IBARRA, M.R., SANTAMARÍA, J., *Nanotoday* 2, 22 (2007).

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).

BARBERI-HEYOB, M., WATELET M., MERLIN J. L., BLEYER, C., SCHROEDER, B., *Bull. Cancer.* 82(12), 1025 (1995).

BARRY, J. W., BOOKSTEIN, J. J., ALKSNE, J. F., *Radiology* 138, 341 (1981).

BELIKOV, V. G., KUREGYAN, A. G., *Pharm. Chem. J.* 35(2), 88 (2001).

BOOTH, F., *Trans. Faraday Soc.* 44, 955 (1948a).

BOOTH, F., *Nature* 161, 83 (1948b).

BOOTH, F., *Proc. Roy. Soc.* 203 A, 514 (1950).

BRADFIELD, J. W. B., *Br. J. Exp. Pathol.* 61, 617 (1980).

BRADFIELD, J. W. B. En: "Microspheres and Drug Therapy". Ed. : Davis, S. S., Illum, L., McVie, J. G., Tomlinson, E. Elsevier, New York, pp. 25-37 (1984).

BRASSEUR, N., BRAULT, D., COUVREUR, P., *Int. J. Pharm.* 70, 126 (1991).

BROWN, I., WARD, H. W. C., *Cancer Lett.* 5, 291 (1978).

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).

CALLISTER, W. D. JR., “Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los Materiales”, Tomo II, Ed. Reverté, Barcelona, pp. 685 (1996).

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).

CHAMPETIER, G., MONNERIE, L., “Introduction a la Chimie Macromoleculaire”, Mason et Cie, París, pp. 76 (1969).

CHARLES, S. W., POPPLEWELL, J., “Ferromagnetic liquids”. En: “Ferromagnetic Materials (Vol. 2)”, Ed.: Wohlfart, E. P., North-Holland Publishing Company, pp. 509-559 (1980).

CHAUDHURY, M. K., GOOD, R. J., *J. Colloid Interface Sci.*, 94, 29 (1983).

CHIBOWSKI, E., *J. Adhesion Sci. Technol.* 6, 1069 (1992).

CHIBOWSKI, E., HOLYSZ, L., *Langmuir* 8, 710 (1992).

CHIBOWSKI, E., GONZÁLEZ-CABALLERO, F., *Langmuir* 9, 330 (1993).

CHIBOWSKI, E., KERKEB, M. L., GONZÁLEZ-CABALLERO, F., *Langmuir* 9, 2493 (1993).

CHOW, A. H. L., HO, S. S. S., TONG, H. H. Y., MA, H. H. M., *Int. J. Pharm.* 172, 113 (1998).

CHRISTENSON, H. K., HORN, R. G., *Chemical Scripta* 25, 37 (1985).

CHRISTENSON, H. K., *J. Disp. Sci. Technol.* 9, 171 (1988).

CHUA-ANUSORN, W., MACEY, D. J., WEBB, J., DE LA MOTTE-HALL, P., ST. PIERRE, T. G., *Biometals* 12, 103 (1999).

CONTE, P. F., SERTOLI, M. R., BRUZZONE, M., *Gynecol. Oncol.* 20, 290 (1985).

COTRAN, R. S., KUMAR, V., ROBBINS, S. L., “Inflamación y Reparación”. En: “Patología Estructural y Funcional”, 5ª Ed., Ed.: Schoen, F. J., Interamericana McGraw-Hill, Nueva Cork, pp. 57 (1995).

CRAIG, D. Q. M., “Dispersions as Pharmaceutical Dosage Forms”.
En: “Technological Applications of Dispersions”, Ed.: Williams,
R. A., Marcel Dekker, New York, pp. 457-497 (1994).

CRONSTEIN, B. N, WEISSMANN, G., Ann. Rev. Pharmacol.
Toxicol 35, 449 (1995).

CUÉLLAR, S., “Antiinflamatorios no esteroídicos”. En:
“Introducción a la química de los medicamentos”, pp. 309-
347. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos,
Madrid (1996).

CUETO, A., TARDÓN, A., DELGADO, M., “Epidemiología del
Cáncer”. En: “*Medicina Preventiva y Salud Pública*”, 10ª Ed., Ed.:
Piedrola Gil, G., Masson (2001).

CURRERI, A. R., ANSFIELD, F. J., McIVER, F. A., WAISMAN, H.
A., HEIDELBERGER, C., Cancer Res. 18, 478 (1958).

DE MERLIS, C. C., SCHONEKER, D. R., BORZELLECA, J. F.,
Food Chem. Toxicol. 43, 1355 (2005).

DEBYE, P., Physik 22, 302 (1921).

DELGADO, A. V., GONZÁLEZ-CABALLERO, F., HUNTER, R. J,
KOOPAL, L. K, LYKLEMA, J., J. Colloid and Interface Sci, 309,
(2), 194-224 (2007).

DEPARTAMENTO TÉCNICO DEL CONSEJO GENERAL DE COLEGIOS OFICIALES DE FARMACÉUTICOS, “Catálogo del Medicamento”, Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (2008).

DERJAGUIN, B. V., *Dis. Faraday Soc.* 18, 85 (1954).

DEVATHALI, S. D., GORDEUK, V. R., BRITTENHAM, G. M., BRAVO, J. R., HUGHES, M. A., KEATING, L. J., *Eur. J. Haematol.* 46, 272 (1991).

DUBERNET, C., ROULAND, J. C., BENOIT, J. P., *Int. J. Pharm.* 64, 99 (1990).

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).

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).

DURÁN, J. D. G., DELGADO, A. V., CHIBOWSKI, E., GONZÁLEZ-CABALLERO, F., *Mater. Chem. Phys.* 38, 42 (1994).

DURÁN, J. D. G., GUINDO, M. C., DELGADO, A. V., J. Colloid Interface Sci. 173, 436 (1995).

DURÁN, J. D. G., ARIAS, J. L., GALLARDO, V., DELGADO, A. V., J. Pharm. Sci. 97, 2948 (2008).

FAWAZ, F., GUYOT, M., LAGUENY, A. M., DEVISSAGUET, J. PH., Int. J. Pharm. 154, 191 (1997).

FERNANDEZ-URRUSUNO, R., GINES, J. M., MORILLO, E., J. Microencap. 17(3), 331 (2000).

FIDLER, I. J., BARNES, Z., FOGLER, W. E., KIRSH, R., BUGELSKI, P., POSTE, G., Cancer Res. 42, 496 (1982).

FONTANA, G., PITARRESI, G., TOMARCHIO, V., CARLISI, B., SAN-BIAGIO, P. L., Biomaterials 19, 1009 (1998).

FORASTIERE, A. A., NATALE, R. B., TAKASUGI, B. J., GOREN, M. P., VOGEL, W. C., J. Clin. Oncol. 5, 190 (1987).

FOWKES, F. M., J. Phys. Chem. 67, 2538 (1963).

FOWKES, F. M., MOSTAFA, M. A., I. E. C. Prod. Res. Div. 17, 3 (1978).

FREICHEL, O. L., LIPPOLD, B. C., Int. J. Pharm. 216, 165 (2001).

FRÖLICH J. C., Trends Pharmacol. Sci.18, 30 (1997).

GALLARDO, V., SALCEDO, J., VERA, P., DELGADO, A. V.,
Colloid Polym. Sci. 271, 967 (1993).

GESTER, R. M., GARVIN, P. J., KLAMER, B., ROBINSON, R. U.,
GIBSON, W. R., WHEELER, F. C., CARLSON, R. G., Bull.
Parent. Drug Assoc. 27, 101 (1973).

GOLDBERG, J. A., KERR, D. J., BLACKIE, R., WHATELY, T. L.,
PETTIT, I., KATO, T., MCARDLE, C. S., Cancer 67, 952 (1991).

GOOD, R. J., GIRIFALCO, L. A., J. Phys. Chem. 64, 561 (1960).

GOOD, R. J., J. Colloid Interface Sci. 59, 3 (1977).

GOOD, R. J., “Contact Angle, Wetting and Adhesion: A Critical
Review”. En: “Contact Angle, Wettability and Adhesion”, Ed.:
Mittal, K. L., Utrecht, Holanda (1993).

GOODWIN, S., PETERSON, C., HOH, C., BITTNER, C., J. Magn.
Magn. Mater. 194, 132 (1999).

GRATTARD, N., PERNIN, M., MARTY, B., ROUDAUT, G.,
CHAMPION, D., LE MESTE, M., J. Control. Rel. 84, 125 (2002).

GULATI, M., GROVER, M., SINGH, S., SINGH, M., Int. J. Pharm.
165, 129 (1998).

GUPTA, P. K., GUPTA, M., *Biomaterials* 26, 3995 (2005).

GUPTA, P. K., HUNG, C. T., PERRIER, D. G., *Int. J. Pharm.* 33, 137 (1986).

GUPTA, P. K., HUNG, C. T., *Int. J. Pharm.* 43, 167 (1988).

GUPTA, P. K., HUNG, C. T., *Life Sci.* 44, 175 (1989).

GUPTA, P. K., HUNG, C. T., *J. Microencapsulation* 7(1), 85 (1990).

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

GURNY, R., GONZALEZ, M. A., BANKER, G. S., KELDISH, D. C., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 5, 437 (1979).

GUYOT, M., FAWAZ, F., *Int. J., Pharm.* 175, 61 (1998).

HAMAKER, H. C., *Physical* 4, 1058 (1937).

HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., GOODMAN-GILMAN, A., “*Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (Goodman & Gilman)*”, 10ª Ed., McGraw-Hill Interamericana (2003).

HARRIS, M. R., GHEBRE-SELLASIE, I., "Aqueous Polymeric Coating for Modified Release Pellets". Ed.: McGinity, J., "Aqueous Polymeric Coating for Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker Inc., Nueva York, pp. 63 (1989).

HENRY, D. C., Proc. Roy. Soc. 133 A, 106 (1931).

HORN, R. G., ISRAELACHIVILI, J., J. Chem. Phys. 75, 1400 (1981).

HSU, M. J., JULIANO, R. L., Biophysics 720, 411 (1982).

HUEBERS, H. A., BRITTENHAM, G. M., CSIBA, E., FINCH, C. A., J. Lab. Clin. Med. 108, 473 (1986).

HUNG, C. T., MCLEOD, A. D., GUPTA, P. K., Drug. Dev. Ind. Pharm. 16, 509 (1990).

HUNTER, R. J., "Zeta Potencial in Colloid Science", Academic Press, Nueva York (1981).

HUNTER, R. J., "Foundations of Colloid Science", Vol. I, Oxford University Press, Oxford (1987).

IANNONE, A., MAGIN, R. L., WALCZACK, T., FEDERICO, M., SWARTZ, H. M., TOMASI, A., VANNINI, V., Magn. Reson. Med. 22, 435 (1991).

IBRAHIM, A., COUVREUR, P., ROLAND, M., SPEISER, P., J.
Pharm. Pharmacol. 35, 59 (1983).

ILLUM, L., DAVIS, S. S., J. Parent. Sci. Technol. 36, 242 (1982).

ISRAELACHIVILI, J., "Intermolecular and Surface Forces", 2^o
Ed., Academic Press, London (1991).

JAIN, S. K., YVAS, S. P., J. Microencapsulation 11, 141 (1994).

JANCZUK, B., CHIBOWSKI, E., BIALOPIOTROWICZ, T., Mater.
Chem. Phys. 15, 489 (1987).

JANCZUK, B., CHIBOWSKI, E., BIALOPIOTROWICZ, T.,
GONZÁLEZ-CABALLERO, F., Colloids Surf. A:
Physicochem. Eng. Aspects 35, 41 (1989).

JANCZUK, B., CHIBOWSKI, E., GUINDO, M. C., WÓJCIK, W.,
GONZÁLEZ-CABALLERO, F., Mater. Chem. Phys. 37, 64
(1993).

KALLAY, N., TORBIC, Z., GOLIC, M., MATIJEVIC, E., J. Phys.
Chem. 95, 7028 (1991).

KATO, T., NEMOTO, R., MORI, H., UNNO, K., GOTO, A.,
HARADA, M., HOMMA, M., Proc. Jpn. Acad. 55, 470 (1979).

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).

KATO, T., NEMOTO, R., MORI, H., TAKAHASHI, M., HARADA, M., Cancer 48, 674 (1981).

KATO, T., “Encapsulated Drugs in Targeted Cancer Therapy”. En: “Controlled Drug Delivery“, Vol. 2, Ed.: Bruck, S. D., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 189-192 (1982).

KATO, T., NEMOTO, R., MORI, H., ABE, R., UNNO, K., GOTO, A., MUROTA, H., HARADA, M., HOMMA, M., Appl. Biochem. Biotechnol. 10, 199 (1984).

KATO, T., SATO, K., SASAKI, R., KAKINUMA, H., MORIYAMA, M., Cancer Chemother. Pharmacol. 37, 289 (1996).

KEESOM, W. H., Physik 22(129) 643 (1921).

KIWADA, H., SATO, J., YAMADA, S., KATO, Y., Chem. Pharm. Bull. 34, 4253 (1986).

KOST, J., NOECKER, R., KUNICA, E., LANGER, R., J. Biomed. Mater. Res. 19(8), 935 (1985).

LANDAU, L. D., LIFSHITZ, E. M., “Fluid Mechanics”, Pergamon Press, Oxford (1959).

LANGER, R., IEEE Trans. Biomed. Eng. 30(8), 524 (1983).

LASKOWSKI, J. S., PUGH, R. J., “Dispersions Stability and Dispersing Agents”. En: “Colloid Chemistry in Mineral Processing”, Elsevier, London (1992).

LAUNES, L. J., Drugs 63, 731 (2003).

LEHMANN, K., “Chemistry and Application Properties of Polymetacrylate Coating Systems”. En: “Aqueous Polymeric Coating for Pharmaceutical Dosage Forms”, Marcel Dekker, Nueva York, p.153 (1980).

LEMAIRE, L., ARELLANO, M., MALET-MARTINO, M. C., MARTINO, R., DE FORNI, M., Bull. Cancer 81(12), 1057 (1994).

LEMON, H. M. , MOZDEN, P. J., Ann. Intern. Med. 60, 333 (1964).

LENAERTS, V., COUVREUR, P., CHRISTIAENS-LEYH, D., JOIRIS, E., ROLAND, M., ROLLMAN, B., SPEISER, P., Biomaterials 5, 65 (1984).

LEWIS, D. A., ALPAR, H. O., Int. J. Pharm. 22, 137 (1984).

LIFSHITZ, E. M., Zh. Eksp. Teo. Fiz. 29, 94 (1955).

LONDON, F. Z., *Physik* 63, 245 (1930).

LÓPEZ GARCÍA, J. J., MOYA, A. A., HORNO, J. J.,
DELGADO, A. V., GÓNZALEZ-CABALLERO, F., *J. Colloid
Interface Sci.* 183, 124 (1996).

LÓPEZ-GONZÁLES, J. D., CARPENTER, F. G., DEITZ, V. R., J.
Res. Nat. Bur. Stand. 55, 11 (1955).

LOSA, C., CALVO, P., CASTRO, E., VILA-JATO, J. L., ALONSO,
M. J., *J. Pharm. Pharmacol.* 43, 548 (1991).

LUBBE, A., BERGEMANN, C., BROCK, J., McCLURE, D., J.
Magn. Magn. Mater. 194, 149 (1999).

LYKLEMA, J., *J. Colloid Interface Sci.*, 58, 242 (1977).

LYKLEMA, J., “Structure of the Solid/Liquid Interface and the
Electical Double Layer”. En: “Solid/Liquid Dispersions”, Ed.:
Tadros, T. F., Academic Press, London, pp. 63-90 (1987).

LYKLEMA, J., “Fundamentals of Interface and Colloid Science (Vol.
II): Solid/Liquid Interfaces”, Academic Press, Londres (1995).

LYKLEMA, J., “Fundamentals of Interface and Colloid Science (Vol.
IV): Particulate Colloids”, Elseiver, Amsterdam, (2005).

LYKLEMA, J., MINOR, M., Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects 140, 33 (1998).

MAEDA, H., FANG, J., INUTSUKA, T., KITAMOTO, Y., Int. Immunopharmacol. 3, 319 (2003).

MANGELSDORF, C. S., WHITE, L. R., J. Chem. Soc., Faraday Trans. 86, 2859 (1990).

MANGELSDORF, C. S., WHITE, L. R., J. Chem. Soc. Faraday Trans. 94, 2441 (1998a).

MANGELSDORF, C. S., WHITE, L. R., J. Chem. Soc. Faraday Trans. 94, 2583 (1998b).

MARTINAC, A., FILIPOVIĆ-GRČIĆ, J., VOINOVICH, D., PERISSUTTI, B., FRANCESCHINIS, E., Int. J. Pharm. 291, 69 (2005).

MATIJEVIĆ, E. En: "Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis", Ed.: Delgado, A. V., Marcel Dekker, Nueva York, p. 199-218 (2002).

McCARRON, P. A., WOOLFSON, A. D., KEATING, S. M., J. Pharm. Pharmacol. 52, 1451 (2000).

McGINITY, J. W., CAMERON, C. G., CUFF, G.W., Drug Develop. Indus. Pharm. 9, 57 (1983).

MENA, O., RUIZ, M. A., GALLARDO, V., *Cosmet. Toilet.* 109, 75 (1994).

MERCOUROFF, W., “Propiétés Magnétiques des Solides et Propiétés Similaires”. En: “Aspects Modernes de la Physique des Solides”, Masson & Cie, París, pp. 75 (1969).

MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO, “Indicadores de la Prestación Sanitaria”, Madrid (1999).

MORALES, M. E., GALLARDO LARA, V., CALPENA, A. C., DOMÉNECH, J., RUIZ, M. A., *J. Control. Rel.*, 95, 75 (2004).

MORALES, M. E., LOPEZ, G., RUIZ, M. A., *Ars Pharm.*, 48 (2) 157-173., 2007.

MORIMOTO, Y., SUGIBAYASHI, K., OKUMURA, M., KATO, Y., *J. Pharm. Dyn.* 3, 264 (1980).

MORIMOTO, Y., AKIMOTO, M., YOTSUMOTO, Y., *Chem. Pharm. Bull.* 30(8), 3024 (1982).

MORIMOTO, Y., AKIMOTO, M., *Biomaterials* 4, 49 (1983).

MORRIS, R. M., POORE, G. A., HOWARD, D. P., SEFRANKA, J. A., “Selective Targeting of Magnetic Albumin Microspheres Containing Vindesine Sulphate: Total Remission in Yoshida

Sarcoma- Bearing Rats”. En: “Microspheres and Drug Therapy: Pharmaceutical, Immunological and Medical aspects”, Eds.: Davis, S. S., Illum, L., McVie, J. G., Tomlinson, E., Elsevier, New York, pp. 439 (1984).

MORRISON, F. A., *J. Colloid Interface Sci.* 34, 210 (1970).

MOSBACH, K., SCHRODER, U., *FEBS Lett.* 102, 112 (1979).

MÜLLER, R. H., LHERM, C., HERBORT, J., COUVREUR, P., *Biomaterials* 11, 590 (1990).

MÜLLER, R. H., LHERM, C., HERBORT, J., COUVREUR, P., *Colloid Polym. Sci.* 269, 147 (1991).

MÜLLER, R. H., LHERM, C., HERBORT, J., BLUNK, T., COUVREUR, P., *Int. J. Pharm.* 84, 1 (1992).

MÜLLER, R. H., MAAßEN, S., WEYHERS, H., SPECHT, F., LUCKS, J. S., *Int. J. Pharm.* 138, 85 (1996).

NÈMATI, F., DUBERNET, C., FESSI, H., DE VERDIÈRE, A. C., POUPON, M. F., PUISIEUX, F., COUVREUR, P., *Int. J. Pharm.* 138, 237 (1996).

NEUMANN, A., GOOD, R. J., *J. Colloid Interface Sci.* 38, 341 (1972).

NEUMANN, A., OMENYI, S. N., VAN OSS, C. J., *Colloid Polymer Sci.* 257, 413 (1979).

NINHAN, B. W., PARSEGIAN, V. A., *J. Biophys.* 10, 646 (1970).

O'BRIEN, R. W., WHITE, L. R., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 274,1607 (1978).

OHSHIMA, H., "Interfacial Electrokinetic Phenomena". En: "Electrical Phenomena at Interfaces", 2° Ed., Eds.: Oshima, H., Furusawa, K., Marcel Dekker, Nueva York, pp. 19-55 (1998).

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).

OLSEN, E. D., "Modern Optical Methods of Analysis", McGraw Hill, Nueva York (1975).

OVADIA, H., PATERSON, P. Y., HALE, J. R., *Isr. J. Med. Sci.* 19, 631 (1983).

OVERBEEK, J. T. G., *Kolloid Beih.* 54, 287 (1943).

OVERBEEK, J. H. G., *Adv. Colloid Interface Sci.* 3, 97 (1950).

OVERBEEK, J. Th. G., “Electrokinetic Phenomena”. En: “Colloid Science”, Vol. I, Ed.: Kruyt, H. R., Elsevier, Amsterdam (1952).

PAGE, M. E., PINTO-ALPHANDARY, H., CHACHATY, E., ANDREMONT, A., COUVREUR, P., S.T.P. *Pharma Sciences* 6(4), 298 (1996).

PANKHURST, Q.A., CONNOLLY, J., JONES, S.K., DOBSON, J., J. *Phys. D Appl. Phys.* 36, R167 (2003).

PANOFSKI, W. K. H., PHILLIPS, M., “Classical Electricity and Magnetism”. Addison-Wesley, Reading (1975).

PARSEGIAN, V. A., NINHAN, B. W., *Nature* 224, 1197 (1969).

PASHLEY, R. M., “Interparticulate Forces”. En: “Colloid Chemistry in Mineral Processing”, Ed.: Laskowski, J. S., Ralston, J., Elsevier, London (1992).

PETROV, O., FURÓ, I., SCHULEIT, M., DOMANIG, R., PLUNKETT, M., DAICIC, J., *Int. J. Pharm.* 309, 157 (2006).

PLAZA, R. C., ZURITA, L., DURÁN, J. D. G., GONZÁLEZ-CABALLERO, F., DELGADO, A. V., *Langmuir* 14, 6850 (1998).

PRAT, G., *Reumatología* 10(1), 14 (1994).

POSTE, G., KIRSH, R., *Biotechnology* 1, 869 (1983).

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).

QUIRANTES, A., BEN-TALEB, A., DELGADO, A., *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 119, 73 (1993).

QUIRANTES, A., PLAZA, R., DELGADO, A., *J. Colloid. Interface Sci.* 189, 236 (1997).

RADWAN, M. A., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21(20), 2371 (1995).

RANNEY, D. F., “Magnetically controled devides and biomodulation”. En: “Drug delivery devides: fundamentals and applications”. Ed.: Tyle, P., Marcel Dekker, New York, pp. 325-343 (1988).

REKHI, G., JAMBHERKAR, S., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21, 61 (1995).

RUIZ, M. A., GALLARDO, V., DELGADO, A. V., VERA, P., *Il Farmaco* 49, 147 (1994).

RUSSEL, W. B., SAVILLE, D. A., SCHOLWATER, W. R.,
“Colloidal Dispersions”, Cambridge University Press, Cambridge
(1989).

SAKO, M., YOKOGAWA, S., SAKAMOTO, K., ADACHI, S.,
HIROTA, S., OKADA, S., MURAO, S., Invest. Radiol. 17, 573
(1982).

SAKO, M., HIROTA, S., Jpn. J. Cancer Chemother. 13(4), 1618
(1986).

SAMOKHIN, B. P., DOMOGATSKY, S. P., Zh. Vses. Khim. Ova.
32, 527 (1987).

SASLAWSKI, O., WEINGARTEN, C., BENOIT, J. P.,
COUVREUR, P., Life Sci. 42, 1521 (1988).

SENYEI, A., WIDDER, K. J., CZERLINSKI, G., J. Appl. Phys 49,
3578 (1978).

SENYEI, A. E., REICH, S. D., GONCZY, C., WIDDER, K. J., J.
Pharm. Sci. 70, 389 (1981).

SHETH, P. B., THOSSOUIN, J., Drug Develop. Indust. Pharm.10,
313 (1994).

SHILOV, V. N., DELGADO, A. V., GONZALEZ-CABALLERO, F., GROSSE, C., J. *Colloid and Interface Science*, 232, (1) 141-148 (2000)

SIKORA, K., ADVANI, S., KOROLCHOUK, V., MAGRATH, I., LEVY, L., PINEDO, H., SCHWARTSMANN, G., TATTERSALL, M., YAN S., *Annals of Oncology* 10, 385 (1999).

SILVERSTEIN, S. C., MICHL, J., SUNG, S. S. J. En: "Transport of Macromolecules by Cellular Systems ". Ed.: Silverstein, S. C., Dahlem Konferenzen, Berlín, 245-264, (1978).

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., "Infrared Spectrometry". En: "Spectrometry Identification of Organic Compounds", 6° Ed., John Wiley & Sons Inc., New York, pp.71 – 144 (1998).

SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A.: "Principios de Análisis Instrumental", 5° Ed., McGraw Hill, Madrid (2001).

SOLOWAY, M. S., TIDWELL, M., *P. Am. Assoc. Canc. Res.* 18, 2 (1977).

SONG, M., LI, N., SUN, S., TIEDT, L. R., LIEBENBERG, W., DEVILLIERS, M. M., *Il Farmaco* 60, 261 (2005).

SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T. M., KULKARNI, A. R., RUDZINSKI, W. E., *J. Control. Rel.* 70, 1 (2001).

STEIN, M., HAMACHER, E. , Int. J. Pharm. 80, R11 (1992).

STERUERNAGEL, C. R., “Aqueous polymeric coating for pharmaceutical dosage forms”, Marcel Dekker Inc., Nueva York (1989).

SULLIVAN, C. O., BIRKINSHAW, C. Biomaterials 25, 4375 (2004).

TARJAT, P., MORALES, M., VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S., GONZÁLEZ-CARREÑO, T., SERNA, C. J., J. Phys. D: Appl. Phys 36, 182 (2003).

TEO, P. M. L., LEUNG, T. W. T., YU, A. T. C., Oral Oncol. 31b, 373 (1995).

TOMLINSON, E., Technol. Prod. Manuf. 4, 49 (1983).

TURNER, R. D., RAND, R. W., BENTSON, J. R., MOSSO, J. A., J. Urol. 113, 455 (1975).

UBRICH, N., BOUILLOT, P., PELLERIN, C., HOFFMAN, M., MAINCENT, P., J. Control. Rel. 97, 291 (2004).

VAN FURTH, R., “Mononuclear Phagocytes”, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1970).

VAN OSS, C. F., GILLAM, C. F., NEUMAN, A. W., "Phagocytic Engulfment and Cell Adhesiveness", Marcel Dekker, New York (1975).

VAN OLPHEN, H., "Clay Colloid Chemistry", Wiley, Nueva York (1977).

VAN OSS, C. J., GOOD, R. J., CHAUDHURY, M. K., J. Colloid Interface Sci. 111, 378 (1986).

VAN OSS, C. J., GOOD, R. J., CHAUDHURY, M. K., Sep. Sci. Technol. 22, 1 (1987a).

VAN OSS, C. J., CHAUDHURY, M. K., GOOD, R. J., Adv. Colloid Interface Sci. 28, 35 (1987b).

VAN OSS, C. J., CHAUDHURY, M. K., GOOD, R. J., Chem. Rev. 88, 927 (1988a).

VAN OSS, C. J., GOOD, R. J., CHAUDHURY, M. K., Langmuir 4, 884 (1988b).

VAN OSS, C. J., GOOD, R. J., J. Macromol. Sci. Chem. A26, 1183 (1989).

VAN OSS, C. J., Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects 78, 1 (1993).

VAN OSS, C. J., "Interfacial Forces in Aqueous Media", Marcel Dekker Inc., Nueva York (1994).

VANDERHOFF, J. W., EL-AASER, M. S., UGELSTAD, J., "Polymer Emulsification Process". United States Patent 4,177,177 (1979).

VANDERHOFF, J. W., EL-AASER, M. S., "Theory of Colloids". En: "Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems", Vol. I. Eds.: Lieberman, H. A., Rieger, M. M., Banker, G. S., Marcel Dekker Inc., Nueva York, pp. 93 (1988).

VERA, P., TALEB, A. B., SALCEDO, J., GALLARDO, V., Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects 92, 169 (1994).

VERA, P., GALLARDO, V., SALCEDO, J., DELGADO, A. V., J. Colloid Interface Sci. 177, 553 (1995).

VERA, P., GALLARDO, V., SALCEDO, J., DELGADO, A. V., J. Colloid Interface Sci. 177, 553 (1996).

VISSER., J., J. Adv. Colloid Interface Sci. 3, 331 (1972).

WAISMAN, H. A., J. Lab. Clin. Med. 50, 961 (1957).

WEINERMAN, B., ORR, K., Clin. Invest. Med. 9, 126 (1986).

WHITTAKER, P., ALI, S. F., IMAM, S. F., DUNKEL, V. C., Regul. Toxicol. Pharmacol. 36, 280 (2002).

WIDDER, K. J., SENYEI, A. E., SCARPELLI, D. G., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 158, 141 (1978).

WIDDER, K. J., FLOURET, G., SENYEI, A., J. Pharm. Sci. 68, 79 (1979).

WIDDER, K. J., MORRIS, R. M., POORE, G. A., HOWARD, D. P., SENYEI, A. E., Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19, 135 (1983).

WIERSEMA, P. H., LOEB, A. L., OVERBEEK, J. T. G., J. Colloid Interface Sci. 22, 78 (1966).

WILKINS, K. J., SENYEI, A. E., RANNEY, D. F., Adv. Pharmacol. Chemother. 16, 213 (1979).

WILSON, W. L., DEREN, T., MILLS, L. C., Fed. Proc. 18, 460 (1959).

WU, P. C., HUANG, Y. B., CHANG, J. I., TSAI, M. J., TSAI, Y. H., Int. J. Pharm. 260, 115 (2003).

YAMADA, T., ONISHI, H., MACHIDA, Y., J. Control. Rel. 75, 271 (2001).

YANG, Y.-Y., CHUNG, T.-S., BAI, X.-L., CHAN, W.-K., Chem. Eng. Sci. 55, 2223 (2000).

ZHUO, R. X., DU, B., LU, Z. R., J. Control. Rel. 57, 249 (1999).

ZIMMERMAN, U., PILWAT, G., Naturforschungen 31C, 732 (1976).

ZINUTTI, C., KEDZIEREWICZ, F., HOFFAMN, M., BENOIT, J. P., MAINCENT, P., Int. J. Pharm. 133, 97 (1996).

ZUKOSKI IV, C. F., SAVILLE, D. A., J. Colloid Interface Sci., 114, 32 (1986).



Universidad de Granada

School of Pharmacy
Department of Pharmacy and
Pharmaceutical Technology

*Synthesis and Characterization of
Nanoparticles Consisting
of a Magnetic Core
and a Polymeric Coating*

English Summary of the
Ph. D. Dissertation

By

MARGARITA LÓPEZ-VIOTA GALLARDO

Granada, September 2008

1. Introduction

Because of their peculiar physical properties (biocompatibility, controllable shape and sizes, responsiveness to external magnetic fields, etc.), an increasing number of formulations of magnetic composite particles have been developed for special medical techniques, particularly, drug delivery and targeting. We are dealing with systems usually having one of the following structures: either a magnetic core coated with a biocompatible polymer, or magnetic nuclei embedded on the polymeric surface or precipitated inside the polymeric pores (Pankhurst et al., 2003; Ren et al., 2005). The magnetic core is typically made of magnetite, maghemite or carbonyl iron; and the polymeric shell has a widely diverse nature, including poly(alkylcyanoacrylate), poly(lactide), poly(lactide-co-glycolide) and poly(ϵ -caprolactone) (Arias et al., 2001; Pankhurst et al., 2003; Flesch et al., 2004; Flesch et al., 2005; Okassa et al., 2005; Ren et al., 2005; Arias et al., 2006).

Their use as drug carrier systems ensures a preferential location of the major drug fraction in the target tissue (limiting systemic distribution and avoiding normal tissue clearance), and drug action at the cellular or subcellular level, without adverse effects to normal cells (Häfeli, 2004; Arias et al., 2005; Gupta and Gupta, 2005).

For drug delivery applications, magnetic carriers must be water-based, biocompatible, non-toxic, and non-immunogenic; in addition, the external applied field must be strong enough and

focussed to retain the particles in the vasculature flow field (Häfeli, 2004; Tartaj et al., 2003). Nevertheless, one of the most important features in the design of core/shell particles is their final size. This property not only affects other physical characteristics, such as their magnetic moment (and hence their response to applied magnetic fields), but also the biological fate of the particles once they are injected to the patient. Very small (< 10 nm) carriers will be rapidly removed after their extensive extravasation and renal clearance, whereas particles with diameters > 200 nm will be mechanically filtrated by the spleen and removed by the cells of the reticuloendothelial system. Moreover, carrier fractions over $5 \mu\text{m}$ will induce capillary blockade (Gupta and Gupta, 2005). However, if the particles are retained by the external magnetic field in the target tissue capillaries, drug diffusion from the capillary wall into the organ (step limited by the molecular weight of the drug) will induce the therapeutic action (Maeda et al., 2003). If, in addition, this action requires extravasation, sizes between 0.5 and $5 \mu\text{m}$ may already be suitable for that process, as has been observed even after magnetic field removal (Goodwin et al., 1999; Gupta and Gupta, 2005).

The magnetic drug delivery system described in this work is composed of a magnetic nucleus (carbonyl iron) and a biocompatible polymeric shell (ethylcellulose), in order to take advantage of the properties of its two components. Carbonyl iron (Fe^0) was chosen because of its high initial susceptibility and saturation. In addition, its toxicity is quite low (LD_{50} : 50 g/kg) (Huebers et al., 1986; Devathali et al., 1991; Chua-anusorn et al., 1999; Whittaker et al., 2002). Concerning the biodegradability of the iron nuclei used in this work

(average diameter of 570 ± 160 nm, see below), most particles will be eliminated mainly by renal filtration (Okon et al., 1994).

Ethylcellulose was chosen as the biocompatible polymeric shell on the magnetic particles, responsible for the drug transport and release. This is a hydrophobic polymer, widely used in pharmaceutical technology, chemically stable under storage and characterized by its lack of toxicity for patients. Ethylcellulose can be used either as a modified drug release dosage form for oral administration or as a chemoembolization agent after sterilization, due to the prevention of the rapid revascularization of the embolized area (Dubernet et al., 1990; Zinutti et al., 1996; Grattard et al., 2002; DeMerlis et al., 2005). In cancer treatment, as a result of its great tolerability and low toxicity, this cellulose-based latex has been applied to diverse tumor lesions proving an enhanced and sustained effect, prolonging the patients survival (Kato et al., 1996; Zinutti et al., 1996). A wide variety of active agents have been proposed to be delivered by this carrier, particularly 5-fluorouracil, propranolol, loratadine, ketoprofen or morphine, among others (Zinutti et al., 1996; Yamada et al., 2001; Wu et al., 2003; Morales et al., 2004; Ubrich et al., 2004; Martinac et al., 2005).

Taking into account that the inclusion of magnetic particles in polymeric substrates does not affect the toxicity of the latter and that clinical phase I trials have clearly shown the low toxicity of these selective drug delivery systems (Ibrahim et al., 1983; Lübbe et al., 1996a, b), it is interesting to investigate the applications of carbonyl iron/ethylcellulose composites in pharmaceutical technology. In this

Thesis, a reproducible technique for the preparation of core/shell particles, consisting of an iron nucleus and a latex shell, is described. The coating efficiency will be analyzed by means of electron microscopy (TEM, HRTEM, SEM), infrared absorption spectra, and electrical, thermodynamic and chemical surface properties of the mixed particles, as compared to those of the pure magnetic core and latex colloids.

In addition, the potential applications of the particles as drug vehicles will also be carefully explored. Both spectrophotometric and electrokinetic techniques will be used for the evaluation of the surface and bulk loading, as well as release kinetics, of two drugs, namely, 5-fluorouracyl (used in cancer treatment) and diclofenac (a nonsteroidal anti-inflammatory drug used as the potassium or sodium salt in the treatment of rheumatic and nonrheumatic inflammatory conditions, and as the potassium salt to relieve pain and dysmenorrhea; also applied topically to the conjunctiva as the sodium salt to reduce ocular inflammation or photophobia after certain kinds of surgery and to the skin to treat actinic keratoses).

The antitumor drug 5-Fluorouracil [5-FU, 5-fluoro-2,4-pyrimidinedione] has been selected based on its demonstrated and extensive use in cancer treatment due to its broad spectrum of activity against solid tumors. In addition, different authors have already reported that its therapeutic efficacy can be improved, while its undesired toxic effects are reduced (Cooke et al., 2001; Lemaire et al., 1994) by loading this hydrophilic drug to a carrier system. This antineoplastic drug works during the synthesis of the cellular cycle,

interfering the DNA and RNA synthesis: because of its structural analogy with uridine, it behaves as a fake substrate in nucleic acid synthesis, producing anomalous DNA. Fig. 1 is a schematic drawing of the molecule.

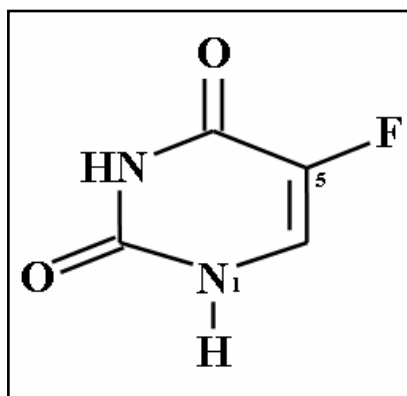


Figure 1. Chemical structure of 5-fluorouracil.

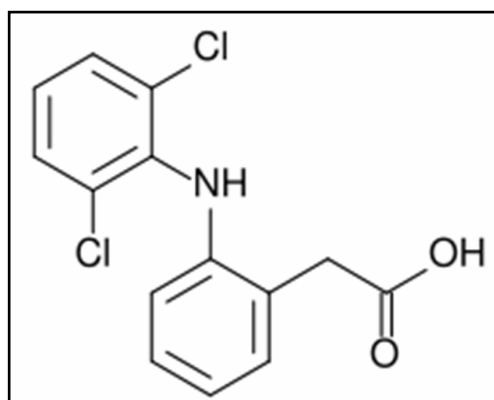


Figure 2. Chemical structure of diclofenac.

Concerning diclofenac (Fig. 2), it is probably the most widely used non-steroidal anti-inflammatory drug in the world. Its main pharmacological action is the inhibition of prostaglandin synthesis,

blocking the activity of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2. Its analgesic and anti-inflammatory actions are based on that blocking.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

All chemicals used were of analytical quality from Panreac, Spain, except for ethylcellulose polymer (9004-57-3; supplied by ICN Biomedical Inc., USA), carbonyl iron (BASF, Germany), formamide (Aldrich, USA), and KOH and acetone (Merck, Germany). In addition, 5-FU was purchased from Sigma-Aldrich, Germany, and diclofenac from Guinama, Spain. Water used in the experiments was deionized and filtered with a Milli-Q Academic System (Millipore, France).

2.2 Methods

2.2.1. Preparation of Carbonyl Iron, Ethylcellulose and Carbonyl Iron/Ethylcellulose (Core/Shell) Nanoparticles

The selection method used to obtain carbonyl iron nanoparticles with a diameter below 1 μm and narrow size distribution consisted of a gravitational separation (Arias et al., 2006). This method involves the sonication of 0.3 % (w/v) Fe^0 aqueous suspensions during 5 min. After settling under gravity during 60 min, the upper 10 mm of supernatant were taken. For these separations, 1 L flasks with an internal diameter of about 90 mm were used. The conductivity of the supernatant was $\sim 1 \mu\text{S/cm}$, and no other solids but

carbonyl iron were in suspension. The particles were then dried at 60 °C in a vacuum oven and stored until their use.

The method followed for the preparation of colloidal ethylcellulose latex is the procedure developed by Vanderhoff et al. (1979), with slight modifications. Briefly, 4.68 g of ethylcellulose were dissolved in a mixture of organic solvents (22.57 g benzene and 4 g ethanol; this mixture has been demonstrated to be a good solvent for ethylcellulose). After 24 h at room temperature, 0.31 g of n-decane was added to the polymeric phase, and it acted as a stabilizer of the emulsion prepared by adding this organic solution to 94 g of a 10^{-3} N HNO_3 aqueous solution, containing 0.125 % (w/v) sodium dodecyl sulphate and 0.375 % (w/v) polyethylene glycol 4000. Before mixing, both phases were heated at 67.0 ± 0.5 °C, and the incorporation of the aqueous phase to the polymeric one was carried out under mechanical stirring at 8000 rpm, during 5 min. Finally, the organic solvent was evaporated at room temperature and under mechanical stirring at 2000 rpm, during 24 h, in order to eliminate the toxicity of the systems and to increase their solid content. A whitish suspension was obtained, which was then subjected to a cleaning procedure that included repeated cycles of centrifugation (20 000 rpm, Centrikon T-124 high-speed centrifuge, Kontron, France) and redispersion in Milli-Q water. In order to ensure that the suspension was sufficiently clean, the conductivity of the supernatant was measured.

Finally, the procedure followed to obtain the core/shell nanoparticles was very similar to the one described for the latex spheres, except that the aqueous phase was a 0.266 % (w/v) carbonyl iron suspension in 10^{-3} N HNO_3 solution. This initial

polymer/magnetic nuclei weight ratio has been shown to produce an adequate polymer shell on the magnetic nuclei (Arias et al., 2001, 2006). Cleaning was achieved by repeated magnetic separation and redispersion in Milli-Q water, until the supernatant was transparent and its conductivity indicated that the suspensions were clean of both unreacted chemicals and non-magnetic latex particles. The final solids concentration was typically around 5.6 % (w/v).

The drug incorporation into the composite core/shell particles can be carried out either by dissolving it in the aqueous phase containing the magnetic particles, and then adding the organic phase as described, or by dissolving it directly in the latter. The choice of one procedure or the other will depend on the solubility properties of the drug, and its physicochemical compatibility with the polymer and the inorganic particles. In addition, a third approach would involve a surface loading on previously synthesized particles, by contacting them with a solution of the drug.

2.2.2. Characterization methods

The determination of the size and shape of the three types of synthesized particles, was achieved through analysis of TEM, Dark-Field HRTEM and SEM pictures, obtained using Zeiss EM 902 (Germany) transmission, STEM PHILIPS CM20 (The Netherlands) high resolution transmission, and Zeiss DSM 950 (Germany) scanning, electron microscopes, respectively. A preliminary inspection of the coating efficiency was carried out by these techniques. Prior to observation, dilute suspensions [approx. 0.1 % (w/v)] were sonicated for 5 min, and drops of the suspension were

placed on copper grids with formvar film. The grids were then dried at 35 °C in a convection oven.

The values of specific surface area of the three kinds of solids were obtained by multipoint B.E.T. nitrogen adsorption, in a Quantasorb Jr. of Quantachrome (USA). The experiments were repeated at least three times on independent samples, in all cases.

The characterization of the chemistry of the three types of particles (carbonyl iron, latex, and core/shell) was carried out by means of Fourier transform infrared spectrometry data (Nicolet 20 SXB infrared spectrometer, USA) with a resolution of 2 cm⁻¹.

The surface electrical properties of suspensions of the three kinds of particles studied [0.1 % (w/v)], were analyzed by electrophoresis measurements as a function of both pH and NaNO₃ concentration, using a Malvern Zetasizer 2000 (England) electrophoresis device. Measurements were performed at 25.0 ± 0.5 °C, after 24 h of contact at this temperature. The experimental uncertainty of the measurements was below 5 %.

Finally, a surface thermodynamic analysis of the three kinds of particles was also carried out, using the model developed by van Oss et al., according to which the total surface free energy of any material *i* is the sum of two contributions (van Oss, 1994; Durán et al., 1996):

$$\gamma_i^{\text{TOT}} = \gamma_i^{\text{LW}} + \gamma_i^{\text{AB}} = \gamma_i^{\text{LW}} + 2\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-} \quad (1)$$

one of which, γ_i^{LW} , is the non-polar Lifshitz-van der Waals component, and the second one, γ_i^{AB} or acid-base component, is related to the electron-donor (γ_i^-) and electron-acceptor (γ_i^+) characteristics of the material. Similarly, the interfacial solid/liquid free energy, γ_{SL}^{TOT} , and its LW and AB components ($\gamma_{SL}^{LW}, \gamma_{SL}^{AB}$, respectively) are related to the surface free energies of both the solid (subscripts S) and the liquid (subscripts L):

$$\gamma_{SL}^{TOT} = \gamma_{SL}^{LW} + \gamma_{SL}^{AB} = \gamma_{SL}^{LW} + 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_S^-} + 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_S^+} - 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} - 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \quad (2)$$

These quantities can be related to the contact angle θ between the liquid and the solid, using the Young's equation (Adamson, 1990):

$$(1 + \cos\theta) \gamma_L^{TOT} = 2\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \quad (3)$$

The three unknowns (γ_S^{LW} , γ_S^+ and γ_S^-) can be obtained by solving the resulting system of three equations if the contact angles of three liquids of known γ_L^{LW} , γ_L^+ and γ_L^- , are measured. In our case, we used water ($\gamma_L^{LW} = 21.8$, $\gamma_L^+ = \gamma_L^- = 25.5$ mJ/m²), formamide ($\gamma_L^{LW} = 39.0$, $\gamma_L^+ = 2.28$, $\gamma_L^- = 39.6$ mJ/m²) and α -bromonaftalene ($\gamma_L^{LW} = 43.6$, $\gamma_L^+ = \gamma_L^- = 0$ mJ/m²), all data having been taken from van Oss (1994). The contact angles of the three liquids were determined at 25.0 ± 0.5 °C, using a Ramé-Hart 100-00 goniometer (USA), on pellets (radius: 1.3

cm) obtained by compressing the dry powders in a Spepac hydraulic press set to 10 Ton during 5 min.

The magnetic properties of Fe⁰ and core/shell particles (first magnetization curve and hysteresis cycle) were determined with a Manics DSM-8 vibrating magnetometer, at room temperature. The field-responsive behavior of the composite particles under the influence of an external magnetic field, was analysed by optical microscope visualization of a 0.5 % (w/v) aqueous suspension under exposure to a 0.2 T permanent magnet, using a Nikon SMZ800 (Japan) stereoscopic zoom microscope.

2.2.3. Methodology for the determination of drug loading and release

The determination of the quantity of 5-fluorouracil incorporated by our materials is limited by the instrumental techniques available. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is the most widely used technique for the quantification of the incorporation and release of many active agents. However, we did not have access to this technique in our study. Therefore, we followed the methodology used by other authors in the determination of the drug incorporation by nanoparticles of the same family (Fawaz et al., 1997; Müller et al., 1991). This methodology is based in the application of the Beer's law to a medium composed by more than one class of absorbent substance. As it is well known, the total absorbance of a multicomponent system is the sum of the absorbances of each absorbent component, whenever no significant interactions exist between each other. In our case, the substances capable to contribute to this total absorbance are the drug not incorporated to the nanoparticles, the polymerization by-products,

and remaining components of the medium (buffer, surfactant). Therefore, the amount of drug not trapped by the nanoparticles can be estimated by subtracting to the total absorbance of the system, that produced by the by-products mentioned. The total drug loading was obtained from the difference between the initial and final drug concentrations in the medium.

A) SURFACE INCORPORATION

The drug loading of the polymeric and composite nanoparticles can be achieved by means of two methods: the addition of the active agent at the moment in which the nanospheres are generated, being trapped mainly in the polymeric matrix, or the surface adsorption after the formation and incubation of the nanoparticles in its solution. It is predictable that the main loading will be obtained by the bulk incorporation method (Soppimath et al., 2001). The study of the 5-fluorouracil and diclofenac surface incorporation by our materials started from the nanosphere preparation under the polymerization conditions, a battery of 5 mL solutions with different 5-fluorouracil molar concentration (10^{-5} , $5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3}$, and 10^{-2}) were prepared, reproducing the monomer polymerization medium that was generally used in the absorption experiments. After the uptake of a sample of the medium for a later comparison, enough polymer was added to obtain a 0.55 % (w/v) final concentration. After 24 hours of contact, the supernatants were obtained by double centrifugation at 9000 rpm during 20 minutes. The determination of the 5-fluorouracil adsorption was done, as previously stated, by means of the comparison of the polymerization medium absorbance with the supernatant absorbance obtained after the double

centrifugation routine and the removing of the residual products absorbance. The same procedure was followed in the case of the composite and magnetite nanoparticles, establishing a concentration of 1 % (w/v) for both.

As an additional probe to determine if the surface adsorption takes place, the behavior of its electrophoretic mobility (μ_e) when the drug is present in the medium was also studied. The experimental methodology followed was described in the spectrophotometric determinations. The suspensions studied were 0.1 % (w/v) in concentration. In order to consider the influence of the ions present in the solution, the suspensions were divided into two groups: with and without an ionic strength fixed (10^{-3} M NaCl). The measurements were carried out after 24 hours of storage at 25 °C, with protection against ambient light and under constant stirring, checking the pH previously. The data given is the average of fifteen determinations, changing each sample every three measurements.

B) BULK LOADING

The main factor determining the active principle loading has been found to be the initial drug concentration in the synthesis medium (Arias et al. 2008 a,b,c; Fawaz et al., 1997; Fontana et al., 1998; Losa et al., 1991; McCarron et al., 2000). In our study, the analysis of the influence of the concentrations of either 5-FU or diclofenac on their incorporation on ethylcellulose and composite particles was carried out by following the synthesis routine and the spectrophotometric determination already described. The magnetic nuclei are kept in contact with the aqueous phase of the synthesis,

containing the drug, during 24 h prior to mixing this suspension with the nonaqueous, polymeric solution.

C) IN VITRO DRUG RELEASE

The final step in the evaluation of the applicability of our particles as drug vehicles involves the determination of the rate of delivery. Both polymer and composite particles were employed with that aim, and the conditions of the release experiments were:

- Bulk loading from 10^{-2} M drug solution
- Centrifugation (8000 rpm, 5 min) of the suspensions thus prepared in order to eliminate the non-loaded drug
- Redispersion of the drug-loaded sediments in 10 mL of a NaOH-KH₂PO₄ (pH 7.4)
- Temperature 37.0 ± 0.5 °C
- Sampling of the suspensions (1.5 mL) at specified time intervals
- Centrifugation of the extracted sample, optical absorbance determination of the supernatant (5-FU: 266 nm; diclofenac: 276 nm)
- An equal volume is returned to the original suspension, together with the centrifuged sediments (in order to keep sink conditions)
- Evaluation of the amount released using the same spectrophotometric method above described.

3. Results and Discussion

3.1. Particle geometry

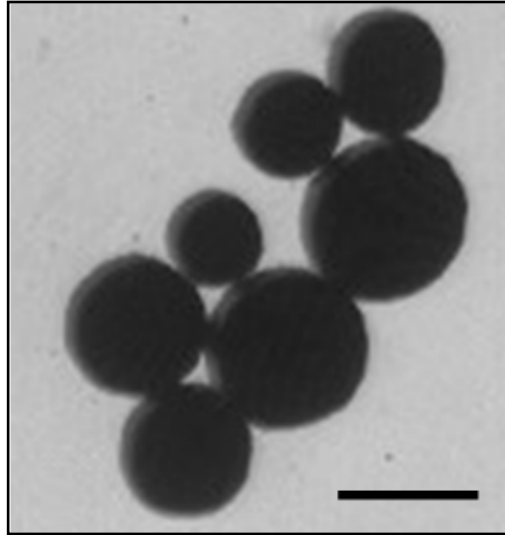


Figure 3. Transmission electron microscope (TEM) pictures of the carbonyl iron particles. Bar length: 500 nm.

Fig. 3 shows TEM pictures of the carbonyl iron particles obtained using the gravitational separation method. No particles with a diameter larger than 1 μm were found. Size measurements were performed on 100 particles, and a log-normal distribution was fitted to the data: as a result, the average diameter (\pm standard deviation) was estimated to be: 570 ± 160 nm. As observed in Fig. 3, the particles are almost spherical. Fig. 4 shows TEM, HRTEM (High-Resolution TEM) and SEM (Scanning Electron Microscope) pictures of the ethylcellulose particles obtained in the conditions producing the highest quality particles (a 1:3 weight ratio of NaSDS and PEG 4000, 8000 rpm mechanical stirring). The particles are spherical and

polydisperse with average diameter 280 ± 140 nm.

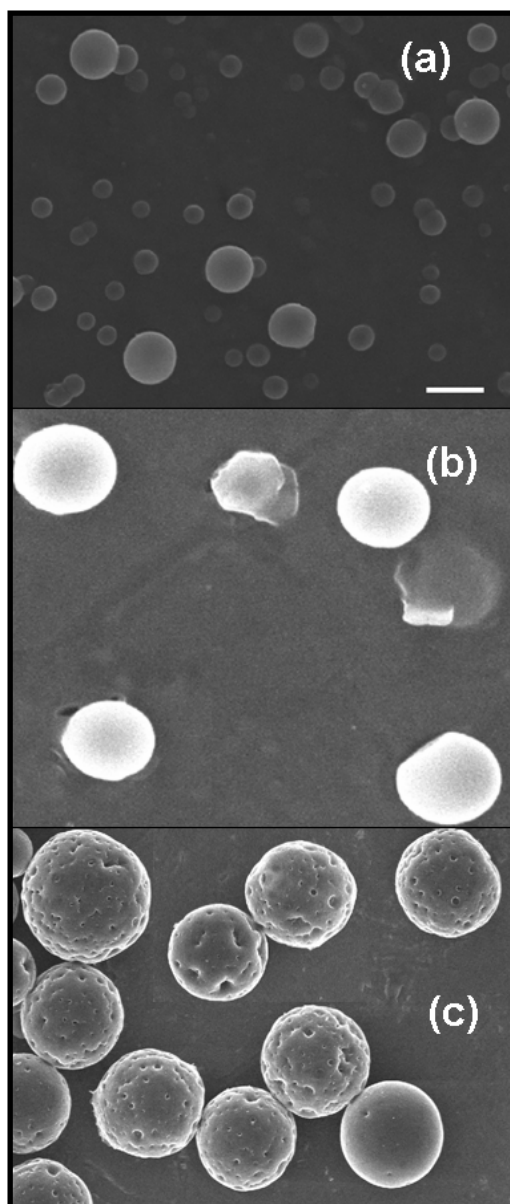


Figure 4. TEM (a), HRTEM (b) and SEM (c) pictures of the synthesized ethylcellulose particles. Bar length: 500 nm.

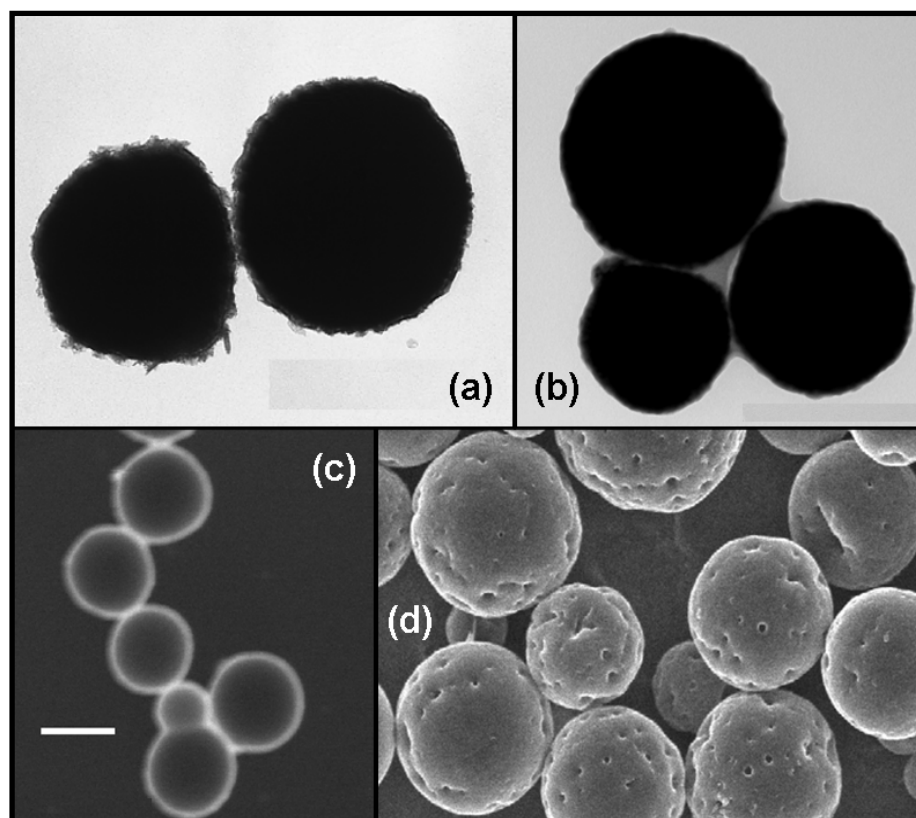


Figure 5. TEM (a), clear-field HRTEM (b), dark-field HRTEM (c), and SEM (d) pictures of the synthesized iron/ethylcellulose particles. Bar length: 500 nm

Similar observations of the composite particles (Figs. 5a, b) did not allow to identify clearly enough the polymer shell around the magnetic nuclei. On the contrary, dark-field HRTEM microphotographs of the mixed particles (Fig. 5c) made it possible to show that the carbonyl iron nuclei are covered by a polymeric shell ~ 20 nm thick. Following the same methodology described above for the

bare nuclei, we found that the average diameter (\pm standard deviation) of the core/shell nanoparticles was 620 ± 140 nm. Finally, SEM microphotographs were also obtained in order to investigate the surface texture of the three kinds of synthesized particles, with the aim of confirming the efficiency of the coverage. As can be seen in Fig. 5d, the morphology and surface of the mixed nanoparticles is identical to that of the pure polymer (Fig. 4c). This points out to a very efficient coating of the crystalline carbonyl iron by the polymeric shell

3.2. Specific surface area

The reduction in the surface area of the iron nuclei (1.72 ± 0.23 m²/g), when covered by the ethylcellulose latex, constitutes another proof of the coating efficiency. In fact, the specific surface areas of the ethylcellulose latex (0.79 ± 0.17 m²/g) and core/shell (0.86 ± 0.08 m²/g) particles is explained by the polymer layer hiding the iron nucleus, given that all the particles have similar sizes.

3.3. Chemical composition of the particles

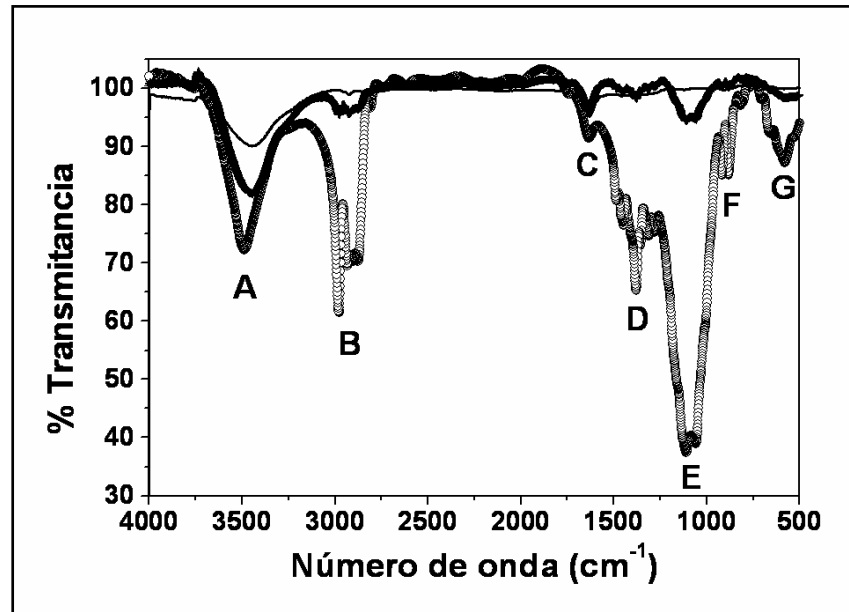


Figure 6. Infrared spectra of iron (-), ethylcellulose latex (o), and core/shell particles (+).

The most significant transmittance bands of the infrared spectra of the three types of particles (Fig. 6) have been identified by comparison with data by Silverstein and Webster (1998). It can be observed that all the polymer bands are present in the mixed particles spectrum, a clear indication that the shell observed in Fig. 5, corresponds indeed to an ethylcellulose coating. The small relative amount of latex in the composite sample is responsible for the reduction in the band intensity of the core/shell spectrum. The bands at 3489 cm^{-1} (A) and 1632 cm^{-1} (C) correspond to the moisture content

of the samples. The main groups identified are: (B) C-H stretching (2981 cm^{-1} and 2808 cm^{-1}); (D) C-H bending (1485 cm^{-1} and 1279 cm^{-1}); (E) C-O-C stretching (1109 cm^{-1} and 1057 cm^{-1}); (F) medium band characteristic of alkanes (918 cm^{-1} and 881 cm^{-1}); and finally, band G (579 cm^{-1}) indicate that the band E belongs to an ether group.

3.4. Magnetic Properties

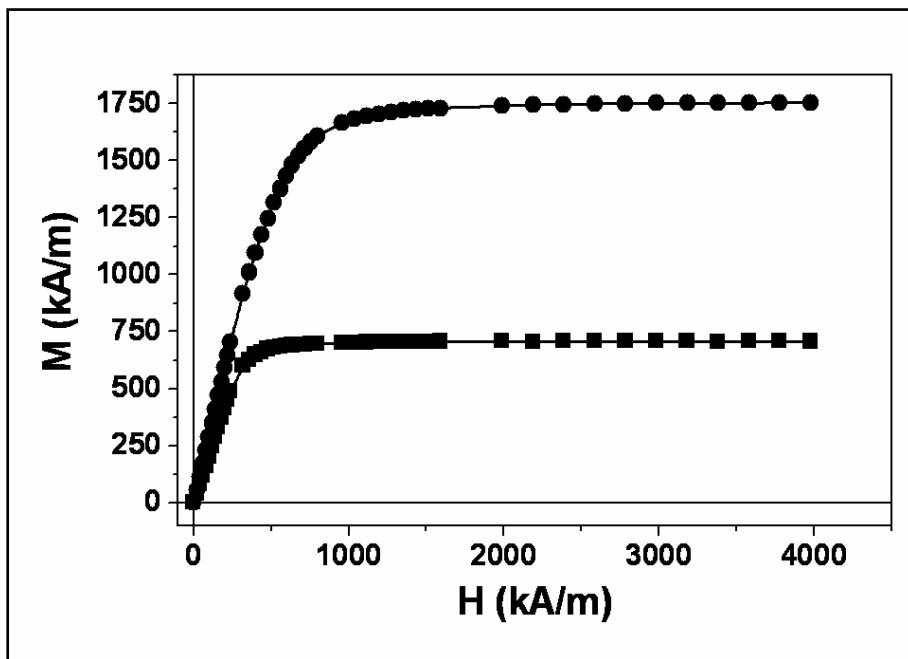


Figure 7. First magnetization curves (magnetization vs. magnetic field) for carbonyl iron (●) and composite particles (■).

We considered also of interest to analyze to what extent the

magnetic properties of the iron nuclei remain in the composites. Fig. 7 shows the first magnetization curves of pure iron and iron/ethylcellulose composites. Note how the polymer coating, although reduces the saturation magnetization M_S (because of the presence of non-magnetizable volume, so M_S (kA/m) = 1698 ± 5 for iron and 703.3 ± 0.3 for iron/polymer), leads to rather similar magnetic behaviors of both samples. Note that the value corresponding to the iron particles is close to published data obtained with 6 μm particles (Arias et al., 2006; Phulé et al., 1999). The initial susceptibility of the composite particles ($\chi_i = 9.1 \pm 0.1$) is also smaller in the core/shell material than in iron ($\chi_i = 22.1 \pm 0.2$).

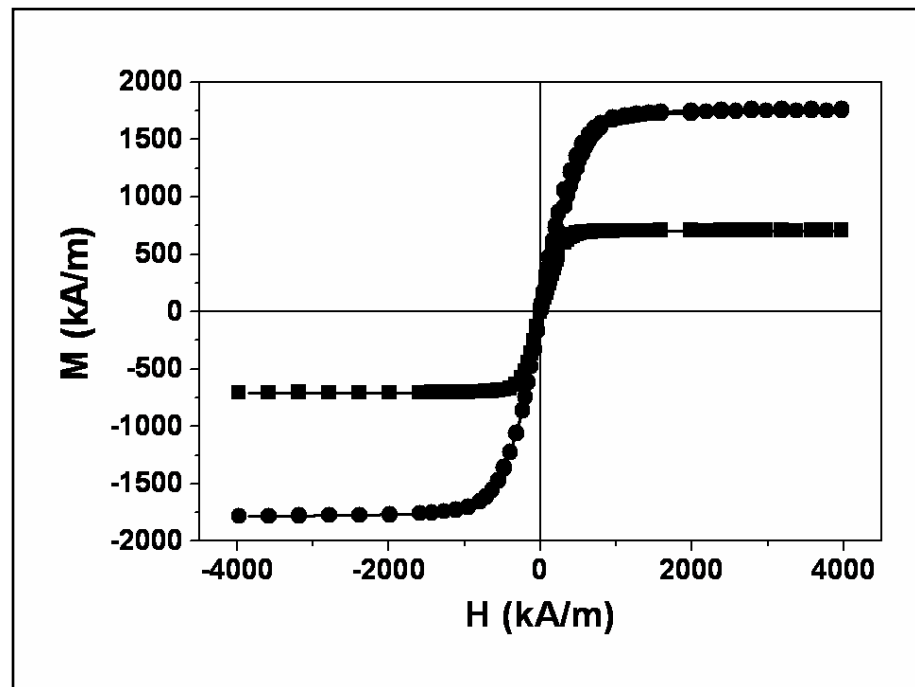


Figure 8. Magnetic hysteresis curves for carbonyl iron (●) and composite particles (■).

The hysteresis cycles of both the carbonyl iron nuclei and the mixed particles reveal their soft magnetic behavior (Fig. 8), and in fact the increasing and decreasing branches of the hysteresis cycles are hardly distinguishable, considering the sensitivity of our magnetometer. As previously observed (Arias et al., 2005, 2006; Ren et al., 2005), the magnetic behavior of composite nanoparticles is similar to that of the nuclei, except that the polymeric shell reduces the magnetization of the sample.

Finally, the response of composite particles to external magnetic fields was evaluated by optical microscopic inspection of an aqueous suspension under exposure to a magnetic field. As can be seen in Fig. 9, the initially homogeneous distribution of particles is strongly modified, and formation of chainlike aggregates parallel to the field lines is observed. This is due to the fact that the magnetic interaction represents a significant contribution over the DLVO colloidal interactions between core/shell particles (electrostatic van der Waals and hydration or acid-base), in spite of the presence of the polymer shell.

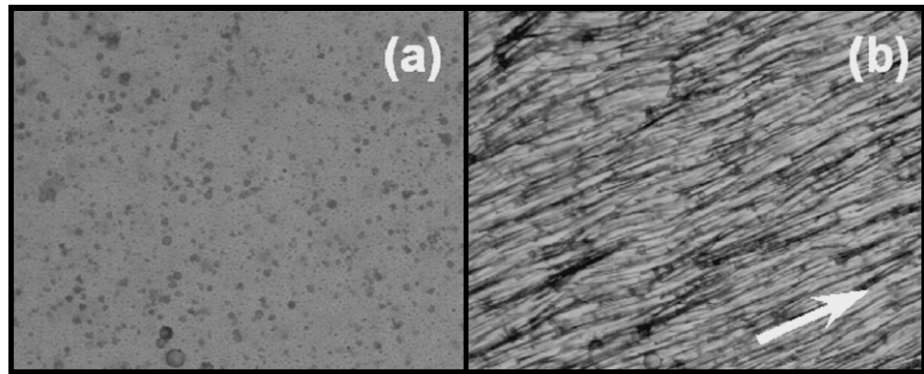


Figure 9. Optical microscope pictures (magnification 63×) of an aqueous suspension of coated particles in the absence (a) and presence (b) of a constant magnetic field (200 mT in the direction of the arrow).

3.5. Electrokinetic characterization

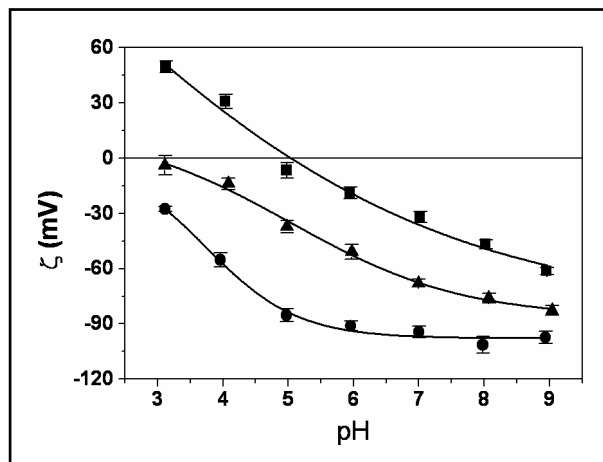


Figure 10. Zeta potential of carbonyl iron (■), ethylcellulose (●) and composite (▲) particles as a function of pH in the presence of 10^{-3} M NaNO_3 .

The conversion of the experimental electrophoretic mobility into zeta potential values was carried out using the theory of O'Brien and White (1978). The electrokinetic study was first focussed on the pH effect on the zeta potential, ζ , for the three kinds of particles in the presence of 10^{-3} M NaNO_3 (Fig. 10). Note that carbonyl iron particles show a well defined isoelectric point (pH_{iep} or pH of zero potential) close to $\text{pH} = 5$. The surface charge of this metal particles is originated at the metal/solution interface by the amphoteric thin oxide layer, whose formation cannot be avoided in oxidizing environments (Kallay et al., 1991; Plaza et al., 2002). Considering this value of the pH_{iep} , it can be expected that the iron particles will display a positive surface charge at the pH of the aqueous phase used in the synthesis of core/shell particles ($\text{pH} \approx 3$) (Matijević, 2002; Flesch et al., 2005).

However, ethylcellulose particles have a negative surface charge for the whole pH range studied and only at $\text{pH} < 3$, the zeta potential can approach a zero value. This behavior can be explained if we take into account the charge generation mechanism at the polymer/solution interface and the results obtained with Aquacoat[®], a latex similar to ethylcellulose (Gallardo et al., 1993; Vera et al., 1994, 1996). The generation of the negative surface charge is due to strong groups corresponding to dissociated end molecules of the sodium dodecyl sulfate used in the synthesis, that remain adsorbed on the particle surface even after the cleaning procedure. In addition, weak acid groups, presumably carboxylic, must be responsible for the pH-dependence of the surface charge (Gallardo et al., 2005).

This electrokinetic technique is a very useful tool for qualitatively checking the coating efficiency, due to the large differences between nuclei and polymer particle mobilities and zeta potentials. In fact, Fig. 10 clearly shows that the ζ -pH trends of mixed particles are dominated to a large extent by the latex shell. This must be a consequence of a suitable polymeric coating of Fe^0 , leading to composite particles which, from an electrokinetic point of view, are qualitatively similar to ethylcellulose.

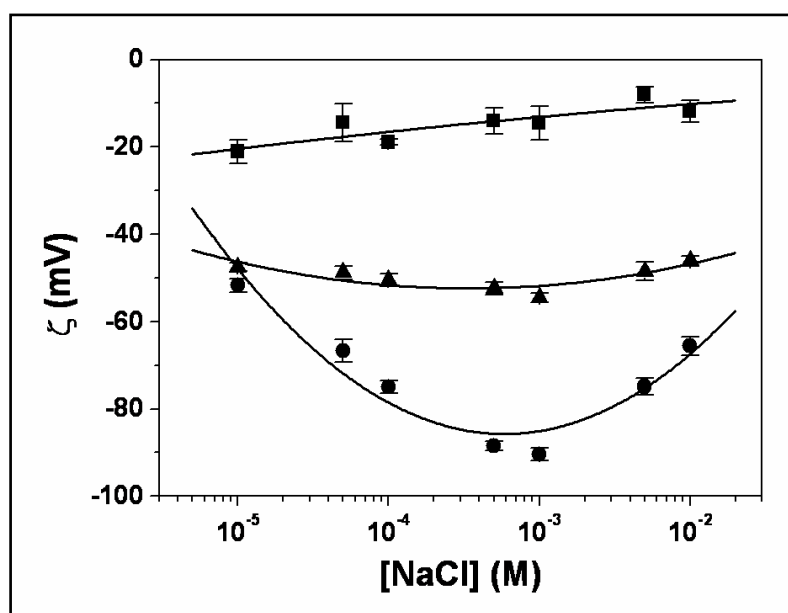


Figure 11. Zeta potential of carbonyl iron (■), ethylcellulose (●) and composite (▲) particles as a function of NaNO_3 molar concentration at a $\text{pH} = 5.5$.

We also measured ζ as a function of NaNO_3 concentration at a constant $\text{pH} = 5.5$, in order to confirm these results. This is shown in

Fig. 11 for the three kinds of particles. Note that the effect of NaNO_3 concentration on each of the particles is different, not only considering the average mobility values, but also the ζ -concentration trends. Fig. 11 shows that iron has the lowest $|\zeta|$ values, ethylcellulose the largest ones, and, as before, the composite particles yield intermediate zeta potentials, closer to those of the polymer than of the iron nuclei. This was expected considering the zeta potentials at pH 5.5 for the three colloidal systems (Fig. 10). Of a greater interest is the fact that $|\zeta|$ changes differently with the ionic strength: in the case of iron, a decrease in the absolute value of zeta potential is observed when NaNO_3 is increased, a consequence of the classical double-layer compression mechanism, in virtue of which the electric potential decreases faster with distance the larger the indifferent electrolyte concentration. However, the latex particles (and, to a lesser extent, also the composite ones) display a quite different trend: $|\zeta|$ goes through a maximum, so that only at high enough NaNO_3 concentration is the compression observed. Several explanations have been given to the initial increase of $|\zeta|$ with concentration, but it seems to be clear that this is a manifestation of stagnant-layer conductivity (Lyklema, 2002). This means electrical conduction (but not liquid motion) in the inner part of the double layer: ions flow tangentially to the particle, without dragging liquid, when a field is applied. As a consequence, the particle velocity is larger (the particle is less braked if the liquid flow against its motion is weaker) and leads to an apparently larger zeta potential. This effect is obviously less important if the diffuse region is richer in counterions (this will happen if the bulk concentration of ions is large enough), and the classical behavior is recovered at high NaNO_3 concentrations.

Electrokinetics can also help in elucidating the mechanisms through which the ethylcellulose layer is formed on the carbonyl iron surface: it is clear that an attractive electrostatic interaction will exist between the positively charged Fe^0 particles and the negatively charged polymer, at the acidic conditions in which the synthesis is performed (see Fig. 10). Because of this attraction, the vicinity of the carbonyl iron surface will be enriched in polymer species, negative at that pH range.

3.6. Surface thermodynamics

The analysis of the surface free energy components of the three types of particles was used to check the nature of the ethylcellulose coating. The contact angle data of the three probe liquids on particles pellets already suggest significant differences among the three types of nanoparticles (Table 1). But it is the evaluation of the γ_s components that provides a better physical characterization of their surface thermodynamics (Table 2).

Table 1. Contact angle θ (degrees) of the probe liquids indicated on carbonyl iron, ethylcellulose and carbonyl iron/ethylcellulose (core/shell) particles.

SOLID	LIQUID		
	WATER	FORMAMIDE	α -BROMONAFTALENE
CARBONYL IRON	27.9 ± 1.1	21.5 ± 0.7	16.7 ± 0.5
ETHYLCELLULOSE	65.3 ± 0.7	62.9 ± 0.8	30.1 ± 3.1
ETHYLCELLULOSE / FE ⁰	64.1 ± 1.3	60.3 ± 1.5	29.4 ± 1.2

Table 2. Surface free energy components of carbonyl iron, ethylcellulose and carbonyl iron/ethylcellulose (core/shell) particles.

γ_S^{LW} is the Lifshitz-van der Waals component; γ_S^+ (γ_S^-) is the electron-acceptor (electron-donor) component. All values in mJ/m^2 .

SOLID	γ_S^{LW}	γ_S^+	γ_S^-
CARBONYL IRON	41.8 ± 0.1	0.75 ± 0.01	45.4 ± 0.8
ETHYLCELLULOSE	37.9 ± 1.1	0.41 ± 0.05	26.7 ± 0.4
ETHYLCELLULOSE / FE ⁰	38.2 ± 0.4	0.22 ± 0.05	26.1 ± 0.6

As can be seen, whatever the component considered, its values for the mixed particles are similar to those for the bare latex (γ_S^+ is not suitable for the comparison, as it displays values close to zero in the three cases). In addition, γ_S^{LW} for the composite particles is almost the same as that of ethylcellulose, although this component is the least affected (as it is usually the case, see *e.g.* Plaza et al., 1998; Arias et al., 2001, 2006). However, γ_S^- shows large values in carbonyl iron, that is thus essentially a monopolar, electron-donor material. Its value of γ_S^- is larger than that found for either the polymer or the core/shell. This thermodynamic analysis agrees with the electrokinetic one in suggesting that sufficient coverage has been achieved, since the γ_S components of mixed particles coincide almost exactly with those corresponding to ethylcellulose.

These surface free energy changes manifest themselves in the hydrophobicity/hydrophilicity characteristics of the different materials. The evaluation of the free energy of interaction ΔG_{SLS} (not considering the electrostatic component) between the solid phases immersed in the liquid, can be used to check whether a material can be considered hydrophobic or hydrophilic (van Oss, 1994). This can be written, per unit area of interacting particles, as follows:

$$\Delta G_{SLS} = -2\gamma_{SL}^{TOT} \quad (4)$$

If this quantity is found to be negative, interfacial interactions will favor attraction of the particles to each other, and they are hence

considered hydrophobic. On the opposite case, hydrophilicity will correspondingly be associated to positive values of ΔG_{SLS}^{TOT} . As observed in Fig. 12, the hydrophilic nature of carbonyl iron is modified and the core becomes hydrophobic (just like the latex) when covered by ethylcellulose.

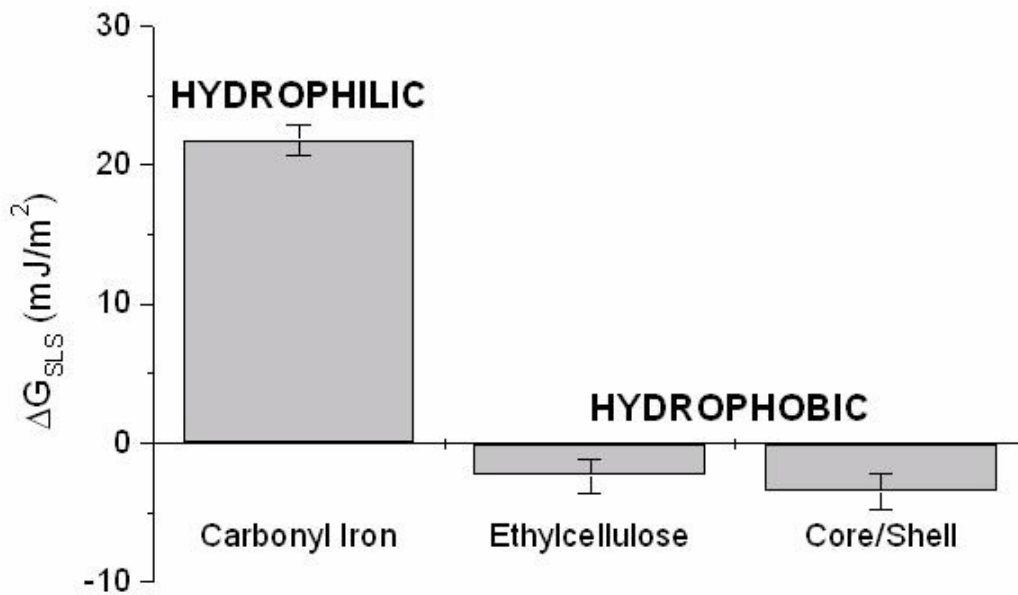


Figure 12. ΔG_{SLS} (solid-liquid interfacial energy of interaction) values and hydrophobicity/hydrophilicity of the three types of particles.

3.7. Drug loading

As mentioned, the capacity of the particles to load (either on the bulk or the surface) the drugs can be evaluated quantitatively by spectrophometric determination of the amount of drug remaining in

solution after contact or synthesis of the particles in the medium containing the active molecules. This requires a previous calibration of the absorbance of drug solutions of increasing concentrations and the estimation of the molar absorption coefficient. Fig. 13 shows the UV-Vis spectra of solutions of several concentrations of 5-FU, and Fig. 14 corresponds to diclofenac. As observed, in the case of 5-FU the low-concentration spectra display two absorbance maxima, but

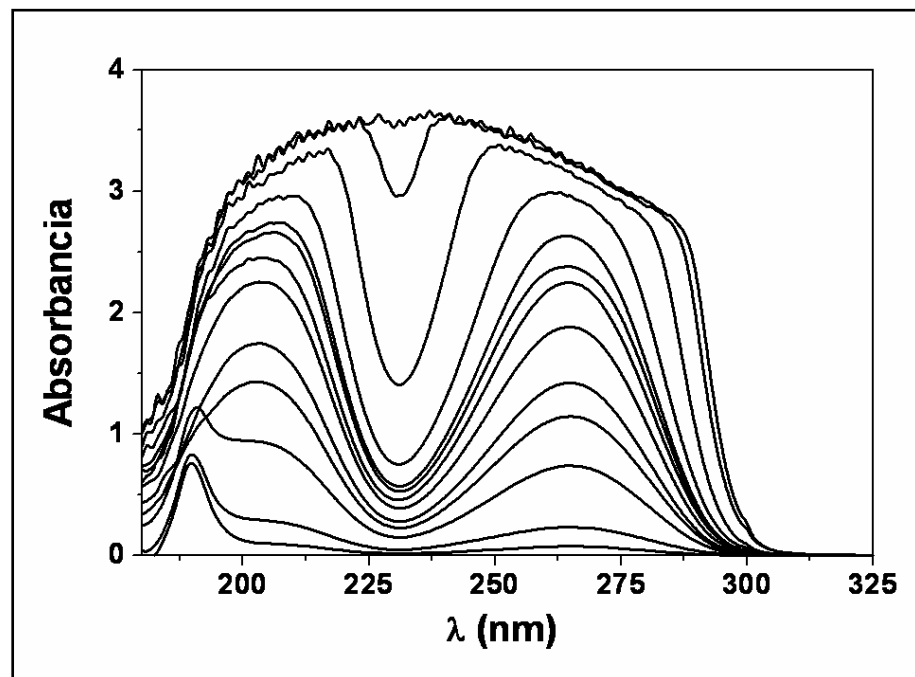


Figure 13. UV-Vis absorption spectra of aqueous solutions of 5-FU with molar concentrations (increasing from the bottom): 10^{-5} , $3 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$, $8.5 \cdot 10^{-5}$, 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3}$, 10^{-2} .

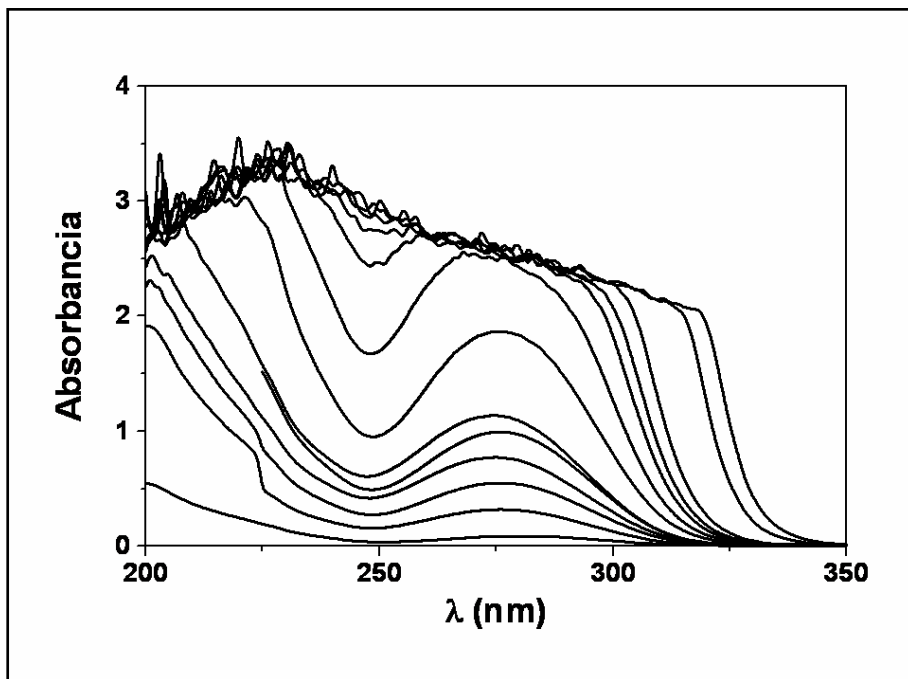


Figure 14. Same as Fig. 13, but for diclofenac solutions.

only the one at 266 nm wavelength remains unaltered in position and shape along most of the concentration range. However, even that peak changes shape, eventually leading to a flat band for high enough concentrations. This means that above 0.3 mM the solutions must be diluted in order to remain in the region where Beer's law might be applicable. Fig- 14 demonstrates that the situation is very similar with the anti-inflammatory drug: the wavelength that can be used for calibration is 276 nm, and the limiting concentration where linearity can be expected is around 0.2 mM.

The determination of the molar absorption coefficient, ϵ , was carried out by least-squares fitting of the absorbance-concentration

dependences in the respective concentration ranges of Beer's law validity. Figs. 15 and 16 show the linearity achieved and indicate that absorbance can be used in order to obtain concentration from absorbance. As a result of the fittings, the values of the molar absorption coefficients are obtained as follows: $\epsilon = 7720 \pm 180 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (5-FU, 266 nm) and $\epsilon = 9600 \pm 500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (diclofenac, 276 nm). Let us add here that in the Thesis we discuss the precision and accuracy of the method when applied to both drugs, although we skip the details in this summary for the sake of brevity.

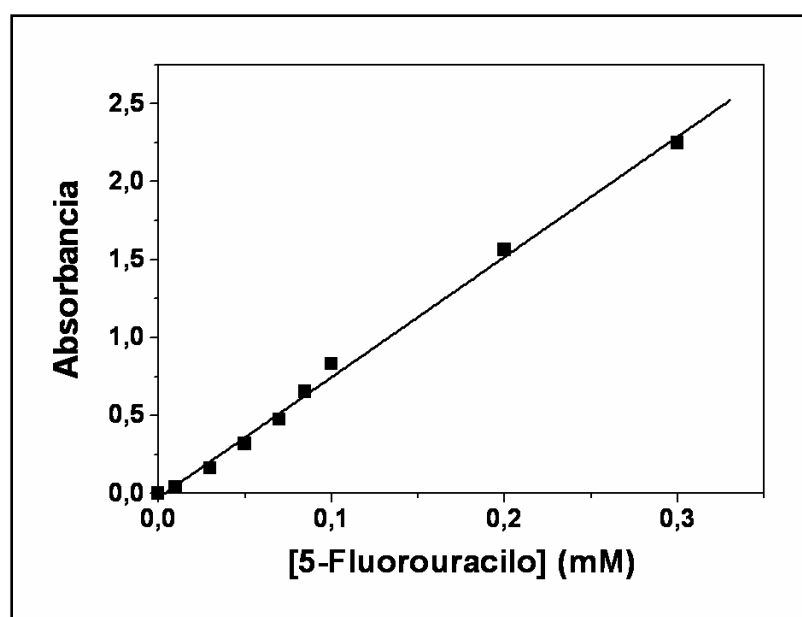


Figure 15. Plot of the absorbance-concentration data for 5-FU solutions.

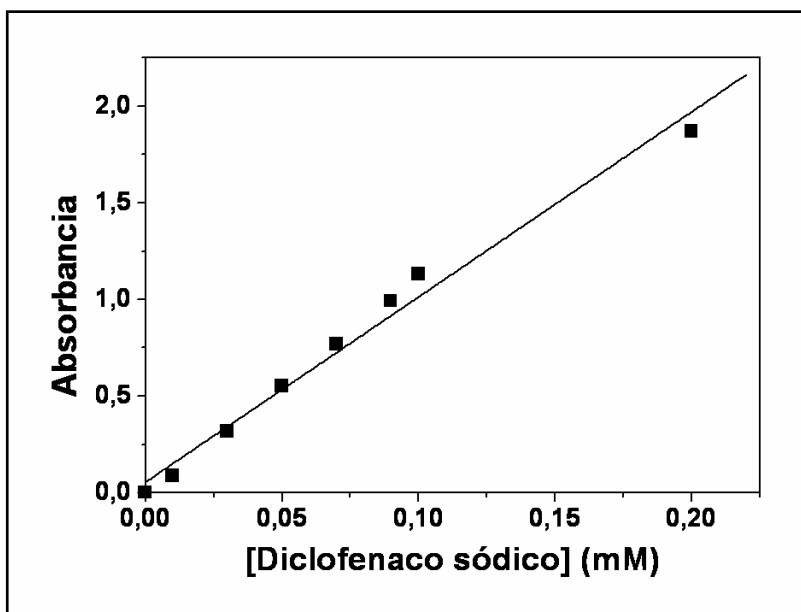


Figure 16. Plot of the absorbance-concentration data for diclofenac solutions.

SURFACE ADSORPTION OF 5-FU AND DICLOFENAC

With this knowledge, it is already possible to evaluate the capacity of surface and bulk loading of 5-FU and diclofenac by our particles. To begin with, we will describe our results concerning the surface adsorption of both drugs onto the three types of particles. The results are plotted in Figs. 17 (5-FU) and 18 (diclofenac). The results indicate that the adsorption isotherms are very similar in shape, differing in the absolute amounts incorporated by different particles and for the two drugs. Two facts are immediately clear from the comparison between the two Figures: the amount adsorbed is larger in the case of diclofenac, and, in both cases, similar for pure polymer and core/shell particles. The former result can be explained by considering the ionic

nature of diclofenac (recall that it is a sodium salt form). The similarity between polymer and coated particles is an interesting result that confirms that our composites have surfaces almost identical to those of ethylcellulose in the same conditions.

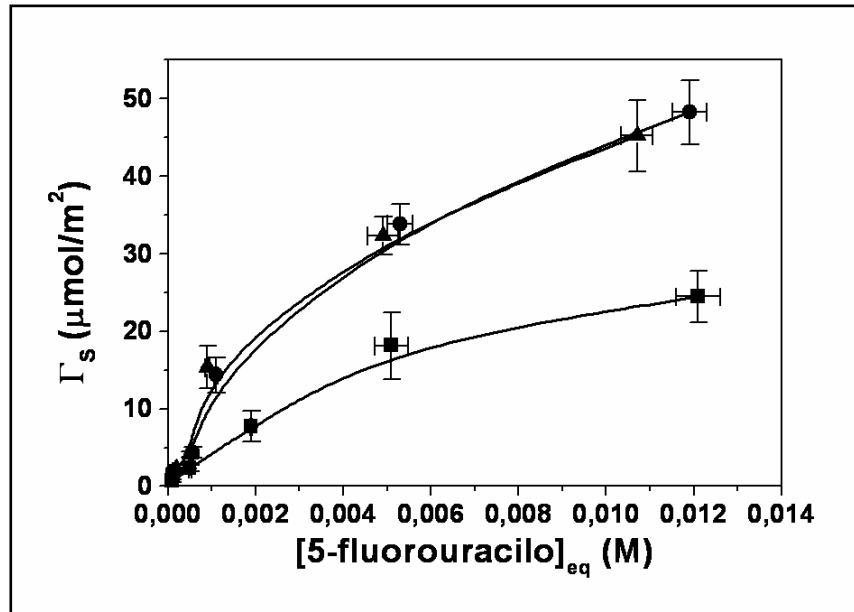


Figure 17. Surface adsorption density Γ_s of 5-FU onto carbonyl iron (■), ethylcellulose latex (●), and composite particles (▲), as a function of the equilibrium drug concentration.

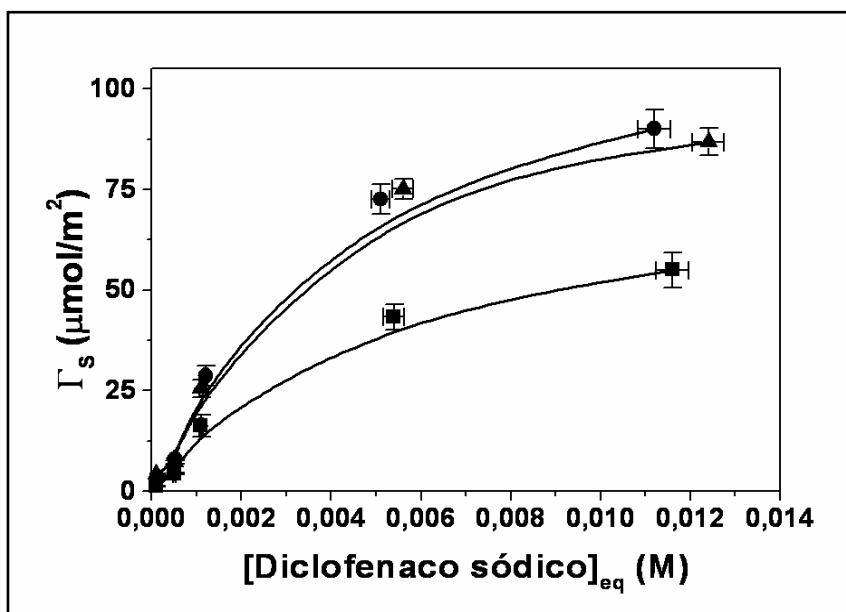


Figure 18. Same as Fig. 17, but for diclofenac.

In all the situations depicted in Figs. 17 and 18 it is clear that the increase in the concentration of drug in solution leads to larger adsorbed amounts, although a sort of saturation is suggested at high equilibrium concentrations. In fact, the results can be fitted to a Langmuir adsorption isotherm:

$$\Gamma_s = \frac{\Gamma_{\max} kC}{1 + kC} \quad (5)$$

where C is the equilibrium concentration, Γ_{\max} is the adsorbed amount corresponding to one monolayer coverage, and k is the dissociation constant of adsorption sites. The results of the fitted parameters are summarized on Table 3.

Table 3. Fitting parameters of the adsorption data in Figs. 17, 18 to the Langmuir equation (3) for the two drugs tested.

PARTICLES	5-FU adsorption parameters		Diclofenac adsorption parameters	
	Γ_{\max} ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	k (L/mol)	Γ_{\max} ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	k (L/mol)
CARBONYL IRON	35±3	34±1	71±3	75±6
ETHYLCELLULOSE	61±4	58±2	123±10	118±4
ETHYLCELLULOSE / Fe^0	64±5	60±2	118±10	113±4

It is clear that the loading capacities of the polymer and composite particles are larger than those of the iron cores; probably, the porous nature of the ethylcellulose surface (Figs. 4, 5) will help in explaining such difference. It can also be observed that the iron cores, although to a lesser extent, do adsorb both drugs in significant amounts. For that reason, all the experiments of bulk loading started by contacting the iron particles with the drug solutions.

ELECTROKINETIC FOLLOW-UP OF THE ADSORPTION

We have mentioned that electrokinetic techniques can be suited for the, at least qualitative, determination of the surface incorporation of chemical species able to change the zeta potential, either by surface charge modification (charged species adsorption), modifying the ionic strength (indifferent electrolyte in the medium) or by changing the slip plane position (polymer adsorption). In order to check for this possibilities in the case of our active principles, one can consider the

results plotted in Figs. 19 and 20, corresponding, respectively, to the effect of 5-FU and diclofenac concentrations on the electrophoretic mobility of the three kinds of particles investigated.

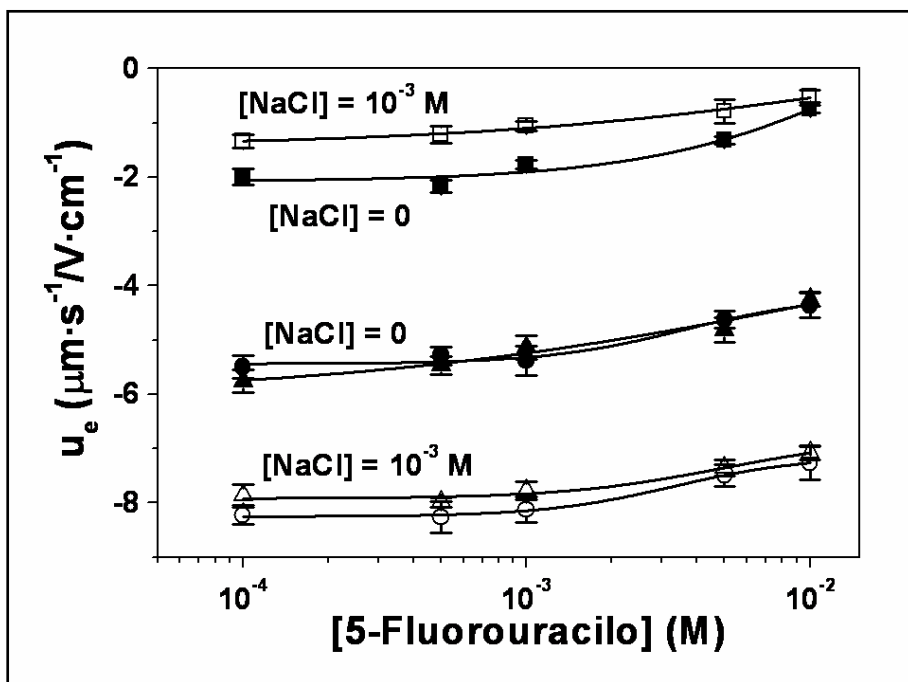


Figure 19. Electrophoretic mobility of iron cores (■, □), ethylcellulose latex (●, ○) and core/shell particles (▲, △) as a function of 5-FU concentration. Open symbols: 1 mM NaCl in solution; full symbols: no salt added.

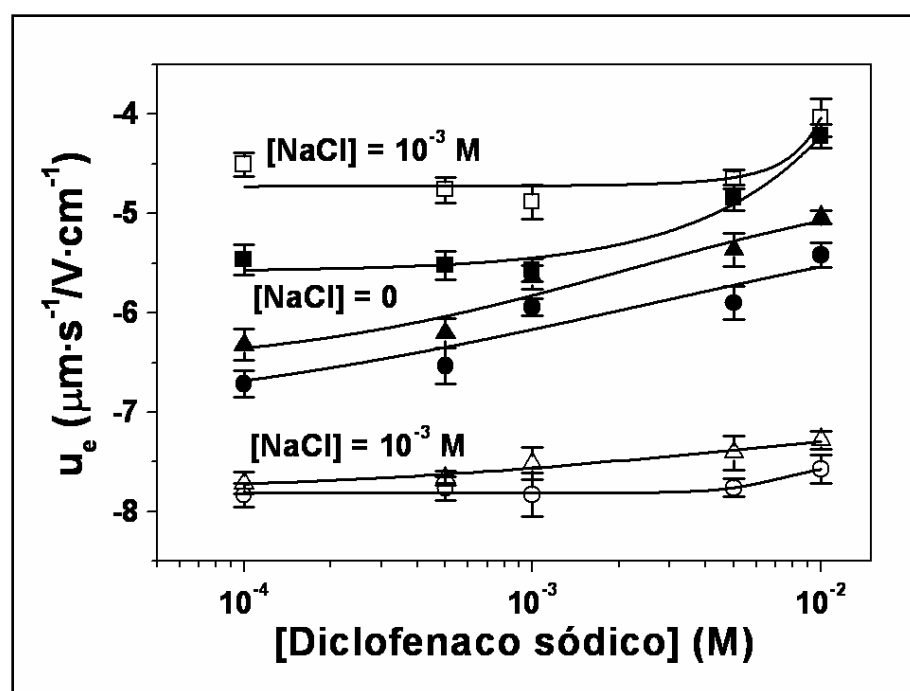


Figure 20. Same as Fig. 19, but for diclofenac.

Generally speaking, both drugs provoke a tendency of the mobility towards less negative values as their concentration is increased: in the case of 5-FU this must be a manifestation of drug adsorption, since some positive charge can be expected in the molecule, coming from protonization of its NH group. In the case of diclofenac, the main effect responsible for the trend observed in the mobility is probably double layer compression. This is justified by the fact that the active principle (recall that it is dissolved as sodium salt) must be negatively charged, and it must contribute to ionic strength changes to a larger extent than 5-FU.

BULK LOADING

We expected a much more significant loading in the bulk than in the surface, and this is interesting for the applications, as surface adsorption is in principle a more labile loading procedure. Our results (Figs. 21, 22) confirm this expectancy, and demonstrate that, although the qualitative trends of loading vs. concentration may be similar to those found for surface adsorption (in particular, the positive effect of drug concentration on loading, and the tendency to saturation; see also Arias et al., 2005, 2008a,b,c; Fawaz et al., 1997; Fontana et al., 1998; Losa et al., 1991; McCarron et al., 2000; Ubrich et al., 2004), the amounts absorbed in the bulk are much larger. Note the interesting result that our core/shell particles absorb both drugs better than the ethylcellulose latex alone: this confirms the positive effect of the iron cores on the overall loading. In addition, our vehicles demonstrate to be more efficient in 5-FU incorporation than others reported in the literature, from this and other groups (Arias et al., 2005, 2008b; Gulati et al., 1998; McCarron et al., 2000).

3.8. Drug release

This is the final step of our investigation: for the vehicles designed to be really useful, they must be able to release the loaded drugs at reasonable rates: one would expect that a several day term would be ideal, as the release could be gradual, and the patient might not be worried about dosage during that number of days.

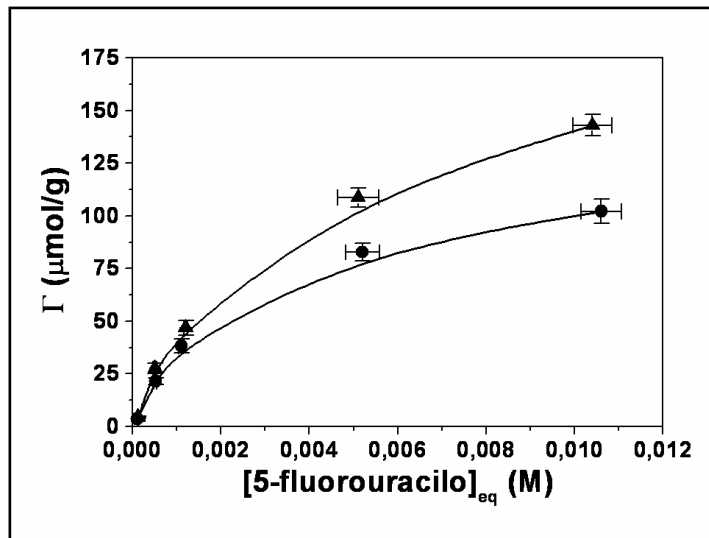


Figure 21. Bulk adsorption density of 5-FU by ethylcellulose latex (●) and core/shell particles (▲) as a function of drug concentration. The lines are guides to the eye

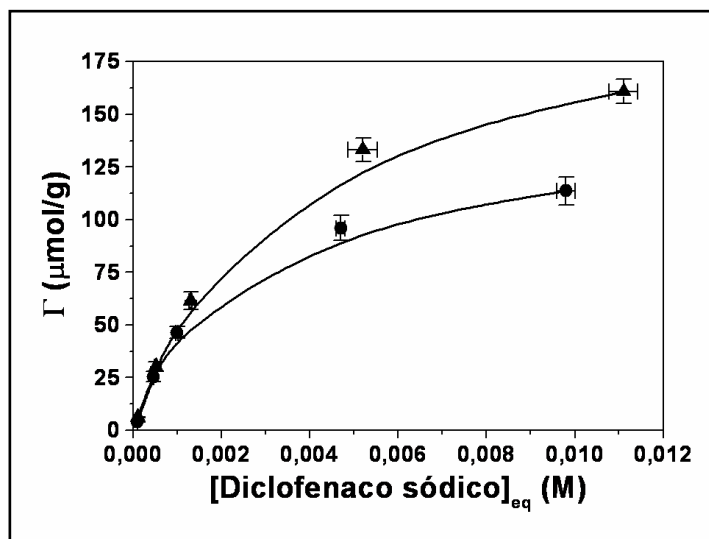


Figure 22. Same as Fig. 21, but for diclofenac.

The results in Figs. 23 (5-FU) and 24 (diclofenac) are rather satisfactory. In both cases we observe a biphasic release process (except in the case of diclofenac in etylcellulose: a single time was obtained in such case) , with a rapid liberation probably associated to drug adsorbed on the surface or weakly trapped in the surface pores, followed by a slower process. This is likely the result of diffusion of the drug through the polymer shell towards the surface (Chow et al., 1998; Lenaerts et al., 1984; Müller et al., 1992; Page et al., 1996; Yamada et al., 2001). The overall time for almost 100 % release is close to one day.

It is worth noting that the amount released is smaller and slower from the composite particles than from the bare latex ones. This can again be ascribed to the drug coming into solution from the core surface, a longer process considering the need to migrate through the whole thickness of the polymer coating. Finally, comparing the results for the two drugs, the release kinetics appears faster in the case of diclofenac, a result explained by its larger loading for the same conditions.

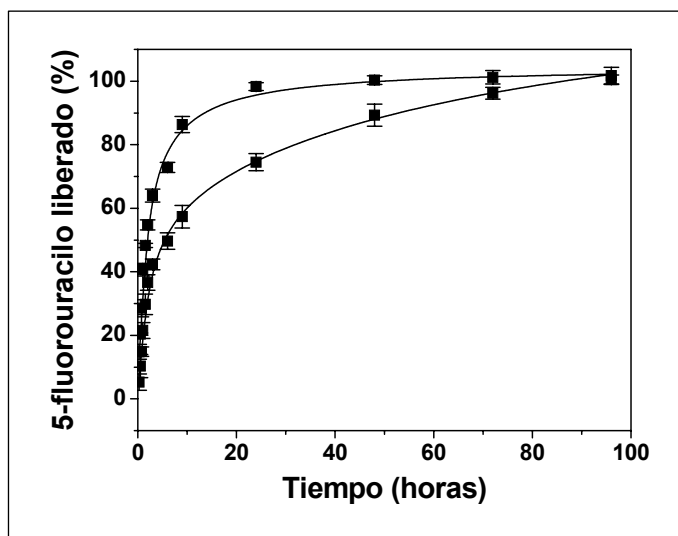


Figure 23. Percent 5-FU released by ethylcellulose latex (▲) and composite particles (■) as a function of the incubation of the particles in a NaOH-KH₂PO₄ buffer solution (pH = 7.4±0.1). The lines are the best fit to a logistic equation with two characteristic times.

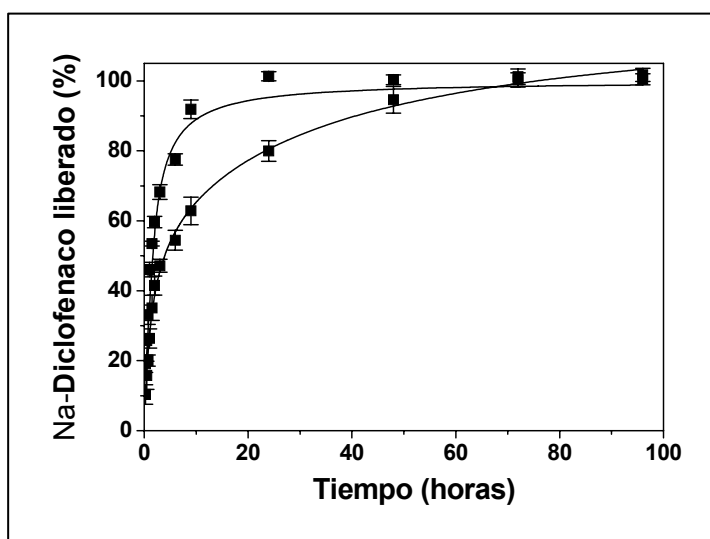


Figure 24. Same as Fig. 23, but for diclofenac. A single time was used in the case of the bare polymer particles.

4. Conclusions

The following is a summary of the main conclusions that can be drawn on the data presented concerning the synthesis and characterization of iron/ethylcellulose compound particles and their use as drug vehicles:

1. Concerning the synthesis of the particles:

- A procedure has been set up for the synthesis of spherical particles of a mixed composition, namely, iron core and biocompatible polymer (ethylcellulose) shell, suitable for being used as a magnetic drug vehicle for parenteral administration. Electron microscope pictures show that the particles are all spherical, and that ethylcellulose and iron/polymer particles have a porous surface.
- A thorough chemical analysis of the synthesized particles (including, for comparison, ethylcellulose latex spheres) has been carried out, including infrared and NMR techniques. The results demonstrate that the composite particles possess the functional groups of the polymer. In addition, the specific surface areas were found to be almost identical for the latex and the compound spheres.
- The magnetic characterization of the particles indicates that the core/shell system has sufficient magnetic response, with a magnetization saturation around one half that of pure iron. The resulting particles are soft ferromagnetic materials, as iron itself.

2. On the surface electric and magnetic properties of the particles:

- As desired, the polymer coating almost completely hides the metal core, and the electrophoretic mobility of the composites is very similar (particularly concerning its pH dependence) to that of the latex.
- The surface charge of iron (in fact, its surface oxide layer) displays a positive surface charge at pH below 5, while the polymer remains negative down to pH below 3. This provides a pH interval where the electrostatic attraction between core and polymer favors the coating.
- The surface thermodynamic analysis carried out (based on a model of interfacial interactions distinguishing between apolar or van der Waals, and polar or acid/base interfaces) demonstrates clearly the changes undergone by iron cores upon polymer coating. Specifically, the hydrophilic nature of carbonyl iron shifts to hydrophobic after producing the coating.

3. Concerning the application of the particles as drug vehicles:

- Using a validated spectrophotometric method, it has been possible to evaluate the loading capacity of the iron/ethylcellulose particles for two different drugs: the antitumor agent 5-fluorouracil, and the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. The method is based on determinations of the optical absorbance of solutions of the drug in the UV range. From the concentration range where

Beer's law is found to be valid it was possible to extract the molar absorption coefficient for the two active molecules.

- Both drugs are better incorporated to the bulk of the particles during their synthesis than by contact on already formed particles (surface adsorption). Nevertheless, the surface loading is not negligible, and, furthermore, a significant contribution to the drug loading by the composite particles is associated to the iron cores themselves. For this reason, the loading is better for the core/shell than for the bare polymer spheres.
- Our vehicles demonstrate to be more efficient in 5-FU incorporation than others reported in the literature. The maximum loadings are about 100 μmol per gram of particles in the case of 5-FU and 150 $\mu\text{mol/g}$ when the active principle is diclofenac.
- *In vitro* release experiments conducted on both drugs after bulk loading typically show a biphasic process: the faster rate occurs during the first few hours, and it is proposed that it corresponds to surface desorption. A slower release rate (time scale on the order of 20 hours) is associated to the diffusion from the polymer coating and from the drug adsorbed on the iron cores.
- Interestingly, the latter fact leads to a more sustained release in the case of the magnetic composites, making them even more suited for the sought design of a practical magnetic drug vehicle.

References

- ADAMSON, A.W., *Physical Chemistry of Surfaces*, 5th Ed., John Wiley & Sons, New York (1990)
- ARIAS, J.L., GALLARDO, V., GÓMEZ-LOPERA, S.A., PLAZA, R.C., DELGADO, A.V., *J. Control. Rel.*, 77, 309-321 (2001).
- ARIAS, J.L., GALLARDO, V., GÓMEZ-LOPERA, S.A., DELGADO, A.V., *J. Biomed. Nanotech.*, 1(2), 214-223 (2005).
- ARIAS, J.L., GALLARDO, V., LINARES-MOLINERO, F., DELGADO, A. V., *J. Colloid Interface Sci.*, 299, 599-607 (2006).
- ARIAS, J. L., GALLARDO, V., RUIZ, M. A., DELGADO, A. V., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 54 (2008a).
- ARIAS, J. L., LINARES-MOLINERO, F., GALLARDO, V., DELGADO, A. V., *Eur. J. Pharm. Sci.* 33, 252 (2008b).
- ARIAS, J. L., RUIZ, M. A., GALLARDO, V., DELGADO, A. V., *J. Control. Rel.* 125, 50 (2008c).
- COOKE, J.W.B., BRIGHT. R., COLEMAN, M. J., JENKINS, K. P., *Organic Process. Res. & Develop.* 5, 383-386 (2001).
- CHUA-ANUSORN, W., MACEY, D.J., WEBB, J., DE LA MOTTE HALL, P., ST. PIERRE, T.G., *Biomaterials*, 12, 103-113 (1999).
- DEMERLIS, C.C., SCHONEKER, D.R., BORZELLECA, J.F., *Food Chem Toxicol.*, 43(9), 1355-1364 (2005).
- DEVATHALI, S.D., GORDEUK, V.R., BRITTENHAM, G.M., BRAVO, J.R., HUGHES, M.A., KEATING, L.J., *Eur. J. Haematol.*, 46, 272-278 (1991).

DUBERNET, C., ROULAND, J.C., BENOIT, J.P., *Int. J. Pharm.*, 64 (2-3), 99-107 (1990).

DURÁN, J.D.G., ONTIVEROS, A., DELGADO, A.V., GONZÁLEZ-CABALLERO, F., CHIBOWSKI, E.J., *Adhesion Sci. Technol.*, 10, 847-868 (1996).

FAWAZ, F., GUYOT, M., LAGUENY, A. M., DEVISSAGUET, J., *Ph.*, *Int. J. Pharm.*, 154, 191 (1997).

FONTANA, G., PITARRESI, G., TOMARCHIO, V., CARLISI, B., SAN-BIAGIO, P. L., *Biomaterials* 19, 1009 (1998).

FLESCH, C., DELAITE, C., DUMAS, P., BOURGEAT-LAMI, E., DUGUET, E., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 42, 6011-6020 (2004).

FLESCH, C., BOURGEAT-LAMI, E., MORNET, S., DUGUET, E., DELAITE, C., DUMAS, P., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 43, 3221-3231 (2005).

GALLARDO, V., SALCEDO, J., VERA, P., DELGADO, A.V., *Colloid Polym. Sci.*, 271, 967-973 (1993).

GALLARDO, V., MORALES, M.E., RUIZ, M.A., DELGADO, A.V., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 26(2), 170-175 (2005).

GOODWIN, S., PETERSON, C., HOH, C., BITTNER, C., *J. Magn. Mater.*, 194, 132-139 (1999).

GRATTARD, N., PERNIN, M., MARTY, B., ROUDAUT, G., CHAMPION, D., LE MESTE, M., *J. Control. Rel.*, 84(3), 125-135 (2002).

- GULATI, M., GROVER, M., SINGH, S., SINGH, M., *Int. J. Pharm.* 165, 129 (1998).
- GUPTA, A.K., GUPTA, M., *Biomaterials*, 26, 3995-4021 (2005).
- HÄFELI, U.O., *Int. J. Pharm.*, 277(1-2), 19-24 (2004).
- HUEBERS, H.A., BRITTENHAM, G.M., CSIBA, E., FINCH, C.A., *J. Lab. Clin. Med.*, 108(5), 473-478 (1986).
- IBRAHIM, A., COUVREUR, P., ROLAND, M., SPEISER, P., *J. Pharm. Pharmacol.*, 35, 59-61 (1983).
- KALLAY, N., TORBIĆ, Ž., GOLIĆ, M., MATIJEVIĆ, E., *J. Phys. Chem.*, 95, 7028-7032 (1991).
- KATO, T., SATO, K., SASAKI, R., KAKINUMA, H., MORIYAMA, M., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 37, 289-296 (1996).
- LEMAIRE, L., ARELLANO, M., MALET-MARTINO, M.C., MARTINO, R., DE FORNI, M., *Bull. Cancer*, 81, 1057-1059 (1994).
- LOSA, C., CALVO, P., CASTRO, E., VILA-JATO, J. L., ALONSO, M. J., *J. Pharm. Pharmacol.* 43, 548 (1991).
- LÜBBE, A.S., BERGEMANN, C., RIESS, H., SCHRIEVER, F., REICHARDT, P., POSSINGER, K., MATTHIAS, M., DOERKEN, B., HERRMANN, F., GUERTLER, R., HOHENBERGER, P., HAAS, N., SOHR, R., SANDER, B., LEMKE, A.J., OHLENDORF, D., HUHNT, W., HUHN, D., *Cancer Res.*, 56(20), 4686-4693 (1996A).

LÜBBE, A.S., BERGEMANN, C., HUHNT, W., FRICKE, T.,
RIESS, H., BROCK, J.W., HUHNT, D., *Cancer Res.*, 56(20),
4694-4701(1996B).

LYKLEMA, J., The role of surface conduction in the development of
electrokinetics. In: Delgado, A.V. (Ed.), *Interfacial
Electrokinetics and Electrophoresis*, Marcel Dekker, New York,
pp. 87-98 (2002).

MAEDA, H., FANG, J., INUTSUKA, T., KITAMOTO, Y., *Int.
Immunopharmacol.*, 3, 319-328 (2003).

MARTINAC, A., FILIPOVIĆ-GRČIĆ, J., VOINOVICH, D.,
PERISSUTTI, B., FRANCESCHINIS, E., *Int. J. Pharm.*, 291(1-
2), 69-77 (2005).

MATIJEVIĆ, E., A critical review of the electrokinetics of
monodispersed inorganic colloids. In: Delgado, A.V. (Ed.),
Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis, Marcel Dekker,
New York, pp. 199-218 (2002).

McCARRON, P. A., WOOLFSON, A. D., KEATING, S. M., *J.
Pharm. Pharmacol.* 52, 1451 (2000).

MORALES, M.E., GALLARDO, V., CALPENA, A.C.,
DOMÉNECH, J., RUIZ, M.A., *J. Control. Rel.*, 95(1), 75-81
(2004).

MÜLLER R. H., LHERM C., HERBORT J., COUVREUR P., *Colloid
Polym. Sci.*, 269, 147 (1991).

O'BRIEN, R.W., WHITE, L.R., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*,
2(274), 1607-1626 (1978).

OKASSA, L.N., MARCHAIS, H., DOUZIECH-EYROLLES, L.,
COHEN-JONATHAN, S., SOUCÉ, M., DUBOIS, P.,

- CHOURPA, I., *Int. J. Pharm.*, 302, 187-196 (2005).
- OKON, E., POULIQUEN, D., OKON, P., KOVALEVA, Z.V., STEPANOVA, T.P., LAVIT, S.G., KUDRYAVTSEV, B.N., JALLET, P., *Lab. Invest.*, 71(6), 895-903 (1994).
- PANKHURST, Q.A., CONNOLLY, J., JONES, S.K., DOBSON, J., *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 36, R167-R181 (2003).
- PHULÉ, P.P., MIHALCIN, M.T., GENE, S., *J. Mater. Res.*, 14, 3037-3041 (1999).
- PLAZA, R.C., ZURITA, L., DURÁN, J.D.G., GONZÁLEZ-CABALLERO, F., DELGADO, A.V., *Langmuir*, 14, 6850-6854 (1998).
- PLAZA, R.C., ARIAS, J.L., ESPÍN, M., JIMÉNEZ, M.L., DELGADO, A.V., *J. Colloid Interf. Sci.*, 245, 86-90 (2002).
- REN, J., HONG, H.-Y., REN, T.-B., TENG, X.-R., *Mater. Lett.*, 59, 2655-2658 (2005).
- SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F.X., *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 6th Ed., John Wiley & Sons, New York (1998).
- SOPPIMATH K. S., AMINABHAVI T. M., KULKARNI A. R., RUDZINSKI W. E., 2001. *J. Control. Rel.*, 70, 1 (2001).
- TARTAJ, P., MORALES, M.P., VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S., GONZÁLEZ-CARREÑO, T., SERNA, C.J., *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 36, R182-R197 (2003).
- UBRICH, N., BOUILLOT, P., PELLERIN, C., HOFFMAN, M.,

- MAINCENT, P., *J. Control. Rel.*, 97(2), 291-300 (2004).
- VAN OSS, C.J., *Interfacial Forces in Aqueous Media*, Marcel Dekker Inc., New York (1994).
- VANDERHOFF, J.W., EL-AASSER, M.S., UGELSTAD, J., *Polymer Emulsification Process*. U.S. Patent No. 4,177,177, December 4, (1979).
- VERA, P., TALEB, A.B., SALCEDO, J., GALLARDO, V., *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 92(1-2), 169-173 (1994).
- VERA, P., GALLARDO, V., SALCEDO, J., DELGADO, A.V., *J. Colloid Interf. Sci.*, 177(2), 553-560 (1996).
- WHITTAKER, P., ALI, S.F., IMAM, S.F., DUNKEL, V.C., *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 36(3), 280-286 (2002).
- WU, P.-C., HUANG, Y.-B., CHANG, J.-I., TSAI, M.-J., TSAI, Y.-H., 2003. *Int. J. Pharm.*, 260, 115-121(2003).
- YAMADA, T., ONISHI, H., MACHIDA, Y., *J. Control. Rel.*, 75, 271-282 (2001).
- ZINUTTI, C., KEDZIEREWICZ, F., HOFFAMN, M., BENOIT, J.P., MAINCENT, P., *Int. J. Pharm.*, 133, 97-105 (1996).