



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

INTERACCIÓN DE UN TENSIOACTIVO BIOCOMPATIBLE CON
ESTRUCTURAS DE INTERÉS FARMACOLÓGICO

Benedini Luciano Alejandro

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2012

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de o Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 29 de Abril de 2008 y el 19 de Junio de 2012, bajo la dirección de Dr. Pablo Carlos Schulz de la Universidad Nacional del Sur y la Co-dirección del Dr. Santiago Daniel Palma de la Universidad Nacional de Córdoba.

Luciano Alejandro Benedini

Departamento de Química

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../.....,
mereciendo la calificación de:

Dedicada a...

Mariela, Renata y Maitena

Agradecimientos

Al Dr. Pablo Schulz, por abrirme las puertas de su laboratorio, brindarme sus vastos conocimientos de química coloidal y sus consejos.

Al Dr. Santiago Palma, por haber trabajado como surfactante entre la investigación básica y su aplicación en el campo farmacéutico.

A la Dra. Paula Messina por su apoyo incondicional, su amistad y compartir conmigo valiosas horas de laboratorio.

A la Dra. María Laura Fanani por haberme introducido al mundo de las monocapas con toda la pasión con la que le dedica todos los días.

Al Dr. Bruno Maggio por abrirme las puertas del CIQUIBIC y las de sus conocimientos desde un sentido muy humano.

A la Dra. Silvia Antollini por todo el tiempo que dedicó a enseñarme el mundo de los liposomas.

Al Dr. Marcelo Avena por facilitarme el uso del instrumental de su laboratorio.

Al departamento de Química y al laboratorio de fisicoquímica de la Universidad Nacional del Sur por brindarme el lugar físico donde se desarrollaron los trabajos de esta tesis y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por la otorgarme las becas de iniciación y perfeccionamiento que posibilitaron la realización de mis estudios de posgrado.

En forma muy especial a Mariela y a mis hijas, Renata y Maitena, por todo el tiempo que les quité para lograr este objetivo.

A mi vieja, la Dra. Graciela Alimenti, por sus consejos académicos y cotidianos, siempre desde el amor de una madre.

A mis hermanos, Mariela, Leonardo y Franco, por el amor, comprensión y tiempo que me han dedicado.

A mis Abuelos, la chola y el negro, por su cariño, malacrianza y apoyarme en todas las decisiones.

A mis tíos, Omar y Mónica y a mis primos Démian, Maia, Yadia, Jano, Traián y Xoana, por compartir cariñosa y pacientemente todo este proceso.

A mis parientes políticos, mis suegros María Isabel y Oscar y mis cuñadas, Eva y Verónica por el apoyo y comprensión de siempre.

A la Dra. Viviana Pedroni por su amistad, compañía y sus consejos.

A mis amigos de siempre, Roberto, Marcia, Hernán, José, Diego, Martín, Fernando porque toda la vida me apoyaron y creyeron en mí, cada uno desde su lugar.

A los “doctores de la vida”, Valeria, Carolina y especialmente a Marcos porque además de “doctorear” también compartimos experimentos y conocimientos.

A mis amigos de “la carrera de Farmacia”, Loreana y Noelia por brindarme su apoyo durante todo este proceso.

A Mauricio por su amistad, tiempo y los buenos momentos compartidos.

RESUMEN

En esta tesis se estudio tanto el comportamiento de palmitato de ascorbilo (Asc_{16}) en solución como en monocapas, además del comportamiento de amiodarona (AMI) en solución. Finalmente se desarrollaron liposomas con Asc_{16} y AMI.

Se describió el comportamiento de sistemas acuosos de Asc_{16} sin y con diferentes proporciones de polietilenglicol 400 (PEG_{400}). Se realizaron cuatro diagramas de fase usando calorimetría diferencial de barrido (CDB) y microscopia óptica de luz polarizada (MOP).

Estos sistemas por debajo de $\sim 0,48$ w/w muestran cristales hidratados en un líquido isotrópico, los cuales se transforman en un cristal líquido laminar cuando son calentados. Por encima de esta concentración aparece un cristal líquido cúbico antes del laminar.

Aplicando CDB fueron detectados dos tipos de agua diferente de la libre (“bulk”): el agua de la primera capa de hidratación, la cual no funde aunque puede ser inferida por CDB y una segunda capa de hidratación, cuyo número de moléculas de hidratación disminuye a medida que aumenta la concentración de surfactante.

Los sistemas de Asc_{16} con diferentes proporciones de PEG_{400} y agua muestran texturas similares a las del sistema Asc_{16} – agua. La adición de PEG_{400} al sistema acuoso cambia los límites de existencia de los dominios de cristales líquidos hacia menores temperaturas y concentraciones de surfactante. Todas las fases descritas en este trabajo además del comportamiento del agua en el sistema Asc_{16} – agua no habían sido informadas en bibliografía previamente.

El comportamiento superficial de Asc_{16} fue estudiado mediante monocapas de Langmuir (ML) y microscopia de ángulo de Brewster (BAM). Dependiendo de las condiciones de la subfase el Asc_{16} forma monocapas estables a temperatura ambiente las cuales muestran una transición de fase de líquido-expandido a líquido-condensado o a fase cristalina. Ambas fases condensadas muestran un crecimiento característico preferencial y pequeños dominios en forma de flores dependiendo de la densidad de carga.

La adsorción (AD) de Asc₁₆ en monocapas fosfolipídicas ha mostrado la formación de monocapas mixtas estables de Asc₁₆ y dimiristoilfosfolina (DMPC).

Estas tres técnicas (ML, BAM Y AD) no habían sido utilizadas en conjunto para describir el comportamiento bidimensional del Asc₁₆.

Sistemas acuosos de AMI a bajas concentraciones fueron estudiados por diferentes técnicas a diversas temperaturas. Se determinó el punto de Krafft (T_K). Se realizó un diagrama de fase parcial mostrando la dependencia de la concentración micelar crítica (*cmc*) con la temperatura; la solubilidad y mostrando una transición entre un coacervato y un gel inestable por debajo de la T_K en función de la temperatura. Este diagrama, con una comprensión de las estructuras formadas en las cercanías del punto de Krafft, no había sido informado anteriormente en la bibliografía.

Sistemas liposomales de DMPC con Asc₁₆ y de DMPC con Asc₁₆ y AMI fueron estudiados por diferentes técnicas: polarización generalizada (GP), tamaño de partícula y potencial zeta. La estabilidad de los liposomas fue analizada por medio de la teoría Derjaguin-Landau-Vervey-Overbeek (DLVO). Las determinaciones de GP mostraron que las tres diferentes concentraciones de Asc₁₆ usadas en los liposomas no perturbaron la organización de la membrana de DMPC. Además, una modificación de la teoría DLVO predijo la estabilidad de los liposomas. La adición de AMI a los liposomas de DMPC y Asc₁₆ no modificó significativamente el tamaño de los agregados. No se ha encontrado información bibliográfica acerca del uso de Asc₁₆ para prevenir los efectos adversos producidos por la AMI ni del desarrollo de liposomas con AMI y el Asc₁₆.

ABSTRACT

In this thesis both the behavior of ascorbyl palmitate (Asc_{16}) in solution and monolayers and the behavior of amiodarone (AMI) in solution were studied. Finally, liposomes with Asc_{16} and AMI were developed.

The behavior of aqueous systems of Asc_{16} with and without different proportions of polyethylene glycol 400 (PEG_{400}) were described. Differential scanning calorimetry (DSC) and polarizing microscopy (MOP) were both used to draw four phase diagrams.

The aqueous system below $C \sim 0.48$ w/w shows hydrated crystals in an isotropic liquid, which become a lamellar liquid crystal when heated. Above this concentration, a cubic liquid crystal appears before the lamellar mesophase.

Two different kind of water, other than bulk, using DSC was detected: a first hydration shell, which does not melt and is then undetectable though plausible to infer with DSC; and a second hydration layer. The number of water molecules of this shell decreases as the surfactant concentration increases.

Asc_{16} systems with different proportions of PEG_{400} and water show similar textures to those in the aqueous system. The addition of PEG_{400} to the Asc_{16} -water system shifts the limits of the liquid crystalline domains to lower temperature and surfactant concentration. Neither phases described in this work nor water behavior in Asc_{16} -water systems were found in the literature.

The surface behavior of Asc_{16} was studied by Langmuir monolayers (LM) and Brewster angle microscopy (BAM). Depending on subphase conditions Asc_{16} forms stable monolayers at room temperature and shows phase transition from a liquid-expanded to a liquid-condensed or a crystalline phase. Both condensed phases show preferential growth and small flowerlike domains depending on the charge density.

Adsorption (AD) of Asc_{16} in lipids monolayers have shown that stable mixed monolayers of Asc_{16} and DMPC that have been formed.

These three techniques (ML, BAM and AD) were not found to be previously used together to describe bidimensional behavior of Asc_{16} .

Low concentrations AMI aqueous systems by many techniques and at various temperatures was studied. The Krafft point (T_K) was determined. A partial phase diagram showing the critical micelle concentration (cmc) dependence on temperature,

the solubility and a transition between a coacervate and an unstable gel below T_K was drawn as a function of temperature. This diagram, with a comprehension of structures formed close to the Krafft point, was not previously reported in the literature.

Liposomes systems of DMPC with Asc₁₆ and DMPC with Asc₁₆ and AMI were studied by generalized polarization (GP), size particle and zeta potential determinations. Liposomes' stability was analyzed by means of the Derjaguin-Landau-Vervey-Overbeek (DLVO) theory. GP determinations shown that the three different concentrations of Asc₁₆ used in liposomes did not disturbed DMPC membrane organization. Furthermore, modified DLVO theory predicted liposomes' stability. The addition of AMI to the liposomes of DMPC plus Asc₁₆ did not significantly affect the aggregates' size. Literature reports about either the use of Asc₁₆ to prevent adverse effects produced by AMI or the development of liposomes with AMI and the Asc₁₆ were not found.

Índice

	Página
Prefacio	i
Agradecimientos	ii
Resumen	iv
Abstract	vi
Objetivo	1

Capítulo 1: Introducción

1.1 Introducción	2
1.2 Moléculas de Interés Farmacéutico	3
<i>1.2.1 Principio Activo</i>	3
<i>1.2.2 Excipientes</i>	4
<i>1.2.3 Excipientes Farmacéuticos - Principios Activos: Propiedades Tensioactivas</i>	6
<i>1.2.4 Utilización de Tensioactivos en Tecnología Farmacéutica</i>	6
1.3 Estructuras de Interés Farmacéutico Estudiadas: Cristales Líquidos y Liposomas	8
<i>1.3.1 Cristales Líquidos (CL) como Forma Farmacéutica</i>	8
<i>1.3.2 Liposomas (LPS) como Forma Farmacéutica</i>	9
1.4 Moléculas de interés farmacéutico estudiadas: Asc₁₆ y AMI	11
<i>1.4.1 Tensioactivo Biocompatible Derivado de Vitamina C, Palmitato de Ascorbilo (Asc₁₆)</i>	11
<i>1.4.2 Molécula de Interés Farmacológico, Amiodarona (AMI)</i>	12
1.5 Referencias del Capítulo	14

Capítulo 2: Consideraciones Generales de los Sistemas Coloidales

2.1 Dispersiones Coloidales.....	16
2.1.1 <i>Sistemas Dispersos.....</i>	16
2.2 Tensioactivos.....	17
2.2.1 <i>Estructura Química de los Tensioactivos.....</i>	19
2.2.1.1 <i>Tensioactivos Aniónicos.....</i>	19
2.2.1.2 <i>Tensioactivos Cationicos.....</i>	20
2.2.1.3 <i>Tensioactivos Anfotéricos.....</i>	21
2.2.1.4 <i>Tensioactivos Zwitteriónicos.....</i>	21
2.2.1.5 <i>Tensioactivos no Iónicos.....</i>	21
2.2.2 <i>Propiedades de los Tensioactivos.....</i>	22
2.2.2.1 <i>Reducción de la Tensión Superficial e Interfacial.....</i>	23
2.2.2.2 <i>Agregación de los Tensioactivos: Estructuras Formadas.....</i>	24
2.3 Mesofases en Sistemas con Tensioactivos.....	27
2.3.1 <i>Mesofases Termotrópicas.....</i>	27
2.3.2 <i>Mesofases Liotrópicas.....</i>	28
2.4 Liposomas.....	33
2.5 Diagramas de Fase de Sistemas con Tensioactivos.....	36
2.6 Referencias del Capítulo.....	39

Capítulo 3: Comportamiento de Fase del Palmitato de Ascorbilo (Asc₁₆) en Solución.

3.1 Introducción.....	41
3.2 Consideraciones Generales.....	42
3.2.1 <i>Consideraciones Generales del Palmitato de Ascorbilo (Asc₁₆)</i>	42
3.2.2 <i>Consideraciones Generales del Polietilenglicol 400 (PEG₄₀₀).....</i>	45
3.3 Objetivo.....	47
3.4 Experimental.....	48

3.4.1. <i>Materiales</i>	48
3.4.2. <i>Métodos</i>	48
3.4.2.1 <i>Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)</i>	49
3.4.2.1.1 <i>Procedimiento Realizado para Cada Corrida de CDB</i>	50
3.4.2.2 <i>Microscopía Óptica de Luz Polarizada (MOP) con Platina de Calentamiento</i>	51
3.4.2.3 <i>Conductividad</i>	51
3.4.2.4 <i>Espectroscopia ultravioleta- visible (UV)</i>	51
3.5 <i>Resultados y discusión</i>	53
3.5.1 <i>Sistema Asc₁₆-Agua</i>	53
3.5.1.1 <i>Diagrama de Fases del Sistema Asc₁₆-Agua</i>	54
a) <i>Análisis en el Intervalo de Temperaturas entre 60° C y 90° C</i>	55
a.1) <i>Construcción e Interpretación del Diagrama de Fase</i>	56
a.2) <i>Análisis Complementario de las Microfotografías del Sistema Asc₁₆-agua por Debajo de 0,5 de Fracción en Masa</i>	61
a.3) <i>Análisis Complementario de las Microfotografías del Sistema Asc₁₆-agua por Encima de 0,5 de Fracción en Masa</i>	63
a.4) <i>Verificación por Conductividad y UV de Algunas de las Temperaturas de Transición Determinadas por CDB</i>	64
b) <i>Análisis de la Región Próxima a 0° C</i>	67
b.1) <i>Determinación de los Estados del Agua en el Sistema Asc₁₆-Agua por CDB</i>	67
3.5.2 <i>Sistemas de Asc₁₆ en Diferentes Soluciones Acuosas de PEG₄₀₀</i>	77
3.5.2.1 <i>Diagramas de Fase</i>	78
a) <i>Diagrama de Fase del Sistema Asc₁₆ / 75% Agua - 25% PEG₄₀₀</i>	78
b) <i>Diagrama de Fase del Sistema Asc₁₆ / 50 % Agua - 50 % PEG₄₀₀</i>	88
c) <i>Diagrama de Fase del Sistema Asc₁₆ / 25% Agua - 75% PEG₄₀₀</i>	95
3.6 <i>Conclusiones del Capítulo</i>	102
3.7 <i>Referencias del Capítulo</i>	104

Capítulo 4: Comportamiento de Fase de Asc₁₆ en Monocapas de Langmuir y su Adsorción en Monocapas con Fosfolípidos.

4.1	Introducción.....	106
4.1.1	<i>Consideraciones de los fosfolípidos utilizados.....</i>	108
4.2	Objetivo.....	111
4.3	Experimental.....	112
4.3.1	<i>Materiales.....</i>	112
4.3.2	<i>Métodos.....</i>	112
4.3.2.1	<i>Isotermas de Compresión: Presión Superficial-Área Molecular.....</i>	113
4.3.2.2	<i>Medidas de BAM.....</i>	114
4.3.2.3	<i>Mediciones de Potencial Superficial.....</i>	115
4.3.2.4	<i>Estado de Ionización del Asc₁₆ en Función del pH de la Subfase.....</i>	115
4.3.2.5	<i>Adsorción de Asc₁₆ a Monocapas de Fosfolípidos.....</i>	116
4.4	Resultados y discusión.....	118
4.4.1	<i>Dependencia de la Temperatura en el Comportamiento de Fase de Monocapas de Asc₁₆.....</i>	118
4.4.2	<i>Cálculo de la Fracción de Disociación de Monocapas de Asc₁₆ como Función del pH de la Subfase y la Concentración Salina.....</i>	121
4.4.3	<i>Fase y Topografía de la Monocapa de Asc₁₆ como Función del pH de la Subfase y de la Concentración Salina.....</i>	122
4.4.4	<i>Cálculo del Potencial Superficial y Momento Dipolar Perpendicular.....</i>	126
4.4.5	<i>Adsorción de Asc₁₆ en Interfases con y sin Fosfolípidos.....</i>	129
4.5	Conclusiones del Capítulo.....	134
4.6	Referencias del Capítulo.....	136

Capítulo 5: Comportamiento de Fase de Moléculas Terapéuticamente Activas con Propiedades de Agregación.

5.1	Introducción.....	138
------------	--------------------------	------------

5.1.1 Consideraciones generales de la Amiodarona (AMI).....	139
5.2 Objetivo.....	143
5.3 Experimental.....	144
5.3.1. Materiales.....	144
5.3.2 Métodos.....	144
5.3.2.1 Determinación de cmc por Conductividad.....	144
5.3.2.2 Determinación de la Solubilidad por Conductividad.....	144
5.3.2.3 Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM).....	145
5.3.2.4 Determinación del Número de Agregación.....	145
5.3.2.5 Medidas de pH.....	146
5.3.2.6 Electrodo Selectivo de Ión Cloruro.....	147
5.3.2.7 Viscosidad.....	147
5.3.2.8 Microscopía Óptica de Luz Polarizada (MOP) con Platina de Calentamiento.....	147
5.4 Resultados y discusión.....	149
5.4.1 Determinación de cmc y Solubilidad por Conductividad.....	150
5.4.2 Microfotografías TEM.....	152
5.4.3 Determinación del Número de Agregación por Fluorescencia.....	153
5.4.4 Medidas de pH y con Electrodo Selectivo de Iones Cloruro.....	154
5.4.5 Medidas de Viscosidad.....	158
5.4.6 Microscopía Óptica de Luz Polarizada (MOP) con Platina Calefaccionada.....	159
5.4.7 Diagrama de Fases.....	161
5.4.8 Termodinámica de la Micelización.....	163
5.5 Conclusiones del Capítulo.....	166
5.6 Referencias del Capítulo.....	167

Capítulo 6: Liposomas de DMPC con Asc₁₆ y AMI

6.1 Introducción.....	170
6.2 Objetivo.....	174
6.3 Experimental.....	175

6.3.1 Materiales.....	175
6.3.2 Métodos.....	175
6.3.2.1 Preparación de Liposomas.....	175
6.3.2.2 Polarización Generalizada.....	176
6.3.2.3 Medición del Tamaño de Partícula y Potencial Zeta.....	178
6.3.2.4 Predicción de la Estabilidad por DLVO.....	182
6.4 Resultados y Discusión.....	184
6.4.1 Liposomas de DMPC con Asc ₁₆ y de DMPC con Asc ₁₆ y AMI.....	184
6.4.2 Estado Biofísico de las Membranas de los Liposomas de DMPC con Asc ₁₆ por Polarización Generalizada.....	185
6.4.3 Estado Biofísico de las Membranas de los Liposomas de DMPC con Asc ₁₆ y AMI por Polarización Generalizada.....	186
6.4.4 Medidas de Potencial Zeta y Tamaño de Partícula para Liposomas de DMPC con Asc ₁₆ y de DMPC con Asc ₁₆ y AMI.....	189
6.4.5 Estudio de la Estabilidad de Liposomas por DLVO.....	191
6.5 Conclusiones del Capítulo.....	200
6.6 Referencias del Capítulo.....	201

Capítulo 7: Conclusiones Generales.....	204
--	------------

Capítulo 8: Perspectivas.....	206
--------------------------------------	------------

Capítulo 9: Publicaciones.....	209
---------------------------------------	------------

Objetivo

El objetivo se enfoca en estudiar las propiedades de agregación del tensioactivo biocompatible, palmitato de ascorbilo (Asc_{16}), en soluciones acuosas y en monocapas aire-solución. Conjuntamente evaluar las características de agregación del principio activo, amiodarona (AMI) en solución acuosa y a partir de esta información desarrollar estructuras de interés farmacéutico, los liposomas, de manera de vehicular a estos compuestos.

.

.

Capítulo 1

Introducción

1.1 Introducción

El desarrollo de un medicamento conlleva varias etapas: (i) obtener un *principio activo* de comprobada seguridad, (ii) encontrar *excipientes* confiables e (iii) implementar la *tecnología* necesaria para llevar a cabo el sistema de dosificación requerido. Todo esto debe funcionar bajo estrictos controles que garanticen una correcta formulación.

Durante mucho tiempo se ha puesto énfasis en el desarrollo de nuevas moléculas, como alternativa a la falta de respuesta terapéutica que poseen algunos medicamentos. Sin embargo, no todo el efecto terapéutico recae en la molécula seleccionada para el tratamiento de una dolencia, sino también, en la forma en que se distribuye, es decir, depende también del sistema transportador del principio activo o la forma farmacéutica.

Esta última, no es menos importante, debido a que si el sistema no libera a la droga desde su matriz, en el momento y lugar adecuado, no se llegará a cumplir el efecto para el cual la molécula activa fue diseñada.

Existen numerosas formas farmacéuticas en el mercado y otras tantas en creciente desarrollo. Muchas de estas formas están basadas en *sistemas dispersos* y son utilizadas para transportar drogas por múltiples vías de administración como las orales, tópicas y

pulmonares, entre otras. Dentro de los sistemas dispersos existe un grupo de gran importancia en el diseño de las formulaciones farmacéuticas que son los *sistemas coloidales*.

No solamente la forma farmacéutica terminada puede ser un sistema de este tipo, sino que durante el proceso de elaboración puede haber un paso importante en el cual el sistema resulte coloidal por más que la forma final termine no siéndolo. Es decir, se puede formar un sistema coloidal durante el proceso de manufactura de una formulación pudiendo ser el paso crucial en el desarrollo farmacéutico del producto. Un ejemplo de estos sistemas se presenta en la referencia [1] donde se describe el uso de glicéridos monoinsaturados para la realización de formas farmacéuticas inyectables.

Por lo expuesto, las investigaciones de la *química coloidal* en el campo farmacéutico son una pieza clave para llevar a cabo el desarrollo de una formulación.

1.2 Moléculas de Interés Farmacéutico

En el desarrollo de este trabajo de tesis se estudiaron comportamiento, interacciones y propiedades fisicoquímicas de un principio activo, la *amiodarona* (AMI) y un excipiente farmacéutico, el *palmitato de ascorbilo* (Asc₁₆). Por lo tanto, se definirá en esta sección: principio activo y excipiente.

1.2.1 Principio Activo

Según la Farmacopea Nacional Argentina (FNA) en su 7° edición del año 2003 [2] define al principio activo o droga farmacéutica “*como toda sustancia química o mezclas de sustancias relacionadas, de origen natural o sintético, que poseyendo un efecto farmacológico específico, se emplea en medicina humana*”.

Muchas veces se considera al principio activo solamente como el responsable del efecto farmacológico y se dejan de lado propiedades químicas de utilidad como agregación y formación de cristales líquidos, entre otras.

Existen principios activos que pueden comportarse como tensioactivos y evidenciar propiedades de agregación bajo determinadas condiciones. Estas características hacen que las drogas puedan cumplir simultáneamente el rol de principio activo y de excipiente (ver sección 1.2.2). Un ejemplo característico, como se detallará posteriormente, es la amiodarona (AMI) que es un principio activo con características tensioactivas.

1.2.2 Excipientes

La definición de la FNA en su 7º edición [2], proporciona una buena idea a priori de lo que debe ser un excipiente:

“Es toda sustancia de origen natural o sintético presente en una preparación farmacéutica incorporada sin propósito terapéutico”. Sin embargo, para tener un concepto más profundo se debe hacer referencia a la definición dada por el IPEC (International Pharmaceutical Excipients Council) definiéndose de la siguiente manera:

“Es cualquier sustancia diferente del principio activo o prodroga que ha sido apropiadamente evaluada en cuanto a seguridad y que está incluida en un sistema de liberación de droga para:

- *Ayudar al procesamiento del sistema durante la fabricación.*
- *Proteger, favorecer o aumentar la estabilidad o biodisponibilidad del principio activo.*
- *Favorecer la aceptabilidad del paciente.*
- *Ayudar en la identificación del producto.*
- *Proveer cualquier otro atributo de la seguridad global y efectividad del producto-droga entero durante el almacenamiento y el uso”.*

En un principio, se consideraban a los excipientes como inertes, pero en la actualidad este concepto ha sido dejado de lado debido a que las propiedades fundamentales de las formas farmacéuticas, como son su biodisponibilidad y estabilidad, dependen no solamente del tipo de excipiente y de sus características fisicoquímicas, sino también de su concentración e interacciones tanto con el o los principios activos y del método de preparación de la formulación.

Los tensioactivos conforman uno de los grupos más importantes de excipientes utilizados en la preparación de diferentes formas farmacéuticas. El palmitato de ascorbilo (Asc_{16}) forma parte de este grupo de sustancias.

Dentro de los excipientes farmacéuticos encontramos también a los disolventes. Estos compuestos en general, están en gran proporción dentro de la formulación. El agua es el disolvente universal usado en formulaciones farmacéuticas. Muchas veces, para modificar alguna propiedad que beneficie la interacción de un principio activo con el agua se utilizan los llamados *codisolventes*. Un ejemplo de estos son los polietilenglicoles (PEGs).

Los PEGs son ampliamente utilizados en una variedad de formulaciones farmacéuticas, incluidas las preparaciones parenterales, tópicas, oftálmicas, orales y rectales, así como en matrices poliméricas biodegradables para sistemas de liberación controlada. [3]

Existen numerosas estrategias utilizadas en tecnología farmacéutica [4] que se basan en el agregado de excipientes para solubilizar principios activos hidrofóbicos. Una de estas, es utilizar tensioactivos para aumentar la solubilidad aparente de principios activos poco solubles en sistemas acuosos [4]. Otra alternativa es la cosolvencia, donde pueden coexistir uno o más codisolventes. Por lo tanto, la combinación de ambas estrategias ha permitido vehicular drogas de interés farmacéutico en soluciones acuosas [4].

1.2.3 Excipientes Farmacéuticos - Principios Activos: Propiedades Tensioactivas

Numerosas sustancias usadas como principios activos en formulaciones farmacéuticas poseen propiedades de autoagregación. Esta característica se pone de manifiesto cuando a los sistemas en los que estos se encuentran, se les produce una modificación de la temperatura (termotrópicamente) o del solvente (liotrópicamente); pudiendo presentar estructuras simples como micelas o más complejas como los cristales líquidos.

Entre las moléculas de principios activos que presentan características de cristales líquidos podemos encontrar las siguientes: fenoprofeno, ketoprofeno, ibuprofeno y flurbiprofeno; que forman mesofases laminares. Estos compuestos se encuentran dentro de la familia de los profenos, antiinflamatorios no esteroideos (AINES) ampliamente utilizados en medicina humana. Otro AINE muy usado, que también forma mesofases laminares es el diclofenac, a estos se le suman los antiinflamatorios esteroidales (o corticoides) como los derivados del cortisol o cortisona (hidrocortisona) y los modificados a partir de este (prednisona, metil prednisona y prednisolona, entre otros) que también tienen propiedades de autoagregación. Además de estos, se encuentran numerosas moléculas usadas para afecciones cardíacas como la amiodarona, que forma mesofases laminares; y moléculas con propiedades de anestésico local del tipo de las caínas como es el caso de la tetracaína que forman soluciones coloidales [5].

1.2.4 Utilización de Tensioactivos en Tecnología Farmacéutica.

La *tecnología* puede ser definida como la utilización o aplicación de la ciencia para el beneficio de la sociedad. Por lo tanto, cuando se habla específicamente de *tecnología farmacéutica*, se hace referencia a aquellos usos y aplicaciones que se hacen de los conocimientos básicos adquiridos en el diseño, preparación, control y almacenamiento de formulaciones farmacéuticas.

Las diferentes funciones de los tensioactivos en tecnología farmacéutica son muy diversas y abarcan:

- Adsorción de fármacos sobre excipientes sólidos
- Humectación, disgregación y disolución de los fármacos
- Absorción de moléculas a través de membranas biológicas
- Formación y estabilidad de emulsiones y suspensiones
- Sistemas autoagregados (micelas, mesofases, vesículas)

El avance en el desarrollo de sistemas conteniendo tensioactivos ha consolidado varias áreas bien definidas. Así a los sistemas clásicos formados por sistemas micelares o coloides de asociación (asociaciones supramoleculares de tensioactivos), suspensiones (tensioactivos en interfase sólido-líquido) y emulsiones (tensioactivos en interfase líquido-líquido, termodinámicamente inestables); se han incorporado nuevos sistemas constituidos por liposomas (vesículas laminares de fosfolípidos), hexosomas y cubosomas (matrices de cristal líquido) [1], los niosomas (vesículas laminares de tensioactivos no iónicos) y las microemulsiones (tensioactivos en interfase líquido-líquido, termodinámicamente estables) [6-7].

En los sistemas farmacéuticos, el estudio de las *propiedades fisicoquímicas* es fundamental para el desarrollo de una forma de dosificación efectiva y segura. Sin embargo, en estos sistemas es necesario no perder de vista a quienes están dirigidas estas formulaciones. Este aspecto es estudiado por biofarmacia, la cual incluye desde las etapas de liberación del fármaco de la forma farmacéutica hasta la evaluación de la concentración del principio activo en el sitio blanco.

En este trabajo de tesis se hace hincapié en el uso de surfactantes en sistemas autoagregados, liposomales y posibles matrices de cristales líquidos teniendo en cuenta solamente las implicancias fisicoquímicas, dejando de lado las biofarmacéuticas.

1.3 Estructuras de Interés Farmacéutico Estudiadas: Cristales Líquidos y Liposomas

A continuación, se dan ejemplos de *matrices de cristales líquidos y sistemas liposomales* que pueden ser usados como formas farmacéuticas y sustentan este trabajo de investigación.

1.3.1 Cristales Líquidos (CL) como Forma Farmacéutica

Se pueden mencionar algunos ejemplos en la bibliografía donde se usan *cristales líquidos (CL)* como forma farmacéutica para la vehiculización de drogas. Las características generales de diferentes mesofases se detallan en el capítulo 2 sección 2.3.

➤ Uno de los métodos usados para obtener CL consiste en la formación de un sistema liotrópico formado por oleil glicerato (OG), fitanil glicerato (PG) y gliceril monooleato (GMO) como surfactantes y agua como disolvente. Estos sistemas a temperatura ambiente forman cristales líquidos hexagonales que son utilizados para vehicular y de esta manera mejorar la permeación de diclofenac. En este caso, se mejora la solubilidad y la protección de la droga, pudiendo controlarse su liberación a partir de una mesofase liotrópica [8].

➤ Un sistema similar, utiliza una mesofase hexagonal inversa y péptidos acrecentadores (“*enhancers*”) para que en conjunto, mejoren la permeación transdérmicas de diclofenac sódico. La vehiculización de la sustancia activa se logra cargando los cilindros de cristal líquido hexagonal inversos con la droga, y por las propiedades de los surfactantes utilizados y los péptidos, que también poseen características anfifílicas, se mejora la penetración del fármaco [9].

➤ En la referencia [10] se informa un sistema donde tensioactivos catiónicos como el cloruro de dioctadecil dimetil amonio y el cloruro de dioctadecil amonio son

incorporados a un cristal líquido cúbico bicontinuo para retener sustancias activas aniónicas como al AINE ketoprofeno y formar de esta manera, sistemas de transporte basados en mesofases.

➤ Otro ejemplo, es el uso de glicéridos monoinsaturados para la realización de formas farmacéuticas inyectables que se presentan en la referencia [1], donde se desarrolla una mesofase hexagonal para que actúe como matriz, para luego formar nanopartículas que presentan las dimensiones y las formas de estas mesofases. Estas nanopartículas, llamadas hexosomas, luego son cargadas con un fármaco muy usado en cáncer colorectal, el iridiotecan. Este es un ejemplo de que muchas veces la forma final puede no ser una mesofase sino que la mesofase forma una parte importante dentro de la preparación de la forma farmacéutica.

En esta misma dirección, se informa en las referencias [11-13] la utilización de cristales líquidos cúbicos a partir de los cuales se puedan obtener nanopartículas con forma cúbica llamados cubosomas. En estas nuevas formas farmacéuticas se pueden cargar diversos tipos de principios activos que presenten características de baja solubilidad, alta degradación o baja disponibilidad (biodisponibilidad).

1.3.2 Liposomas como Forma Farmacéutica

Como se mencionó al inicio de esta sección, los liposomas se encuentran dentro de los ejemplos de los sistemas coloidales para el transporte de drogas que más han sido investigados. Están formados por moléculas anfifílicas como los fosfolípidos y sus características generales se detallan en el capítulo 2 sección 2.4.

A continuación se describen ejemplos del uso de liposomas en el transporte de drogas.

➤ Un ejemplo de esto se encuentra en la referencia [14] donde se han utilizado liposomas para proteger a un antioxidante de su degradación en comparación con el uso de otros sistemas de transporte coloidal.

➤ Otro ejemplo es el de la referencia [15] donde se demuestra un mayor efecto terapéutico en afecciones dérmicas mediante la aplicación de triamcinolona, un corticoide, transportando por liposomas a través de la piel.

➤ D. Lasic presenta en la referencia [16] numerosos ejemplos del uso de estos coloides en la industria farmacéutica como son los liposomas que vehiculizan anfotericina B (antifúngico) o doxorubicina (antitumoral), por vías parenterales, y corticoides por vía pulmonar entre otros.

Por sus características, los liposomas pueden ser aplicados en otros campos diferentes del farmacéutico y se pueden emplear como:

➤ Modelo experimental de membranas y células en el campo de la Biofísica [16,17].

➤ En la industria alimentaria, como muestra la referencia [18], donde se utilizan liposomas de sulfato ferroso en el diseño de nuevos tipos de leche.

➤ En cosmética, como se describe en la referencia [19], donde se detallan muchos sistemas, incluyendo a los Liposomas.

Con el propósito de hallar nuevos sistemas *dispersos coloidales* capaces de aplicarse al transporte de principios activos se estudió el comportamiento del excipiente farmacéutico Asc₁₆, como sustancia capaz de formar diferentes mesofases que son potencialmente útiles para dicho fin. Asimismo, se evaluó su comportamiento formando parte de liposomas que potencialmente se puedan usar en sistemas que requieran de su actividad antioxidante. Paralelamente, se investigó el comportamiento de fase de la AMI en soluciones llamadas “de uso” y formando parte de liposomas en forma conjunta con el Asc₁₆. La AMI se usa desde hace más de 40 años y hoy sigue siendo de elección por su gran actividad terapéutica, a pesar de sus efectos adversos.

1.4 Moléculas de interés farmacéutico estudiadas: Asc₁₆ y AMI

1.4.1 Tensioactivo Biocompatible Derivado de Vitamina C, Palmitato de Ascorbilo (Asc₁₆)

El ácido ascórbico (vitamina C) ha sido usado frecuentemente en preparaciones cosméticas dado su elevado poder como agente reductor. Sin embargo, este alto poder implica una baja estabilidad [20]. Para mejorarla, se sintetizaron varios derivados. Uno de ellos, el palmitato de ascorbilo (Asc₁₆) o 6-o-hexadecanoato de ascorbilo, que está disponible comercialmente y presenta muy baja solubilidad en agua. A fin de ver la posibilidad de poder aplicar en sistemas acuosos este compuesto, más estable que el ácido ascórbico, en el presente trabajo se estudia el comportamiento de fases del Asc₁₆ en soluciones acuosas con y sin codisolvente, en monocapas insolubles con diferentes subfases y además su interacción con fosfolípidos para la formación de liposomas. Estos estudios se muestran en los capítulos 3, 4 y 6 respectivamente. Los resultados de estos trabajos fueron publicados por el autor y colaboradores en [21-23].

En las investigaciones del presente trabajo fue usado este derivado, cuya estructura se representa en la figura 1.1.

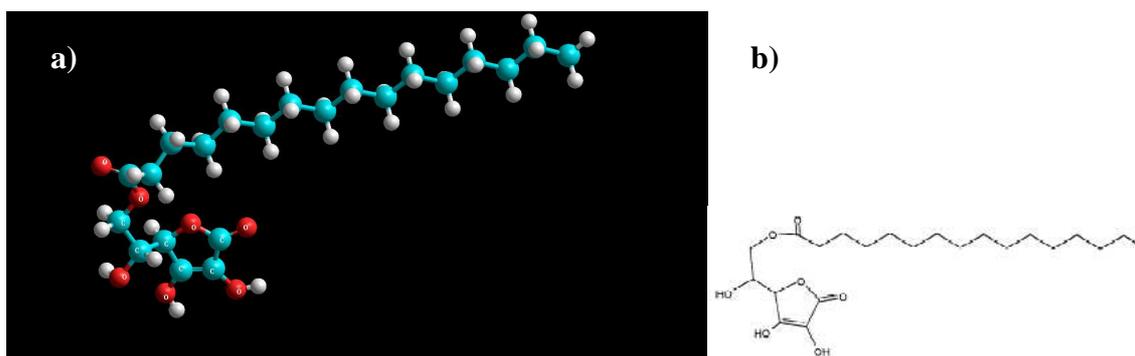


Figura 1.1: a) Representación de la molécula de Asc₁₆ en 3D realizada con el programa Hiperchem 8 professional. En Celeste: C, blanco: H, rojo: O. b) Representación de la molécula de Asc₁₆ en 2D.

1.4.2 Molécula de Interés Farmacológico, Amiodarona (AMI)

El Clorhidrato de Amiodarona (clorhidrato de la 2-Butilbenzofuran-3-il 4-(2-dietilaminoetoxi)-3,5-di-iodofenil cetona) mostrado en la figura 1.2, es un derivado yodado benzofuránico. Su actividad farmacológica se debe a sus propiedades antiarrítmicas, vasodilatadoras y antianginosas; por lo que se trata de un principio activo ampliamente utilizado en el tratamiento de enfermedades cardíacas severas.

Según la bibliografía [24] la AMI es un compuesto no quiral y altamente lipofílico de escasa solubilidad en agua a temperatura ambiente. Esta característica llevó a desarrollar un estudio detallado del comportamiento de fases en soluciones acuosas, cuyo análisis sugiere la existencia de agregados coloidales, en los cuales la forma y las propiedades de estos agregados se ven notablemente afectadas por la temperatura. Los resultados y su análisis se muestran en el capítulo 5. Los resultados de este trabajo fueron publicados por el autor y colaboradores [25].

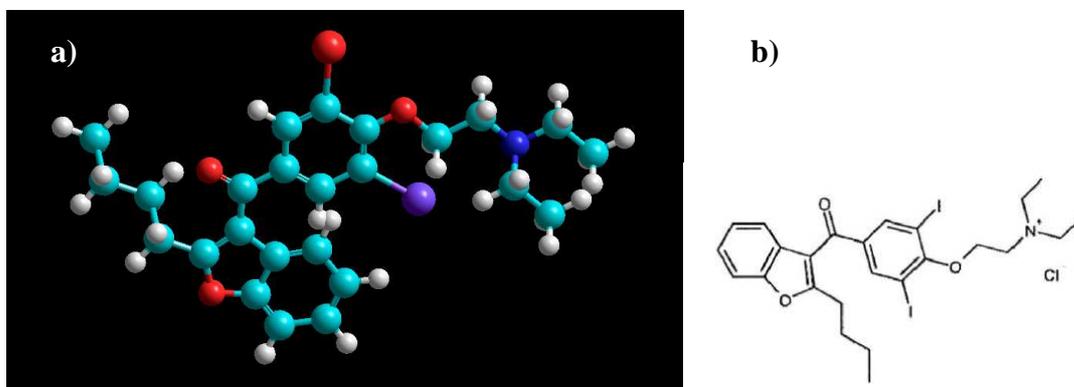


Figura 1.2: a) Representación de la molécula de AMI en 3D realizada con el programa Hiperchem 8 professional. En Celeste: C, blanco: H, rojo: O, azul: N, violeta: I. b) Representación de la molécula de AMI en 2D.

Algunos efectos adversos de la AMI no surgen de ella, sino de los excipientes que forman parte de la formulación inyectable. La necesidad de desarrollar formulaciones sin alguno de estos excipientes motivó el estudio fisicoquímico en el cual se detalla el comportamiento de la AMI en soluciones acuosas a las concentraciones de uso sin

surfactantes. Aquí se observó que luego de calentar soluciones acuosas de AMI por encima de la temperatura de Krafft y luego enfriarlas hasta temperatura ambiente, no se forman estructuras estables.

La fotosensibilidad es uno de los efectos adversos que si dependen de la administración de AMI. Según [26] esta afección es producida por la oxidación de lípidos de la membrana de las células de los pacientes que son tratados con este fármaco en presencia de luz. El desarrollo de formas farmacéuticas que contengan a este principio activo en forma conjunta con antioxidantes hace inferir desde la bibliografía [27, 28] una posible disminución de este efecto. Esto se debería a que los antioxidantes, como el Asc₁₆, reducen a los lípidos que pueden ser oxidados por la AMI. Por esto se estudió la interacción entre el Asc₁₆ y la AMI, para descartar alguna posible incompatibilidad química en la nueva formulación entre ambos. En el capítulo 6 se detallan los resultados de esta interacción.

1.5 Referencias del Capítulo

- [1]- B. Boyd, D. Whittaker, S. Khoo, G. Davey. *International Journal of Pharmaceutics*. 318 (2006) 154.
- [2]- *Farmacopea Nacional Argentina* (FNA). Decreto 202/2003. 7^{ma} Ed. 1 (2003). Argentina.
- [3]- R. Rowe, P. Sheskey, M. Quinn (Eds). *Handbook of Pharmaceuticals Excipients*. 6th ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association. (2009) 517. London-Chicago.
- [4]- P. Bustamante, Disoluciones y Solubilidad. C. Fáuli (Ed.) *Tratado de Farmacia Galénica*. (1993). Madrid, España.
- [5]- C. Müller-Goymann. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 58 (2004) 343.
- [6]- P. Jurkovic, M. Sentjurc, M. Gasperlina, J. Kristla, S. Pecara. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 56 (2003) 59.
- [7]- S. Palma. *PhD Thesis*. UNC (Ed.). Universidad Nacional de Córdoba. (2003) Argentina.
- [8]- Doron Yariv. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 78 (2010) 185.
- [9]- M. Cohen-Avrahami. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 77 (2010) 131.
- [10]- M. Lynch, A. Ofori-Boateng, A. Hippe, Kelly Kochvar, P. Spicer. *Journal of Colloid and Interface Science*. 260 (2003) 404.
- [11]- H. Wu, J. Li, Q. Zhang, X. Yan, L. Guo, X. Gao, M. Qiu, X. Jiang, R. Lai, H. Chen. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 80 (2012) 368.
- [12]- S. Rizwan, D. Assmus, A. Boehnke, T. Hanley, B. Boyd, T. Rades, S. Hook. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 79 (2011) 15.
- [13]- M. Uyama, M. Nakano, J. Yamashita, T. Handa. *Langmuir*. 8 (2009) 25.
- [14]- J. Kristla, B. Volka, M. Gašperlina, M. Šentjurb, P. Jurkovič. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 19 (2003) 181.
- [15]- M. Mezei, V. Gulasekharam. *Lotion dosage form. Life Science*. 26 (1980) 1473.
- [16]- D. Lasic. *Handbook of Biological Physics*. R. Lipowsky, E. Sackmann. (Ed.). Elsevier Science. 1 (1995).
- [17]- S. Singer, G. Nicolson. *Science*. 175 (1972) 720.

- [18]- S. Xia, S. Xu. *Food Research International*. 38 (2005) 289.
- [19]- S. Magdassi. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 671 (1997) 123.
- [20]- P. Spiclin, M. Gasperlin, V. Kmetec. *International Journal of Pharmaceutics*. 222 (2001) 271.
- [21]- L. Benedini, E. Schulz, P. Messina, S. Palma, D. Allemandi, P. Schulz. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 375 (2011) 178.
- [22]- L. Benedini, M. Fanani, B. Maggio, N. Wilke, P. Messina, S. Palma, P. Schulz. *Langmuir*. 27 (2011) 10914.
- [23]- L. Benedini, P. Messina, S. Palma, D. Allemandi, P. Schulz. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 89 (2012) 265.
- [24]- P. Martindale. *The Complete Drug Reference*. 36th ed. The Pharmaceutical Press. London. (2009) 1211.
- [25]- L. Benedini, P. Messina, R. Manzo, D. Allemandi, S. Palma, E. Schulz, M. Frechero, P. Schulz. *Journal of Colloid and Interface Science*. 342 (2010) 407.
- [26]- T. Kennedy, D. Liebler. *Chemical Research in Toxicology*. 4 (1991) 290.
- [27]- S. Stratton, D. Liebler. *Biochemistry*. 36 (1997) 12911.
- [28]- M. Agoston, F. Örsi, E. Fehér, K. Hagymási, Z. Orosz, A. Blázovics, J. Fehér, A. Vereckei. *Toxicology*. 190 (2003) 231.

Capítulo 2

Consideraciones Generales de los Sistemas Coloidales

2.1 Dispersiones Coloidales

2.1.1 *Sistemas Dispersos*

Los *sistemas dispersos* consisten en un material, de tamaño y naturaleza variable, conocido como fase dispersa, distribuido en una fase continua o dispersante. Los materiales que se utilizan como sistemas dispersos pueden tener un intervalo de tamaño de partícula que va desde algunos nanómetros (molecular) hasta milímetros. Es común entonces clasificar los sistemas dispersos según el tamaño promedio de las partículas que los componen, en sistemas coloidales y en dispersiones gruesas.

Los tamaños de la fase dispersa de los sistemas coloidales y el de las dispersiones gruesas se encuentran entre 1 nm y 1 μm para los primeros y mayores de 1 μm para los segundos.

Es común clasificar a los *sistemas coloidales* en liófilos o liófilos según tengan afinidad o no con el solvente. Los sistemas liofílicos son termodinámicamente estables, los liofóbicos no lo son, aunque pueden ser estables cinéticamente. Además, las *dispersiones coloidales* pueden ser clasificadas como moleculares o de agregación. En las dispersiones moleculares, como sucede en las soluciones de proteínas o polímeros, la fase dispersa esta compuesta por macromoléculas simples, mientras que en los sistemas de agregación la fase dispersa comprende a muchas moléculas asociadas formando un agregado supramolecular como son: micelas, vesículas, mesofases y geles, entre otros. La descripción de estos sistemas se aborda más adelante en la sección 2.3 de este capítulo.

2.2 Tensioactivos

Habitualmente se utilizan diversas formas de llamar a estos compuestos, sin embargo, no todas estas son intercambiables perfectamente una por la otra.

Las moléculas orgánicas se clasifican en función de la afinidad por el medio en dos grandes grupos: las que poseen afinidad por un medio acuoso y se disuelven perfectamente en éste se denominan hidrofílicas y las que poseen afinidad por un medio orgánico u oleoso o bien lipídico se denominan hidrofóbicas. Como ejemplo de las primeras, podemos mencionar la glucosa y de las segundas a los aceites.

Sin, embargo, existen una serie de moléculas que presentan grupos que le confieren afinidad por el medio lipídico y otros con afinidad por el medio acuoso. Estas se denominan *Anfifilos o moléculas anfipáticas*. Es muy común el uso del término *anfifilo* en lugar de *tensioactivo*. Este último término asume que la molécula cuenta con la capacidad de disminuir la tensión superficial, y cuando se utiliza el término *anfifilo* no se está asumiendo necesariamente esto. Se suele usar también el término “*surfactante*”, una castellanización del inglés “*surfactant*”, que a su vez es un apócope de “*surface active agents*”.

Una estructura molecular que describe generalmente a los anfifilos puede ser representada por una cola apolar o cadena hidrocarbonada, con solubilidad en medio no acuoso y una cabeza polar o iónica la cual forma el grupo que presenta la solubilidad en el medio acuoso (figura 2.1). Como ejemplos de estas moléculas encontramos a las sales de ácidos carboxílicos y ácidos alquilsulfúricos. Existen otras, que poseen características similares aunque no presenten exactamente esta disposición. Dentro de estas, se encuentran las sales biliares y otras moléculas con esqueleto esteroideal.

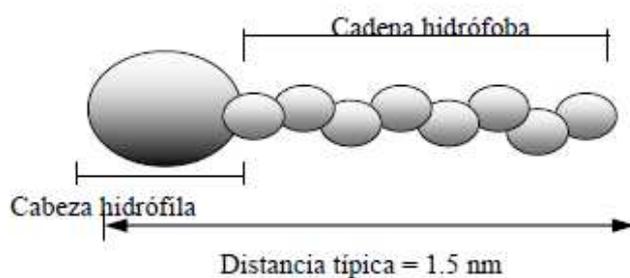


Figura 2.1: Esquema general de un anfifilo típico.

Como se puede observar, este grupo de sustancias engloba a numerosas moléculas, muchas de las cuales son de interés biológico. Algunas de estas son de alta masa molecular como los fosfolípidos, los polivinil alcoholes y las proteínas. Estos contienen distribuidos a lo largo de toda la molécula los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos [1]. Dentro de los fosfolípidos, por ejemplo, encontramos en primer lugar, a la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) que forma el 80 % de los tensioactivos constituyentes del surfactante pulmonar, que es el encargado, junto a otras sustancias, de que no colapsen los alvéolos pulmonares [2]. Otro ejemplo es la dimiristoilfosfocolina (DMPC) con la cual se ha trabajado en la sección 4.3 del capítulo 4 de esta tesis.

Hablar de tensioactivos, surfactantes o agentes tensioactivos, hace referencia a la característica de una molécula de tener actividad superficial y se debe tener en consideración que no todos los anfifilos la poseen de manera destacada.

De todos estos términos la denominación anfifilo o moléculas anfipáticas es la manera más general para nombrar a esta familia de moléculas, dado que describe las

características de solubilidad dual que presentan, sin hacer referencia a que posean o no actividad superficial. Sin embargo, los fenómenos de agregación y de reducción de la tensión interfacial son algunas de las características esenciales por las cuales se remonta a la definición de Laughlin donde se define a un tensioactivo (o surfactante) como aquel anfifilo que abate la tensión interfacial y que además forma agregados coloidales, ya sean micelas o cristales líquidos en función a las diferentes proporciones de agua con que cuente el sistema dependiendo de su temperatura [3].

2.2.1 Estructura Química de los Tensioactivos

Generalmente, los tensioactivos se clasifican en función a la estructura química del grupo polar unido al cuerpo hidrocarbonado. Pueden ser: a) aniónicos, b) catiónicos, c) anfotéricos, d) zwitteriónicos y e) no iónicos. Estos últimos son muy utilizados en el diseño de formulaciones farmacéuticas debido a que presentan, en general, muy baja toxicidad.

Por fuera de estos grupos se podrían nombrar a los tensioactivos con esqueleto esteroideal dado que poseen varios grupos polares de los cuales alguno puede ser iónico y un esqueleto rígido hidrocarbonado, apolar.

2.2.1.1 Tensioactivos Aniónicos:

Al ionizarse en agua los tensioactivos aniónicos producen un anión tensioactivo. Los más usados en este grupo son aquellos que contienen grupos carboxilato (figura 2.2: ácido dodecanoico), sulfonato y sulfato. Entre los derivados del ácido sulfúrico se encuentra el SDS, dodecil (= lauril) sulfato de sodio, representado en la figura 2.3, es un emulsionante y humectante muy usado en cosmética.

Aquellos compuestos que contienen el grupo carboxilato son denominados “jabones”, los cuales se preparan generalmente por saponificación en medio alcalino de glicéridos naturales de ácidos grasos. Son muy sensibles a las aguas duras, porque sus sales con cationes di o trivalentes son insolubles en agua. Los cationes más comunes que se asocian a estos jabones son: sodio, potasio, amonio y trietanolamina. La longitud de cadena de los ácidos grasos va de 12 a 18 átomos de carbono para los tensioactivos

con buenas propiedades de lavado. A continuación, en las siguientes figuras se observan estructuras en tres dimensiones de las moléculas de este grupo.

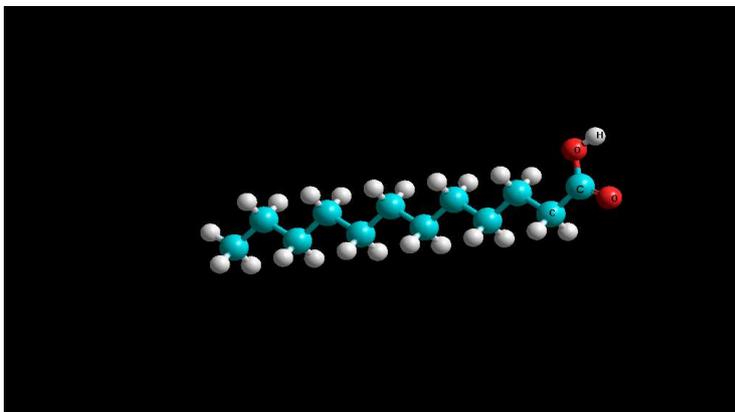


Figura 2.2: Representación de la molécula de ácido dodecanoico en 3D realizada con el programa Hiperchem 8 professional. En Celeste: C, blanco: H, rojo: O.

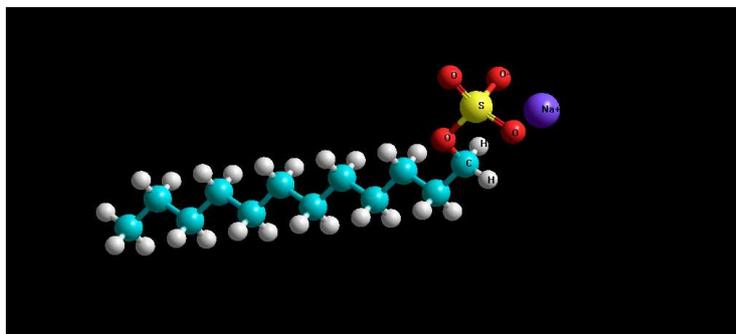


Figura 2.3: Representación de la molécula de SDS, dodecilsulfato de sodio en 3D realizada con el programa Hiperchem 8 professional. En Celeste: C, blanco: H, rojo: O, Amarillo: S, Violeta: Na.

2.2.1.2 Tensioactivos Catiónicos:

Los tensioactivos catiónicos se ionizan originando un catión tensioactivo. La mayor parte de estos son sustancias nitrogenadas de cadena hidrocarbonada variable, las cuales al ionizarse dan un grupo polar formado por un átomo de nitrógeno cargado positivamente. Las sales de amonio cuaternario suelen ser las más usadas.

En preparaciones farmacéuticas se restringe en general el uso de estas sustancias a la de agentes conservadores antimicrobianos y no a la de tensioactivos, debido a su toxicidad. Esto es debido a que los cationes se absorben muy fácilmente en estructuras

de la membrana celular que mayoritariamente cuentan con cargas negativas. Esta adsorción es de forma inespecífica y provoca la lisis o ruptura celular. Así mismo, los agentes aniónicos, provocan un efecto similar, aunque en menor grado. Por este mecanismo actúan destruyendo bacterias y hongos. Un ejemplo de estos son los cloruros de alquildibencil dimetilamonio más conocidos como los cloruros de benzalconio.

2.2.1.3 Tensioactivos Anfotéricos:

El grupo principal de moléculas de esta categoría es el que contiene grupos carboxilato o fosfato como anión, y grupos amino o amonio como catión. Desde el punto de vista de la actividad tensioactiva tiene comportamientos intermedios entre iónicos y no-iónicos. En general no son buenos emulgentes y su comportamiento como aniónico o catiónico depende del pH.

2.2.1.4 Tensioactivos Zwitteriónicos:

Estas moléculas poseen centros positivos y negativos que se balancean intramolecularmente por lo que su comportamiento es comparable con el de los tensioactivos no iónicos.

2.2.1.5 Tensioactivos no Iónicos:

Estos tensioactivos tienen la propiedad de no ionizarse en solución, por lo que son insensibles a las variaciones de pH y presentan alta compatibilidad con la mayoría de los surfactantes. Representan el grupo de los más utilizados en sistemas farmacéuticos debido a sus ventajas en cuanto a compatibilidad, estabilidad y toxicidad. Además, se los divide comúnmente en insolubles y totalmente solubles en agua. El primer grupo está compuesto principalmente por los ácidos grasos de cadena larga y sus derivados insolubles en agua. Estos incluyen a: 1) los alcoholes grasos como los lauril (doce átomos de carbono), cetil (16 átomos de carbono) y estearil alcoholes (18 átomos de carbono); 2) los ésteres del glicerilo como los monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos naturales y 3) los ésteres de ácidos grasos de alcoholes grasos y otros alcoholes como propilenglicol, polietilenglicol, sorbitan, sacarosa y colesterol. Los

ésteres de sorbitan son muy utilizados en cosmética y en general tienen un HLB¹ pequeño, o sea, que son muy liposolubles. Por esto, son emulsionantes del tipo W/O. Esto es debido a que cuanto más soluble sea el emulgente en una determinada fase, esta formará la fase continua. Como ejemplo se mencionan a los SPANS (ésteres de sorbitán, un derivado del azúcar sorbitol).

Para aumentar la hidrosolubilidad de estos compuestos y para formar el segundo grupo, se añaden grupos polioxietilenos mediante una unión éter con uno de sus grupos alcohólicos, formando así los polisorbatos que en general tienen un HLB relativamente elevado y son emulsionantes del tipo O/W. También son humectantes y excelentes solubilizantes. Un ejemplo son los TWEENS (ésteres poloxietilénicos de sorbitán), muy utilizados en formulaciones dermatológicas.

2.2.2 Propiedades de los Tensioactivos

Los surfactantes presentan, en soluciones diluidas, una depresión de la tensión superficial e interfacial debido a la adsorción y orientación de las moléculas en la interfase. También forman micelas por encima de una determinada concentración, conocida como concentración micelar crítica (*cmc* o *CMC*) y por encima de una determinada temperatura; la temperatura micelar crítica (*T_{mc}*) o temperatura de *Krafft* (*T_k*). Este fenómeno se produce debido al decrecimiento de la energía libre de Gibbs (entalpía libre) del sistema, aunque no todos los surfactantes forman estructuras de estas características. Los factores que pueden influir son por ejemplo, el parámetro de empaquetamiento y otros que se tratarán más adelante. La formación de estas estructuras supramoleculares facilitan la solubilización de sustancias insolubles en agua y eso hace que estos compuestos sean muy atractivos para el estudio.

La reducción de la tensión interfacial y las propiedades de agregación de los tensioactivos son dos características muy importantes que serán profundizadas con cada sistema en el desarrollo de los siguientes capítulos.

¹ El HLB es un número que representa el balance entre la hidrofiliidad y la lipofiliidad de los grupos que componen la molécula anfifílica. La sigla proviene del inglés *hydrophile-lipophile balance* (Equilibrio hidrófilo-lipófilo). Un HLB bajo indica mucha afinidad por hidrocarburos y baja por el agua, y uno alto (por encima de 10) a la inversa.

2.2.2.1 Reducción de la Tensión Superficial e Interfacial

La adsorción es el proceso por el cual las moléculas pueden quedar retenidas en la superficie. De este modo, las moléculas de tensioactivo en un medio acuoso (polar) se disponen orientando su cabeza polar o iónica en el sentido de la solución y su extremo hidrocarbonado o apolar hacia el aire, por lo que la molécula de surfactante se orienta en la interfase aire/solución con la cola hacia el aire y la cabeza hacia la solución. Este fenómeno es conocido como *adsorción positiva* y como en todos los procesos fisicoquímicos se establece un equilibrio entre las moléculas en el seno de la solución y las de la interfase. Esta adsorción produce una disminución de la tensión superficial de la solución para interfaces aire/solución y de la tensión interfacial para el caso de las interfaces líquido/líquido que sean inmiscibles entre si.

Este fenómeno depende directamente del reemplazo de moléculas del solvente en la interfase por moléculas del anfifilo, y consecuentemente, depende de la concentración en exceso del anfifilo en la superficie o interfase, de acuerdo con la ecuación de Gibbs:

$$d\sigma = - \sum \Gamma_i d\mu_i \quad (\text{Ec. 2.1})$$

Donde Γ_i es el exceso superficial (moles /unidad de volumen) de la especie i y μ_i su potencial químico en el seno de la solución. Las moléculas en la superficie del líquido tienen energías potenciales mayores que las que tienen las moléculas en el interior del líquido.

La *energía libre superficial* por unidad de área, o *tensión superficial*, es una medida del trabajo que debe ser gastado para llevar una molécula desde el interior del líquido hasta la interfase.

La energía libre interfacial por unidad de área, es decir, la tensión interfacial σ_I , entre dos fases condensadas a y b, está dada por:

$$\sigma_I = \sigma_a + \sigma_b - 2 \sigma_{ab} \quad (\text{Ec. 2.2})$$

Donde σ_a y σ_b son las tensiones superficiales de los líquidos puros a y b, respectivamente, y σ_{ab} es la energía de interacción entre a y b por unidad de área a través de la interfase. Por lo expuesto, puede resumirse el rol del agente tensioactivo de la siguiente manera:

Los tensioactivos se adsorben en la interfase de dos fases inmiscibles, orientándose con el grupo hidrofílico hacia la fase acuosa o polar, y su grupo hidrofóbico hacia la fase oleosa, no polar, o gaseosa. Esto hace más fuerte la interacción entre las dos fases, es decir, incrementa σ_{ab} , con la consecuente reducción de la tensión interfacial.

Como ya se ha mencionado antes, una condición necesaria pero no suficiente para la reducción de la tensión interfacial es que se encuentre presente en la molécula anfifílica, las partes hidrofílica e hidrofóbica. La parte hidrofóbica tiene dos funciones: i) la de producir adsorción espontánea de la molécula tensioactiva en la interfase y ii) la de incrementar la interacción a través de la interfase entre las moléculas anfifílicas adsorbidas en la fase adyacente. La función del grupo hidrofílico es proveer una fuerte interacción entre las moléculas del anfifilo en la interfase y las moléculas del solvente.

Para actividades superficiales significativas, es esencial un equilibrio apropiado entre el carácter liofílico y el liofóbico en el anfifilo. El equilibrio liofílico - liofóbico para un dado anfifilo varía con el sistema y las condiciones de uso. Es decir, depende de la naturaleza química del solvente, la temperatura, la concentración de electrolito y la presencia de aditivos orgánicos. En general, una buena reducción de tensión superficial o interfacial se obtiene por medio de anfifilos que tienen una solubilidad apreciable pero limitada en el sistema, en las condiciones de uso.

2.2.2.2 Agregación de los Tensioactivos: Estructuras Formadas

En soluciones acuosas de surfactantes en bajas concentraciones y a bajas temperaturas, las moléculas se encuentran dispersas en forma de especies monoméricas aunque pueden existir como dímero, trímero y otro tipo de asociaciones [4-7]. Este tipo de soluciones presenta características isotrópicas. A partir de cierta concentración, manteniéndose la temperatura, se llega a saturación. Aumentando la temperatura por encima de un valor conocido como *temperatura o punto de Krafft*, los monómeros y asociaciones moleculares del surfactante se reúnen formando agregados esféricos de entre 60 y 100 moléculas monoméricas con diámetros de entre 3 y 6 nm que se conocen como micelas.

La concentración a la cual se produce la formación de estos agregados se conoce como concentración micelar crítica (*cmc o CMC*), es característica de cada sistema de surfactante-solvente y dependiente de la temperatura. Esta solución, ahora micelar, sigue siendo isotrópica.

Hay que tener en cuenta que el número de moléculas que forman parte de la micela es un parámetro a determinar y se conoce como n , *número de agregación* y puede ser determinado por numerosas técnicas, en esta tesis se determinó por fluorescencia utilizando zonda de pireno.

La formación de micelas se debe a tres tipos de fuerzas: i) de repulsión entre las cadenas hidrocarbonadas y el medio acuoso, ii) repulsión electrostática o estérica entre las cabezas polares, y iii) atracciones de Van der Waals entre las colas hidrocarbonadas. En solución acuosa, una micela normal o directa tiene sus cadenas hidrocarbonadas orientadas hacia el interior de la micela y las cabezas hidrofílicas hacia fuera. En el caso en que el medio de dispersión o continuo posea características no polares, las colas hidrocarbonadas se dispondrán el exterior y las cabezas polares hacia dentro. En este caso, las micelas se conocen como inversas.

En general, a la micela se la presenta como una entidad estática, sin embargo, son agregados donde las moléculas que la componen se encuentran en equilibrio dinámico con las moléculas de surfactante presentes en el disolvente [8]. Es decir, que existe un intercambio desde la micela hacia el medio y viceversa. También, sucede este intercambio entre moléculas de diferentes micelas, tanto en forma parcial como total en el orden de los milisegundos.

Muchas de las propiedades físicas de las soluciones de surfactantes, como la tensión superficial y conductividad, entre otras, cambian de manera notable luego de alcanzada la cmc . Este cambio ha sido utilizado para definir a la cmc como aquella concentración en la cual ocurre el máximo cambio en la pendiente de la curva que representa una propiedad coligativa ideal Φ , como pueden ser la presión osmótica, la conductividad, la tensión superficial, el volumen específico, la viscosidad y el índice de refracción, entre otras; en función de la concentración total del surfactante, C_T :

$$\left(\frac{d^3 \Phi}{d C_T^3} \right)_{C_T = cmc} = 0 \quad (\text{Ec. 2.3})$$

Cabe destacar que no existe un único valor de cmc , sino que es un intervalo de concentraciones. En la figura 2.4 se observa la variación de alguna de estas propiedades en función del agregado de un surfactante típico, el dodecil sulfato de sodio. Algunos métodos son más sensibles que otros para detectar la presencia de micelas, por lo que la

cmc depende de la propiedad medida y de la sensibilidad del método utilizado para determinarla.

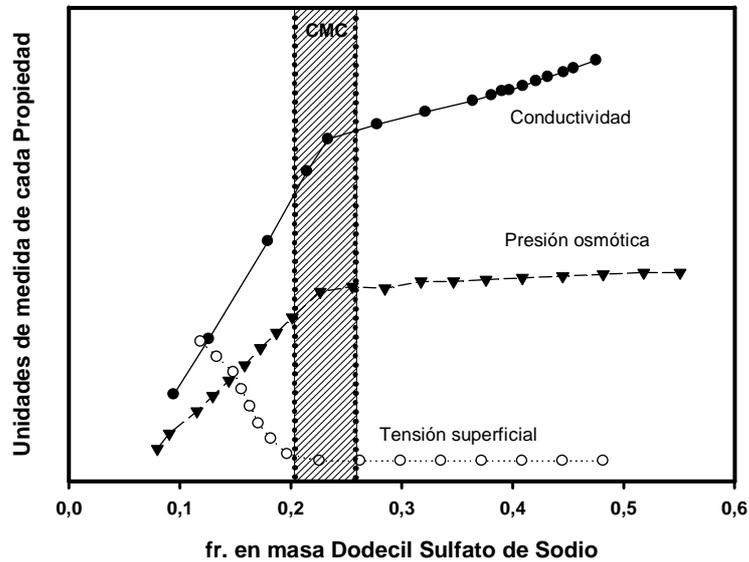


Figura 2.4: La variación de propiedades antes y después de la *cmc* vs. concentración de dodecil sulfato de sodio.

Cuando los surfactantes se encuentran en concentraciones mayores que la *cmc* se forman agregados cuyo tamaño y forma dependen de la estructura de la molécula. Al aumentar la concentración, se producen ciertas modificaciones en las propiedades del sistema, las cuales pueden ser interpretadas como un cambio en la estructura de los agregados micelares. Estas estructuras pueden ser cilíndricas, laminares y en forma de discos. A concentraciones superiores pueden ocurrir transiciones de fase de la solución micelar a cristales líquidos.

2.3 Mesofases en Sistemas con Tensioactivos

Las mesofases o cristales líquidos son sistemas que se encuentran entre el orden tridimensional que posee un cristal y el desorden del líquido. Las mesofases pueden tener orden posicional en una, dos o tres dimensiones. Existen dos métodos para destruir el orden del estado sólido y obtener cristales líquidos: la modificación de la temperatura y el efecto del solvente.

- Los cristales líquidos *termotrópicos* son los que pueden formarse por efecto de la temperatura sobre una o varias sustancias.

- Los cristales líquidos *liotrópicos* son los que pueden formarse por efecto del solvente.

También puede ocurrir, que para un sistema dado, un aumento de la temperatura pueda causar cambios de fase entre diferentes mesofases.

Como se mencionó anteriormente, el dominio micelar es isótropo en reposo. Sin embargo, puede tener actividad óptica cuando está fluyendo, si los agregados no son isométricos, por ejemplo, las micelas cilíndricas o discoidales se orientan durante el flujo.

2.3.1 Mesofases Termotrópicas

Dentro de los cristales líquidos termotrópicos encontramos a las mesofases nemáticas, las esmécticas, las de cinta, las fases de discos e incluso laminares. Dentro de esta clasificación puede haber subclasificaciones. Éste es el caso de las esmécticas, las cuales se encuentran diferenciadas de la A a la I. Otro ejemplo, es el de las mesofases en cinta que aparecen con anfífilos anhidros, que se diferencian en subwaxy, superwaxy y waxy, entre otras.

En la figura 2.5 se ejemplifican algunos tipos de mesofases termotrópicas.

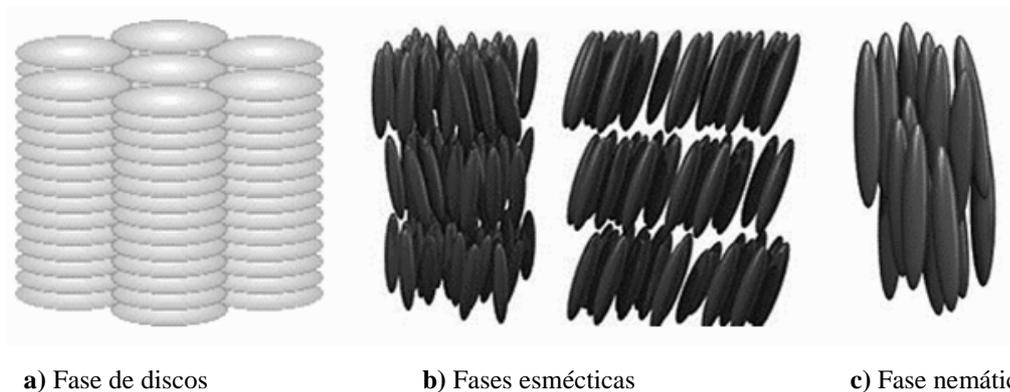


Figura 2.5: Mesofases termotrópicas

Las mesofases nemáticas son las más parecidas al líquido isotrópico. Son uniaxiales² y son afectadas por campos magnéticos intensos.

Las esmécticas, dependiendo del tipo, poseen una inclinación respecto al eje principal de disposición. Son uniaxiales y no son afectadas por los campos magnéticos.

Las fases en cinta son translúcidas distinguibles a simple vista con luz polarizada. Son doradas e iridiscentes.

Los mesógenos³ que poseen estructura química en forma discoidea tienen la tendencia a orientarse en forma de láminas formando fases nemáticas discoideas o fases columnares. En general, estas fases aparecen a menor temperatura que las fases de cinta.

Por último, la fase laminar producida térmicamente por surfactantes anhidros presenta, dentro de esta clasificación, características de labilidad debido a que aparece a altas temperaturas.

2.3.2 Mesofases Liotrópicas:

Aquí se pueden encontrar, luego de la micelar y hacia regiones de mayor concentración del surfactante, la cúbica micelar, la hexagonal, la cúbica bicontinua y la laminar. No siempre en los diagramas temperatura en función de la composición aparecen necesariamente todas, y a veces tampoco en el mismo orden. Además, pueden

² Es decir, tienen un solo eje óptico, a lo largo del cual son isotrópicas.

³ Sustancias que generan cristales líquidos.

aparecer fases discoidales, siendo los discos formados por agregados de moléculas en forma de bicapa.

Las mesofases laminares aparecen a contenidos de anfifilo bastante altos, entre 70-90 % en masa. Presentan viscosidades entre 10 y 100 Pa.s (1-10 Poise). La sustancia es ligeramente translúcida, de consistencia semilíquida y mucosa; además de ser ópticamente anisotrópica. El examen microscópico entre polaroides cruzados muestra texturas en mosaico como planares. En otros casos, se manifiesta la presencia de numerosas unidades esféricas, ópticamente positivas y negativas; aunque, en otros casos, solo positivas. La mesofase laminar presenta además estrías o vetas oleosas. Estas texturas son típicas de fases esmécticas. A la fase laminar le cabe esta clasificación, debido a que en las dos dimensiones del plano que se forman las láminas, las moléculas se encuentran ordenadas perpendicularmente a estos planos y a su vez, presentan una repetición de este arreglo en el eje vertical. Esta estructura se representa en la figura 2.6.

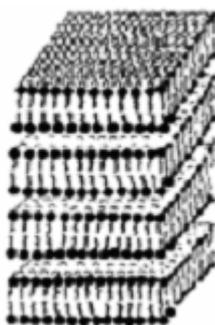


Figura 2.6: Representación esquemática de una mesofase laminar.

La mesofase hexagonal es un cristal líquido anisotrópico, birrefringente, inmisible en la laminar y de más bajo contenido de anfifilo. Esta mesofase se representa en la figura 2.7.

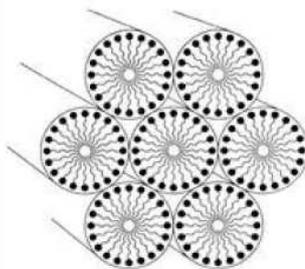


Figura 2.7: Representaciones esquemáticas de una mesofase hexagonal.

A altos contenidos de agua, está en equilibrio con la solución acuosa micelar en zonas bi o trifásicas. A mayores concentraciones de anfifilo, está en equilibrio con sólido cristalino o con alguna fase intermedia, dependiendo de la temperatura y de la naturaleza del anfifilo. Esta fase es un gel rígido, con viscosidades de hasta 200-450 Pa.s (20-45 Poise), casi plástica, conserva su estado viscoso hasta la temperatura a la cual se transforma en solución isotrópica. Es una mesofase del tipo nemático, semitransparente, anisótropa, birrefringente, que muestra una textura angular o en forma de abanico cuando se observa con luz polarizada. A veces se observan formaciones nebulosas, frecuentemente combinadas con estrías finas. La estructura, analizada por difracción de rayos X, indica la existencia de largas varillas cilíndricas, de longitud indeterminada, dispuestas en un arreglo hexagonal centrado bidimensional. Al diluir, las varillas se van separando. Esta es una fase uniaxial, cuyo eje óptico cae a lo largo de los cilindros. El interior de los cilindros es fluido (se presenta la banda típica de los hidrocarburos líquidos a 0,45 nm en los difractogramas de rayos X), con moléculas dispuestas radialmente. Los cilindros suelen alinearse entre porta y cubreobjetos, paralelos a las superficies vítreas. Están separados por un medio continuo acuoso. El diámetro de las fibrillas es algo menor que el doble de la longitud de la molécula de anfifilo y disminuye con la dilución, como consecuencia de la creciente separación entre grupos polares.

Las mesofases cúbicas, representadas en las figuras 2.8 a y b, se presentan como zonas negras cuando se encuentran entre polaroides cruzados, ocupando a veces toda la preparación. Su dominio de existencia es por lo general limitado.

La razón molar agua/anfifilo parece caer entre límites muy estrechos. Son geles extremadamente rígidos, claros, transparentes y no muestran birrefringencia. El análisis de difracción de rayos X indica que poseen simetría cúbica. Esta fase está formada en algunos casos por micelas esféricas estrechamente empaquetadas, en un medio continuo de agua. Ésta, a su vez, estaría completamente unida al anfifilo formando las capas de hidratación de los grupos polares. Estas esferas se tocan unas con otras y estarían algo aplastadas en la zona donde se ponen en contacto, dando figuras tipo dodecaedros.

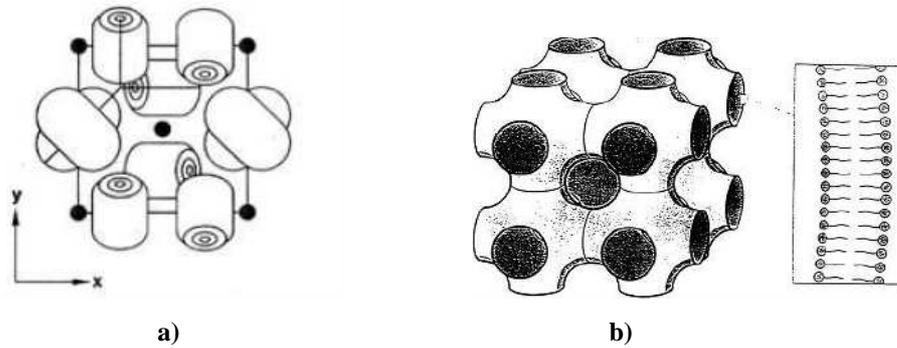


Figura 2.8: Representaciones esquemáticas de mesofases cúbicas.

Las regiones de existencia de los diferentes dominios hacen que, en muchos casos, se pueda predecir la continuidad de una mesofase respecto de otra. Estos cambios de fase se pueden lograr, como se mencionó anteriormente, por modificación de la concentración o de la temperatura.

La caracterización y reconocimiento de las diferentes fases se hace relativamente fácil por polarizadores cruzados, debido a que presentan diferentes texturas y muchas veces no es necesario una tipificación por rayos X. Estructuras tipo vetas oleosas en las laminares, abanicos en la hexagonal y falta de birrefringencia en la cúbica, entre otras, son algunas de estas particularidades que presentan estas fases. No hay que dejar de lado otras características como la viscosidad, la concentración y la temperatura. Por ejemplo, la viscosidad en los cristales líquidos laminares es un punto importante a tener en cuenta, debido a que los desplazamientos interlaminares hacen que esta sea menor que en el resto de las mesofases.

El enfriamiento de las mesofases, muchas veces no produce la separación del anfifilo cristalino sino la aparición de unas fases llamadas *gel* y *coagel*, que por posterior enfriamiento o por envejecimiento dan sólidos cristalinos. Su formación depende de diversas circunstancias como son la naturaleza del anfifilo, el método de enfriamiento y la falta de gérmenes de nucleación, además del tipo de contraión.

El gel es una jalea translúcida, muy rígida y metaestable. Sin embargo, en algunos casos puede ser una fase completamente estable, que puede aparecer al mezclar a temperatura ambiente agua y jabón, en forma espontánea [9]. Esta fase conserva las

propiedades de la solución, excepto la fluidez (gel) [10] y en otros casos se forma una masa opaca (coagel).

La difracción de rayos X de coagel da líneas características de jabón sólido, independientemente del contenido de agua del sistema [11] y se puede considerar como una dispersión de jabón sólido hidratado [12]. Una vez seco, en el microscopio óptico, se presenta como un polvo granular blanco que pareciera estar formado por haces de fibras. Esto se presenta también cuando es observado en el microscopio electrónico [13,14]. Son fibras blancas, a veces de varios centímetros de largo, usualmente formados por haces ultramicroscópicos (excepto en su longitud), que forman un fieltro blanco opaco. Pueden ser anhidras pero usualmente contienen agua [15-17] y a veces su apariencia macroscópica es granular, más que fibrosa. Las fibras persisten a nivel microscópico.

Esta fase antiguamente fue llamada "coágulo fibroso" (*curd fibers*) [13,14] y es estable a temperatura ambiente [18].

Parte del agua presente en el coagel está libre, retenida por capilaridad en los poros entre las fibrillas [19] y otra parte está integrada a la estructura.

El gel presenta difractogramas muy diferentes de los que presenta el coagel [20]. En razón de la rigidez del gel, la cristalización es muy lenta y parcial, de modo que el coagel, de hecho, es un conglomerado de fibras cristalinas impregnadas de gel. La obtención de un gel rigurosamente exento de cristales depende de la naturaleza del catión y de la proporción agua - jabón en la mezcla [21].

Visto en el microscopio de luz polarizada, el gel presenta texturas distintas de las que presentan las mesofases de las cuales proviene. Se observan zonas fuertemente birrefringentes en forma de bastoncillos, rodeados de zonas difusas.

La mejor manera de diferenciar al gel de la fase mesomorfa es por difracción de rayos X [22].

La estructura del gel es laminar, formada por un apilamiento de hojas planas, paralelas y equidistantes, y de gran extensión comparada con el espesor. El espesor es el de una molécula de anfifilo completamente estirada [22]. Las moléculas en este sistema están dispuestas normalmente a la superficie de la lámina, con las cabezas polares alternadas, en cada cara de la lámina y las cadenas dispuestas en un arreglo hexagonal o puede ser ortorrómbica bidimensional, cuando se observa desde una de las caras [22,23]. Esta estructura laminar hace que a veces presente texturas parecidas a las de la mesofase laminar entre polaroides cruzados.

La formación del gel es una solución de compromiso al conflicto entre la tendencia a separarse de los grupos polares ionizados y la tendencia a cristalizar de las cadenas hidrocarbonadas, que se encuentran por debajo de su punto de fusión.

2.4 Liposomas

En 1965, Bangham creó, sin proponérselo, los primeros liposomas en un laboratorio mientras valoraba el efecto de los fosfolípidos en la coagulación sanguínea [24].

Los liposomas (figura 2.9) están formados por una capa (unilamelares) o más de una (multilamelares) lipídicas o fosfolipídicas que se cierran sobre si mismas presentando forma esférica que alojan un interior hidrofílico. Estos fosfolípidos son esencialmente naturales, bidegradables, no tóxicos y no inmunogénicos [25].

El diámetro de los liposomas varía entre 20 nm y algunos micrómetros y el espesor de la bicapa se encuentra ~ 4 nm. [26].

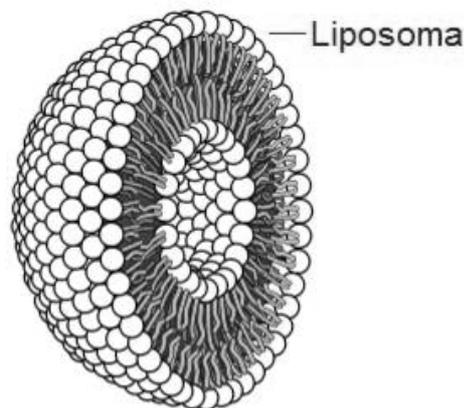


Figura 2.9: Representación de la estructura de un liposoma unilaminar.

Los fosfolípidos son tensioactivos que presentan las características típicas de un surfactante: cabeza polar, con una, dos cargas o neutra y una o más colas apolares que

varían en la longitud de sus cadenas hidrocarbonadas. Estas cadenas pueden estar saturadas o no.

Dentro de las características generales que presentan los liposomas encontramos a la permeabilidad, la carga superficial, la temperatura de transición y el parámetro crítico de empaquetamiento.

En cuanto a la permeabilidad, las membranas lipídicas son semipermeables, por lo que sustancias liposolubles, el agua y las moléculas pequeñas pueden atravesarlas con facilidad.

La carga superficial de los liposomas crea un campo eléctrico que afecta a la estructura de la bicapa, a su fluidez y al transporte de moléculas a través de la membrana [27]. Además la carga superficial juega un papel trascendental en la estabilidad coloidal de los liposomas. Los procesos de agregación y fusión de liposomas están controlados, en gran parte, por la repulsión o atracción de sus superficies lipídicas.

A partir del estudio de las fuerzas de interacción entre liposomas, la físico-química es clave para la comprensión de los factores de su estabilización. En la mayoría de los sistemas coloidales estas fuerzas de interacción son modelizadas a partir de la teoría DLVO [28,29], de Derjagin, Landau, Verveij y Oberbeek; que son los científicos, dos primeros rusos y dos segundos holandeses, que la formularon. En esta teoría se calcula la interacción entre partículas como potencial DLVO que se obtiene sumando algebraicamente la atracción de Van der Waals entre las partículas (V_A) y la repulsión electrostática (V_R) entre partículas cargadas con el mismo signo. A muy pequeña distancia, otro tipo de interacciones, como las de hidratación o las de Born, producen una fuerte repulsión.

La figura 2.10 muestra la típica curva de potencial total o V_{DLVO} que se obtiene por combinación de las ecuaciones de atracción, representada por la curva inferior y repulsión representada por la curva superior.

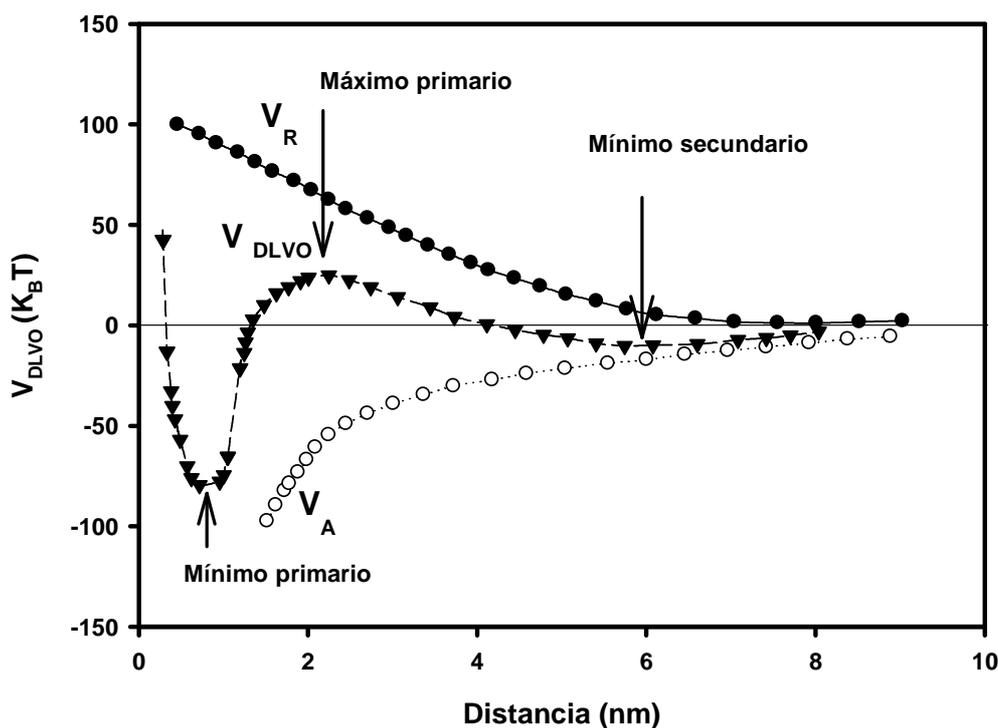


Figura 2.10: Curva típica del potencial DLVO: suma de un potencial atractivo de Van der Waals y un potencial repulsivo electrostático, más la repulsión de contacto a muy pequeña distancia.

Una de las características más importantes de los liposomas es la fluidez o movilidad de la bicapa lipídica, la cual depende de la temperatura de transición del fosfolípido. En los capítulos 4 y 6 se describen las características particulares de los lípidos utilizados en el desarrollo de monocapas con fosfolípidos y en la formación de liposomas respectivamente.

En términos generales, la temperatura de transición (T_c) de los lípidos que forman los liposomas es la temperatura a la cual se comienzan a fundir las cadenas hidrocarbonadas. Por lo tanto, a partir de esta, los fosfolípidos pueden pasar de una fase cristalina a una cristalina líquida (mesofase) [30]. La T_c es propia de cada lípido en particular y es muy útil para evaluar el estado biofísico de la membrana de la cual se encuentra formando parte el lípido. A bajas temperaturas los lípidos se encuentran en un estado de gel cristalino, estructura más bien rígida, donde su movilidad está restringida. Al aumentar la temperatura se produce una pretransición de fase que tiene que ver con el aumento en la movilidad rotacional de las cabezas polares y la aparición de ondulaciones en la superficie de los liposomas. Hay que tener en cuenta que los

liposomas se forman a una temperatura superior a la de transición del lípido. Si el sistema está formado por una mezcla de lípidos, la temperatura será específica para esa mezcla.

La última característica general que hay que tener en cuenta en los liposomas es el parámetro crítico de empaquetamiento, el cual puede predecir como va a ser la forma del agregado cuando moléculas del fosfolípido se reúnan para formar estructuras supramoleculares, como los liposomas.

A la hora de modelar el tipo de agregación y el empaquetamiento de las moléculas anfifílicas se suele definir el parámetro de empaquetamiento crítico P_c como [31]:

$$P_c = \frac{v}{a_c l_c} \quad (\text{ec: 2.4})$$

siendo v el volumen de la parte hidrofóbica de la molécula anfifílica, a_c el área crítica de la cabeza polar y l_c la longitud crítica de las cadenas hidrocarbonadas. Para lípidos de una sola cola hidrofóbica, la cabeza polar es relativamente grande comparada con la cola ($v < a_c l_c$) y se agregan en forma de micelas esféricas si $P_c < 1/3$ o micelas cilíndricas si $1/3 < P_c < 1/2$. Los lípidos de doble cadena, al tener un estructura geométrica similar a un tubo cilíndrico, cumple la relación $v \sim A_C L_C$, es decir, $1/2 < P_c < 1$ y se autoagregan en forma de láminas, micelas en forma de disco o liposomas. Existen algunos lípidos de doble cadena que debido a su estructura tienen un área de la cabeza polar pequeña comparado con la sección de la colas y cumplen que $v > a_c l_c$ y $P_c > 1$. Estos lípidos suelen formar estructuras de micelas o mesofases inversas.

2.5 Diagramas de Fase de Sistemas con Surfactantes

Los primeros estudios sobre el tema fueron realizados por McBain [32-35]. Mediciones de diferentes propiedades de los sistemas surfactante-solución en función de la temperatura, pueden llevar a la realización de gráficos de temperatura en función de la

composición de la muestra, en los cuales se pueden ubicar los dominios de existencia de las diferentes fases o mesofases presentes.

La descripción de las mesofases que se pueden encontrar en estos sistemas se ha realizado en la sección anterior (2.3) y como ya se ha mencionado, no necesariamente en un sistema tienen que estar presentes todas las fases descritas al modificarse la temperatura o la composición de la muestra. Puede suceder que en un sistema liotrópico cuando se aumenta la concentración del tensioactivo, la fase hexagonal no aparezca antes que la laminar y solo se note la presencia de esta última. La presencia de una o más mesofases y la variación de estas con la temperatura son características propias de cada sistema.

En la siguiente figura (2.11) se representa en un gráfico, temperatura en función de la composición, de las diferentes mesofases que se pueden formar al variar alguno de estos parámetros.

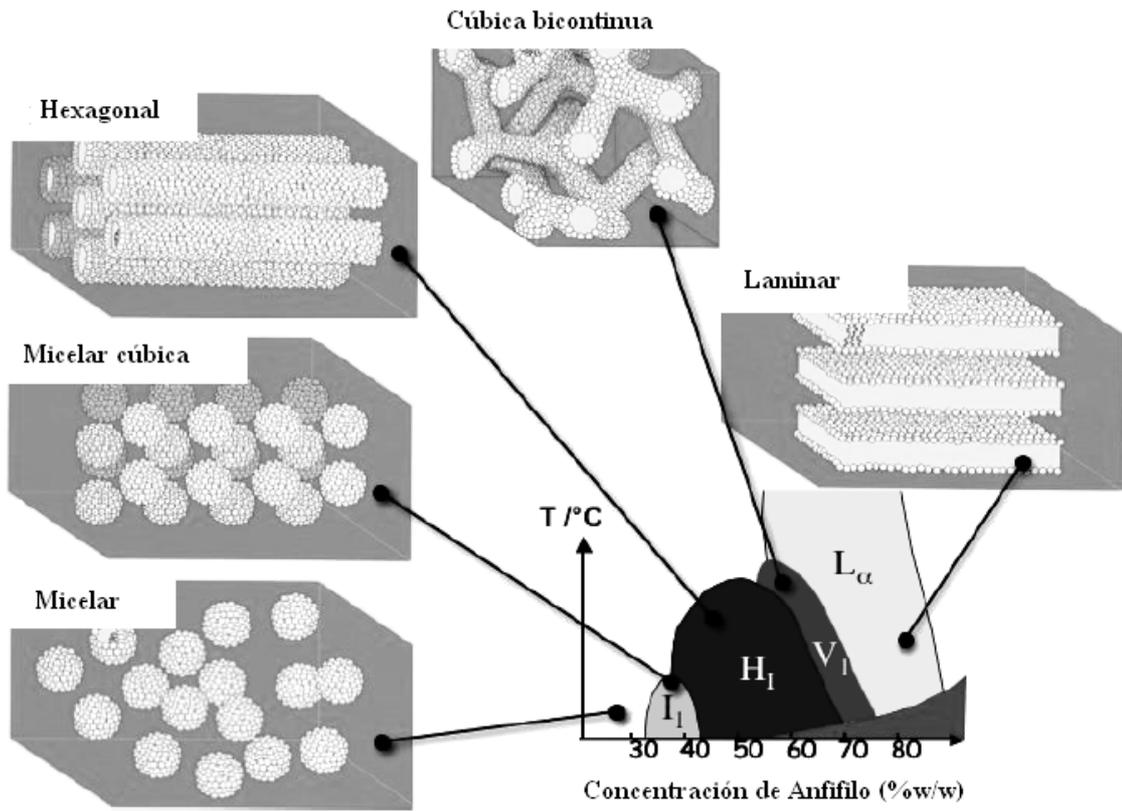


Figura 2.11: Diagrama modelo temperatura vs. composición de surfactante donde se marcan los límites entre diferentes mesofases liotrópicas y se esquematizan cada una de ellas.

2.6 Referencias del Capítulo

- [1]- D. Mövius, R Miller. *Hidrophile and Lipophile balance of surfactants and solid particles*. Studies in Interface Science. 9 (2000).
- [2]- O. Blanco, J. Pérez-Gil. *European Journal of Pharmacology*. 568 (2007) 1.
- [3]- P. Messina. *PhD Thesis*. Universidad Nacional del Sur. Ed. UNS. (2003). Argentina.
- [4]- P. Mukerjee. *Journal of Physical Chemistry*. 62 (1958) 1404.
- [5]- E. Bair, C. Cruz. *Journal of American Chemical Society*. 73 (1951) 1129.
- [6]- C. Cruz . *Journal of American Chemical Society*. 72 (1950) 3676.
- [7]- M. Mc Dowell, C. A. Cruz. *Journal of American Chemical Society*. 73 (1951) 2173.
- [8]- K. Mittal, P. Mukerjee. *Micellization, solubilization and microemulsions*, Plenum Press. 1 (1977) 1. New York.
- [9]- J. Vincent, A. Skoulios. *Acta Crystallographica*. 20 (1966) 441.
- [10]- V. Luzzatti, H. Mustacchi, A. Skoulios, F. Husson. *Acta Crystallographica*. 13 (1960) 660.
- [11]- T. Lomer. *Acta Crystallographica*. 5 (1952) 11.
- [12]- P. Winsor. *Chemical Review*. 68 (1968) 1.
- [13]- A. Alexander, P. Johnson. *Colloid Science*. University Press, Oxford (1950).
- [14]- R. Vold, R. Ferguson. *Journal of American Chemical Society*. 60 (1938) 2066.
- [15]- P. Zsigmondy, W. Bachmann. *Kolloid Zetschrift*. 11 (1912) 152.
- [16]- J. Mc Bain, C. Salmon. *Proceedings of The Royal Society A*. 98 (1921) 395. London.
- [17]- J. Mc Bain, R. Vold, M. Vold. *Journal of American Chemical Society*. 60 (1938) 1866.
- [18]- R. Vold, M. Vold. *Journal of American Chemical Society*. 61 (1939) 808.
- [19]- J. Mc Bain, M. Vold, S. Johnston. *Journal of American Chemical Society*. 63 (1941) 1000.
- [20]- D. Dervichian, K. Lechamp. *Bulletin de la Société Chimique de France*. 12 (1945) 189.
- [21]- M. Naudet. *Revue Française des Corps Gras*. 17 (1970) 591.

- [22]- M. Vold, M. Macomber, R. Vold. *Journal of American Chemical Society*. 63 (1941) 168.
- [23]- J. Vincent, A. Skoulios. *Act Crystallographic*. 20 (1966) 441.
- [24]- A. Bangham, M. Standish, J. Watkins. *Journal of Molecular Biology*. 13 (1965) 238.
- [25]- D. Lasic. Novel applications of liposomes. *Trends in biotechnology*. 16 (1998) 7.
- [26]- D. Lasic. *Liposomes. From Physics to Applications*. (1993). Amsterdam.
- [27]- G. Cevc, D. Marsh. *Phospholipids Bilayers*. Wiley-Interscience Publications. (1984). New York.
- [28]- B. Deryagin, L. Landau. *Acta Physicochim*. 14 (1941) 633.
- [29]- E. Verwey, J. Overbeek. "*Theory of Stability of Lyophobic Colloids*". (1948). Amsterdam.
- [30]- R. Rowe, P. Sheskey, M. Quinn. *Handbook of Pharmaceuticals Excipients*. 6th ed., Ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association (2009) 592. London-Chicago.
- [31]- J. Israelachvili. *Intermolecular and Surfaces Forces*. 2th Ed. Academic Press. (1992) London.
- [32]- J. Mc Bain, W. Lee. *Oil & Soap*. 20 (1943) 17.
- [33]- J. Ricci. *The Phase Rule and Heterogeneous Equilibrium*. Van Nostrand. (1951). New York.
- [35]- R. Vold, R. Reivere, J. McBain. *Journal of American Chemical Society*. 63 (1941) 1293.
- [35]- J. Mc Bain, O. Bolduan, S. Ross. *Journal of American Chemical Society*. 65 (1943) 1873.

Capítulo 3

Comportamiento de Fases del Palmitato de Ascorbilo (Asc_{16}) en Solución.

3.1 Introducción

El estudio del comportamiento de los surfactantes en solución provee la información necesaria para poder reconocer los dominios de existencia de las diferentes fases que se pueden llegar a formar a medida que se varía la temperatura, la composición del medio y la concentración del compuesto en estudio.

Los diagramas de fases describen las temperaturas de transición a las cuales aparecen las diferentes fases. La importancia de las mesofases radica en que son capaces de solubilizar fármacos insolubles en agua. Los derivados de ascorbilo pueden, bajo determinadas condiciones de temperatura y concentración, generar diferentes mesofases.

El palmitato (hexadecanoato) de ascorbilo (Asc_{16}) puede ser estudiado como antioxidante, en cambio aquí interesan las propiedades anfífilas y su capacidad para

formar estructuras ordenadas, como los cristales líquidos. Estas mesofases pueden tener un rol importante en la formulación de nuevas formas farmacéuticas.

En este capítulo se desarrolla el diagrama de fases completo del palmitato de ascorbilo en agua y en tres soluciones diferentes de polietilenglicol 400 (PEG₄₀₀).

Ambrosi y colaboradores [1] determinaron que las temperaturas de transición de los agregados de vitamina C pueden ser modificadas por el agregado de cosolventes. En [1] se observa que el PEG₄₀₀ disminuye estas temperaturas. Por lo expuesto, se utilizó el cosolvente anteriormente mencionado para disminuir las temperaturas de transición de los sistemas Asc₁₆-agua de manera que la aparición de las mesofases que se van formando tanto termotrópica como liotrópicamente, ocurra a temperaturas cercanas a las fisiológicas (~37 °C) incluso de ser posible, a temperatura ambiente (~ 25 °C). De esta manera, y como se mencionó en el capítulo 1, aquí se busca la disminución de las temperaturas mencionadas para que los cristales líquidos sean usados como vehículo de diferentes principios activos en medicina humana.

Por otro lado, se realiza un estudio detallado del comportamiento del agua en el sistema Asc₁₆-Agua debido a que la presencia o no de esta última, modifica las características de las mesofases que se obtienen.

3.2 Consideraciones Generales

3.2.1 Palmitato de Ascorbilo (Asc₁₆)

El palmitato de ascorbilo (Asc₁₆) se forma por la sustitución de un hidrógeno, del grupo -OH que se encuentra en la posición 6 del ácido ascórbico, por una molécula de ácido palmítico o hexadecanoico. De esta manera se forma el éster palmítico del ácido ascórbico cuya estructura se presenta en la figura 3.1. Este compuesto posee tres grupos -OH libres en las posiciones 2 ($pK_a = 11,6$), 3 ($pK_a = 4,2$) y 5 (un hidroxilo secundario

del grupo) [2]. Se ha elegido esta forma de representación porque es la que modela mejor a la molécula en una suspensión real [3]

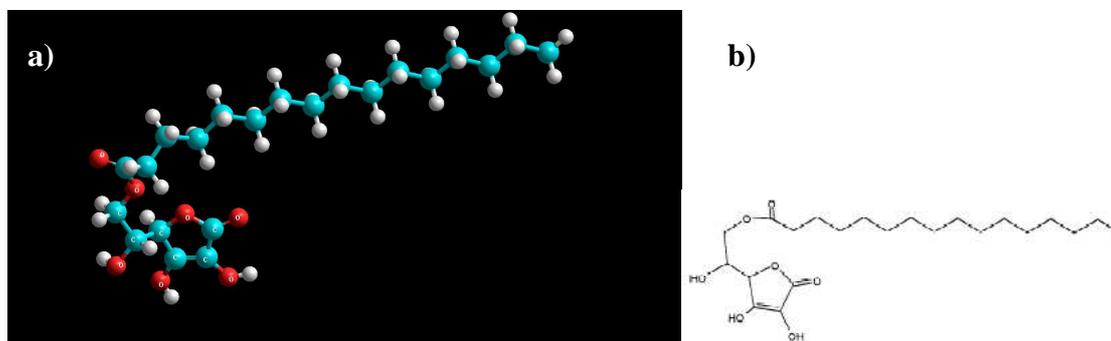


Figura 3.1: a) Representación de la molécula de Asc₁₆ en 3D realizada con el programa Hiperchem 8 professional. En Celeste: C, blanco: H, rojo: O. b) Representación de la molécula de Asc₁₆ en 2D.

Este compuesto fue sintetizado con el propósito de aumentar la lipofiliidad de la vitamina C y extender sus propiedades antioxidantes a sistemas lipídicos [4]. Su eficacia antioxidante es comparable a la de otros agentes naturales de reducción, tales como los carotenos, polifenoles y tocoferoles [5]. Se puede utilizar sólo o en combinación con estos compuestos como estabilizantes (antioxidantes) para aceites en productos farmacéuticos y alimenticios.

El Asc₁₆ es esencialmente no tóxico y no irritante [6]. Su estructura molecular le permite, además, formar agregados que ofrecen un ambiente óptimo para la solubilización de fármacos hidrofóbicos y fácilmente degradados u oxidados cuando se exponen a la luz, calor, oxígeno disuelto, y otras especies productoras de radicales [7].

Palma y colaboradores [8] detectaron una gran variedad de estos agregados supramoleculares formados por derivados anfifílicos de ácido ascórbico en agua, donde se incluye entre estos al Asc₁₆.

La OMS (Organización Mundial de la Salud) estima como aceptable una ingesta diaria de Asc₁₆ de 1,25 mg/ kg de peso corporal. Por otra parte, la dosis letal 50, dosis que mata al 50% de una determinada población en estudio por una vía de administración definida es: DL₅₀ (ratón – oral): 25g / kg y DL₅₀ (rata – oral): 10g / kg.

Si bien la estructura de la molécula presenta una porción polar (anillo del ácido ascórbico) y una porción apolar (cadena alifática), la baja solubilidad del compuesto puede llegar a limitar sus propiedades tensioactivas. La solubilidad del Asc₁₆ a 25 °C, determinada en solución acuosa, resulta de $8,1 \times 10^{-7}$ M [9].

De todas maneras, esta lipofilicidad no le imposibilita formar agregados supramoleculares bajo las condiciones de temperatura y concentración determinadas por punto de Krafft.

Este compuesto no forma micelas a temperatura ambiente ni luego que se sobrepasa la temperatura de transición (62 °C). Por esta razón no se ha podido determinar ni encontrar en bibliografía valores de *cmc*. Sin embargo, para los homólogos de 8 y 10 átomos de carbono y para la sal sódica del Asc₁₆ se han determinado por diferentes técnicas y publicado los valores de *cmc* correspondientes [9-11]. La *cmc* de la sal sódica del Asc₁₆ fue encontrada en bibliografía en aproximadamente 8×10^{-4} M [9] a la temperatura crítica.

Minardi y colaboradores [12], reportaron una relación general entre la carga de la molécula un surfactante y su *cmc*, con la cual se podría estimar la *cmc* para el Asc₁₆. Según esta relación la $cmc_{Asc16} \approx 8 \times 10^{-5}$ M o $3,4 \times 10^{-5}$ de fracción en masa. Se observa que este valor es unas 100 veces mayor que la solubilidad del compuesto indicada anteriormente.

Una evaluación de otro tipo, aunque en la misma dirección, se ha realizado utilizando el valor de la *cmc* del Asc₈ = $6,1 \times 10^{-3}$ M y el del Asc₁₀ = $7,7 \times 10^{-4}$ M detallados en [2] a las temperaturas críticas de transición que fueron de 18,5 y 34,5 °C respectivamente. En la figura 2 de esta referencia se grafica el \log_{cmc} de los derivados de vitamina C en función de n_c (número de átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada). Con el valor de $n_c = 16$ se ha extrapolado, Estimándose en $cmc_{Asc16} = 1,5 \times 10^{-6}$ M ($6,6 \times 10^{-7}$ fracción en masa). Este valor se encuentra alrededor de dos veces su solubilidad. De ambos estudios se concluye que la solubilidad a temperatura ambiente está muy por debajo de la *cmc* del Asc₁₆.

Todos los derivados del ácido ascórbico son insolubles en agua a temperatura ambiente, excepto el Asc₈. Cuando se los calienta por encima de una temperatura específica para cada derivado, su solubilidad aumenta. Sin embargo, el enfriamiento del

sistema no trae aparejado la precipitación del derivado, sino la formación de estructuras supramoleculares con ciertas características de denominadas *coageles*. [13] La consistencia semisólida de estos geles, es una interesante propiedad para diseñar formas de dosificación pudiendo, de esta manera, solubilizar y estabilizar algunos de los diferentes fármacos usados por ejemplo, en dermatología [14].

3.2.2 Polietilenglicol 400 (PEG₄₀₀)

Los polietilenglicoles (PEG) son ampliamente utilizados en una variedad de formulaciones farmacéuticas, incluidas las preparaciones parenterales, tópicas dermatológicas y óticas, oftálmicas, orales y rectales. Estos compuestos se han usado experimentalmente en matrices poliméricas biodegradables para sistemas de liberación controlada [6]. Ambrosi y colaboradores [1] usaron estos cosolventes farmacéuticos en sistemas de ascorbil-6-O-alcanoatos, incluyendo al Asc₁₆. A baja concentraciones, encontraron que disminuye la temperatura de transición a la que aparecen las diferentes mesofases.

El polietilenglicol (PEG) utilizado en este trabajo es el PEG₄₀₀ o Macrogol 400 (figura 2.14) cuya masa molecular promedio está entre 380 y 420. Su fórmula resumida es HO-CH₂-(CH₂-O-CH₂)_m-CH₂-OH donde m es 8,7 en promedio [6]. La figura 3.2 representa a la molécula del polímero. Es soluble en agua, en alcoholes, acetona, benceno, glicerina y otros polietilenglicoles. Tiene un punto de fusión de 4-8 °C y una densidad de 1,120 g/cm³ [6].

La toxicidad del PEG₄₀₀ en conejos por vía oral dada por la DL₅₀ es 26,8 g polímero/ kg de peso del animal [6].

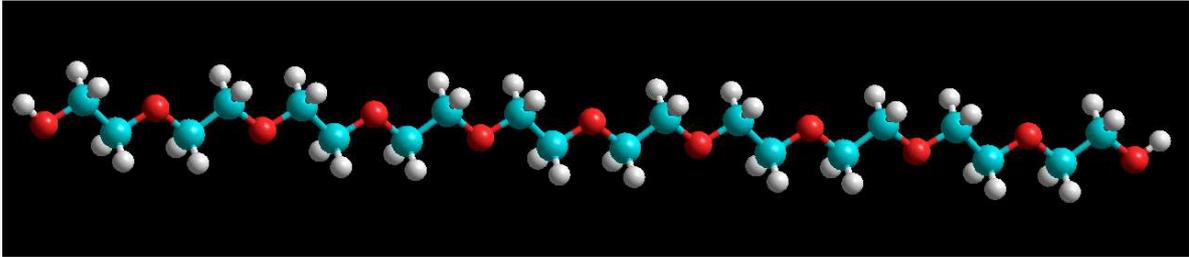


Figura 3.2: Representación de la molécula de polietilenglicol 400 (PEG₄₀₀) en 3D realizada con el programa Hiperchem 8 professional. En Celeste: C, blanco: H, rojo: O.

3.3 Objetivo

El objetivo de las investigaciones que se detallan en este capítulo es obtener y caracterizar las mesofases liotrópicas y termotrópicas formadas por suspensiones de ASC_{16} en diferentes solventes para posibles usos farmacéuticos.

3.4 Experimental

Se realizaron 4 diagramas de fase utilizando calorimetría Diferencial de Barrido (CDB), microscopía óptica de luz polarizada (MOP), espectroscopía UV-visible y conductividad.

Para obtener y caracterizar las mesofases liotrópicas y termotrópicas formadas por suspensiones de Asc₁₆ en diferentes solventes acuosos, se llevaron a cabo los diagramas de fase correspondientes a las siguientes suspensiones:

- a) Asc₁₆ - agua pura
- b) Asc₁₆ -75% agua y 25% PEG₄₀₀
- c) Asc₁₆ -50% agua y 50% PEG₄₀₀
- d) Asc₁₆ -25% agua y 75% PEG₄₀₀

3.4.1. Materiales

Los materiales utilizados fueron: palmitato de ascorbilo (Asc₁₆) marca Fluka (Italia). El PEG₄₀₀ Parafarm (Argentina) y el alcohol marca Cicarelli (Argentina). Todos los reactivos fueron de grado analítico (pro análisis) y se utilizaron sin purificación previa. En todos los experimentos se utilizó agua tridestilada marca Allchemistry (Buenos Aires, Argentina).

3.4.2. Métodos

Todos los sistemas fueron estudiados mediante calorimetría diferencial de Barrido (CDB) y microscopia de luz polarizada (MOP). Además, estos resultados, fueron corroborados por conductividad. Los datos obtenidos por CDB y conductividad se compararon con los obtenidos por espectroscopia UV-Visible. Algunas de las transiciones encontradas fueron comparadas con datos obtenidos de la referencia [15].

3.4.2.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)

La Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) es la técnica experimental más directa y precisa para caracterizar sistemas moleculares bien definidos, cuyas estructuras están estabilizadas por numerosas fuerzas débiles y por consiguiente, susceptibles de experimentar transiciones conformacionales y/o cambios de fase al modificar la temperatura [16].

Esta técnica es ampliamente utilizada en el estudio de sistemas binarios o multicomponentes que contienen surfactantes. Su uso nos permite medir la capacidad calorífica aparente de una disolución macromolecular como una función continua de la temperatura, obteniéndose así el *termograma*. A partir de esta función, es posible, si el sistema macromolecular está bien definido, determinar los parámetros termodinámicos asociados a la transición inducida por la temperatura: cambios de entalpía (ΔH), de entropía (ΔS), de energía libre de Gibbs (ΔG) y de la capacidad calorífica (ΔC_p) [17]

Además de los surfactantes, el uso de esta técnica es muy útil para determinar el estado del agua. Su comportamiento es sensible a la presencia de interfases adyacentes de diversa naturaleza y esta relación le imparte características que son muy diferentes a las que puede tener cuando se encuentra en solución o en la solución en masa. Por lo tanto, el análisis térmico del agua y del surfactante, pueden dar valiosa información del sistema, como se detalla en la referencia [18], pudiéndose inferir de qué manera se encuentran las superficies del surfactante en función al comportamiento del agua.

Las mediciones se realizaron con un calorímetro diferencial de barrido Q20 (TA Instruments).

Las dispersiones fueron preparadas mezclando los componentes (Asc_{16} en agua y Asc_{16} en soluciones de PEG₄₀₀) en las proporciones adecuadas en tubos de vidrio cerrado.

Se calentaron a 80 °C y posteriormente se homogeneizaron en un baño ultrasónico durante 20 minutos a ~ 60 °C, dejándose reposar, en los tubos, herméticamente cerrados y protegidos de la luz.

Las concentraciones utilizadas para el sistema Asc_{16} - agua en fracciones masa/masa (w/w) fueron de: [C] = 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70; 0,80; 0,90 y 0,95.

Para los sistemas Asc₁₆- PEG₄₀₀ en fracciones masa/masa (w/w) las concentraciones fueron de: [C] = 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70; 0,80 y 0,90.

3.4.2.1.1 Procedimiento Realizado para cada Corrida de CDB

Las muestras para cada corrida fueron preparadas en cazoletas (“pans”) de cierre hermético de aluminio y pesadas en balanza analítica a la quinta cifra decimal.

La programación de la corrida se realizó de la siguiente manera:

Se comenzó enfriando las muestras a -20 °C durante 5 minutos. Luego se fue aumentando la temperatura hasta 150 °C a una velocidad de 5 °C min⁻¹. Por último, se mantuvo a 150 °C por un minuto.

La elección de la temperatura de enfriamiento se debió a que para hacer un análisis del comportamiento del agua en sistemas dispersos es necesario asegurarse que el agua se encuentre congelada, con el propósito de detectar los diferentes tipos de agua que se encuentren en la muestra.

El punto de fusión en bibliografía del Asc₁₆ puro [15] se encuentra entre 113 y 114 °C. La elección de la temperatura final a las que fueron calentadas las muestras se debió a que por encima de esta temperatura se podría llegar a encontrar al Asc₁₆ en un estado más fluido sin llegar a su temperatura de descomposición. Sin embargo, los termogramas de las muestras calentadas hasta 150 °C no evidenciaron la presencia de picos exotérmicos que indicarían la descomposición del Asc₁₆.

Para reducir al mínimo la descomposición del Asc₁₆ por el oxígeno [19,20], se minimizó el contacto entre el aire y las muestras durante la preparación por la saturación del recipiente con N₂.

Una vez que se determinan los intervalos de temperaturas dentro de los cuales se producen las transiciones, es necesario conocer cuales son las mesofases formadas dentro de estos. Para ello se utilizó la microscopia óptica de luz polarizada con platina de temperatura controlada.

3.4.2.2 Microscopía Óptica de Luz Polarizada (MOP) con Platina de Calentamiento

La microscopía óptica se realizó con un microscopio de polarización Nikon Eclipse E- 200 POL (Tokio, Japón). A través de esta técnica, se puede determinar la presencia de las diferentes mesofases en función de los cambios de temperatura.

Las muestras observadas al microscopio fueron las mismas que se usaron para obtener los termogramas por CDB.

Cada una de las muestras fue puesta sobre porta y cubre dentro de una cavidad que posee la platina calefaccionadora. La elección de las temperaturas a las cuales se observaron las muestras fue determinada previamente por CDB. De esta manera, se puso en evidencia la presencia de cada mesofase a la temperatura de transición y además, se pudo observar como se produce el cambio de estas fases al variar la temperatura.

Las microfotografías fueron tomadas con y sin polarizadores cruzados, y en algunos casos con un intercalado de una placa de retardación de 1λ .

3.4.2.3 Conductividad

Para la realización de las medidas de la conductividad específica se utilizó una celda de inmersión y un conductímetro automático, OAKTON serie 510 (Singapur). El conductímetro fue calibrado con las soluciones de KCl 0,1 M.

La conductividad específica (κ) se representa como una función de la concentración. El cambio en la pendiente de la curva (punto de quiebre) fue indicativo de un cambio notable en la agregación del sistema. Esta metodología, aplicable en el caso de surfactantes iónicos, es una manera simple de obtener valores de temperaturas de transición críticas y es otra forma de contrastar los datos obtenidos por CDB.

Las muestras preparadas para corroborar las temperaturas de transición fueron: 0,1; 0,3 y 0,6 en fracción en masa de Asc_{16} en agua. Luego, se procedió a medir la conductividad variando la temperatura desde 30 °C hasta 80 °C. Esta variación se realizó cada 2 °C esperando 2 minutos en cada punto. De esta manera se registró la curva de conductividad en función de la temperatura.

3.4.2.4 Espectroscopia Ultravioleta (UV)

Para realizar esta determinación se utilizó un espectroscopio UV-visible marca Agilent modelo 8453 (USA).

Como se mencionó anteriormente, las temperaturas de transición fueron determinadas por CDB. La espectroscópica UV fue elegida, por su simplicidad operativa, para corroborar transiciones de fase. Las medidas se efectuaron a $\lambda = 265$ nm, correspondiente a absorción del doble enlace conjugado entre el anillo ascórbico y uno de los carbonilos de la molécula.

En primer lugar se realizó una curva de calibrado utilizando un intervalo de concentraciones entre 0,04 y 0,4 fracción en masa de Asc₁₆. Las muestras se prepararon con el Asc₁₆ y una solución compuesta por: 1 ml de agua y otro ml de etanol.

El procedimiento para establecer la temperatura de transición por UV se realizó de la siguiente manera:

Las muestras de Asc₁₆ se prepararon en 2 ml de agua, se cubrieron de la luz y se calentaron a las diferentes temperaturas seleccionadas (30, 40, 50, 60, 62, 65, 70 y 80 °C) y se mantuvieron a sus respectivas temperaturas durante 10 minutos. Luego se tomó 1 ml del sobrenadante de cada suspensión, se les agregó un ml de etanol y se registraron las medidas.

3.5 Resultados y Discusión

A continuación se muestra el análisis de los sistemas de Asc₁₆ en agua y en tres soluciones acuosas de PEG₄₀₀, diagramas de fase de los 4 sistemas ensayados y estado del agua para el sistema Asc₁₆-agua.

3.5.1 Sistema Asc₁₆-Agua

En la bibliografía [7-9] se encuentran datos aislados sobre el comportamiento de fase de mezclas de Asc₁₆ – agua. En el presente trabajo se muestra en detalle el comportamiento de este sistema en un amplio rango de concentraciones y temperaturas.

La figura 3.3 muestra los termogramas obtenidos por CDB para el sistema de trabajo. Los picos superpuestos se deconvolucionaron con el programa Peakfit usando un modelo de Gauss. El diagrama de fase se graficó mostrando las diferentes zonas delimitadas por las temperaturas de transición

Con el propósito de realizar un mejor análisis y comprender los resultados del estudio, se dividió a los termogramas en dos regiones. Se analizaron las zonas entre 60 y 100°C y la región cercana de 0°C. En la primera, se establecieron las diferentes mesofases que se fueron formando al modificar la composición y la temperatura (termotrópica y liotrópicamente). En la segunda, se realizó un estudio de los diferentes tipos de agua que pueden ser encontrados en el sistema.

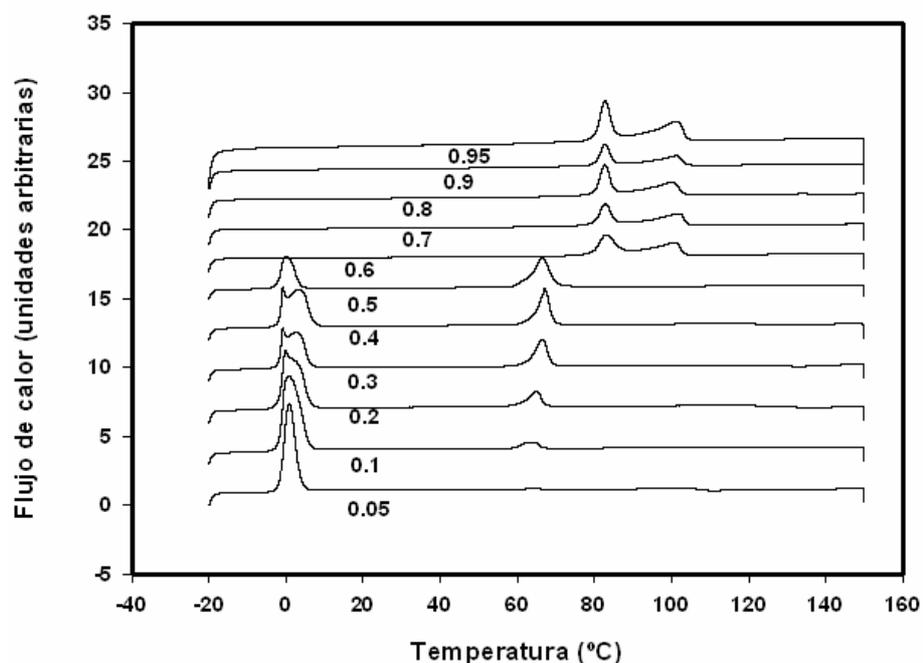


Figura 3.3: Termogramas CDB del sistema Asc₁₆-agua. Flujo de calor en función de la Temperatura. La ordenada se expresa en unidades arbitrarias para poder superponer las gráficas. El CDB provee las unidades de flujo de calor en Watt /gramo. Los números que aparecen por debajo de cada termograma indican la fracción en masa a la que fue realizada la corrida.

3.5.1.1 Diagrama de Fases del Sistema Asc16-Agua

La Figura 3.4 muestra el diagrama de fase obtenido por medidas de CDB y microscopia de luz polarizada. La determinación de la naturaleza de las diferentes fases presentes fue realizada por observación de texturas en el microscopio de polarización a diferentes concentraciones y temperaturas.

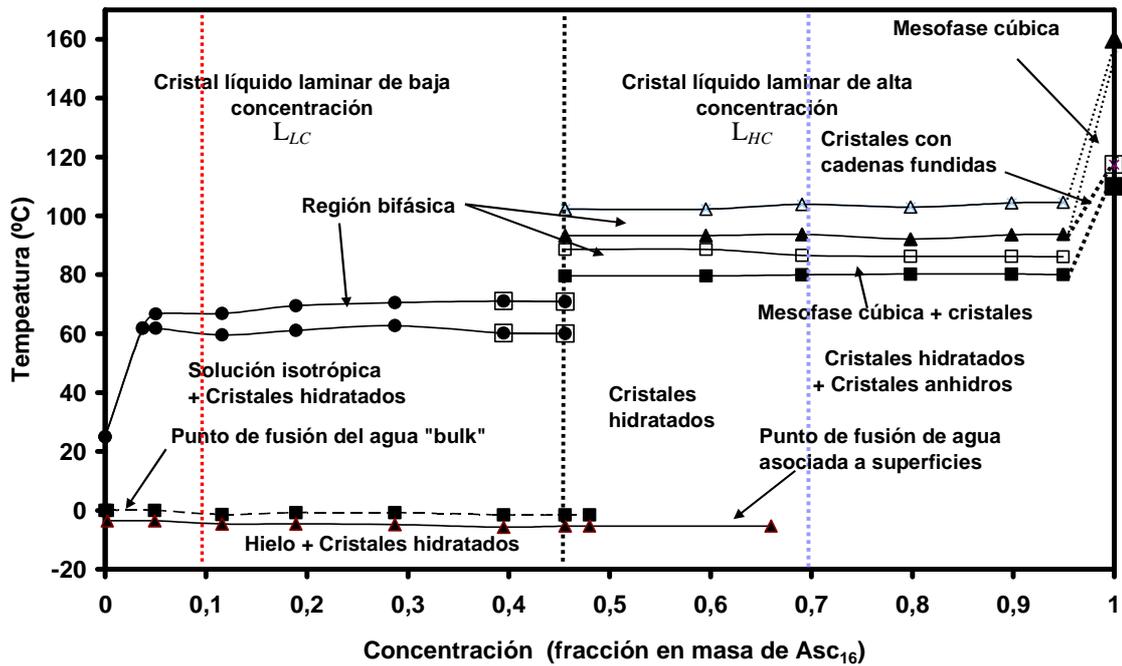


Figura 3.4: Diagrama de fase completo de Asc₁₆ en agua, donde se grafica temperatura en grados °C en función de la concentración en fracción en masa del surfactante.

En el diagrama de la figura anterior se observa que para cada concentración (fracción en masa) hay un conjunto de puntos determinados que le corresponden en el eje temperatura (°C). Como puede verse, entre fracción en masa de Asc₁₆ ~ 0 y 0,5 existe un tipo de comportamiento para el sistema y otro diferente que va desde esta concentración hasta 1. En el análisis que se realiza a continuación, no se tendrá en cuenta el comportamiento del agua porque se abordará en profundidad cuando se detalle la región cercana a 0 °C.

a) Análisis en el Intervalo de Temperaturas entre 60 °C y 90 °C

Aquí se dan dos ejemplos, uno por encima y otro por debajo de 0,5 de fracción en masa de Asc₁₆, de cómo se construyen cada una de las zonas del diagrama de fase de la figura 3.4. El resto de las zonas y puntos fueron determinados de la misma forma.

a.1) Construcción e Interpretación del Diagrama de Fase

A continuación, se mostrará como fue construido el diagrama de fase, trabajando con dos concentraciones usadas como ejemplos. Se usará los puntos 0,1 y 0,7 dado que aparecen texturas diferentes en cada caso.

- Se analiza en primer lugar, el intervalo de fracción en masa próximas al punto 0,1 (marcado ----- en el diagrama de fase de la figura 2.3).

En esta región se puede separar el gráfico en dos zonas: una cercana a 0 °C y otra cercana a 60 °C. En la primera zona se observan dos puntos, uno arriba (■) y otro abajo (▲). El primero corresponde al inicio de la transición del agua superficial (-4,62 °C) y el otro al inicio de la transición del agua en solución (-1,39 °C). El agua superficial es un tipo de agua influenciada por los grupos polares del Asc₁₆ y su punto de fusión se encuentra desplazado hacia menores temperaturas. El otro tipo de agua es el agua libre, la cual debería tener un punto de fusión cercano a 0 °C. Sin embargo, no llega a este valor porque se encuentra influenciada por los -OH del Asc₁₆.

Entre la región cercana a 0 °C y la cercana a 60 °C no se observan picos en el termograma de CDB, por lo que no se evidencian transiciones. Sin embargo, una vez que el agua funde, en el sistema se observan cristales hidratados inmersos en una solución isotrópica. Esto se corrobora por las microfotografías mostradas en la figura 3.5a. A esta misma concentración en la zona cercana a 60 °C se presentan 2 puntos (●), uno ~ 61 °C y otro ~ 67 °C. Este es el comienzo y final respectivamente del pico que corresponde a la transición de cristales hidratados a cristal líquido laminar de baja concentración. Esta transición se muestra claramente por microscopia de luz polarizada en la figura 3.5b. En esta, se manifiesta la presencia de figuras de mielina junto con cristales ~ 65 °C. Por encima de esta temperatura, el sistema se comporta como cristal líquido laminar.

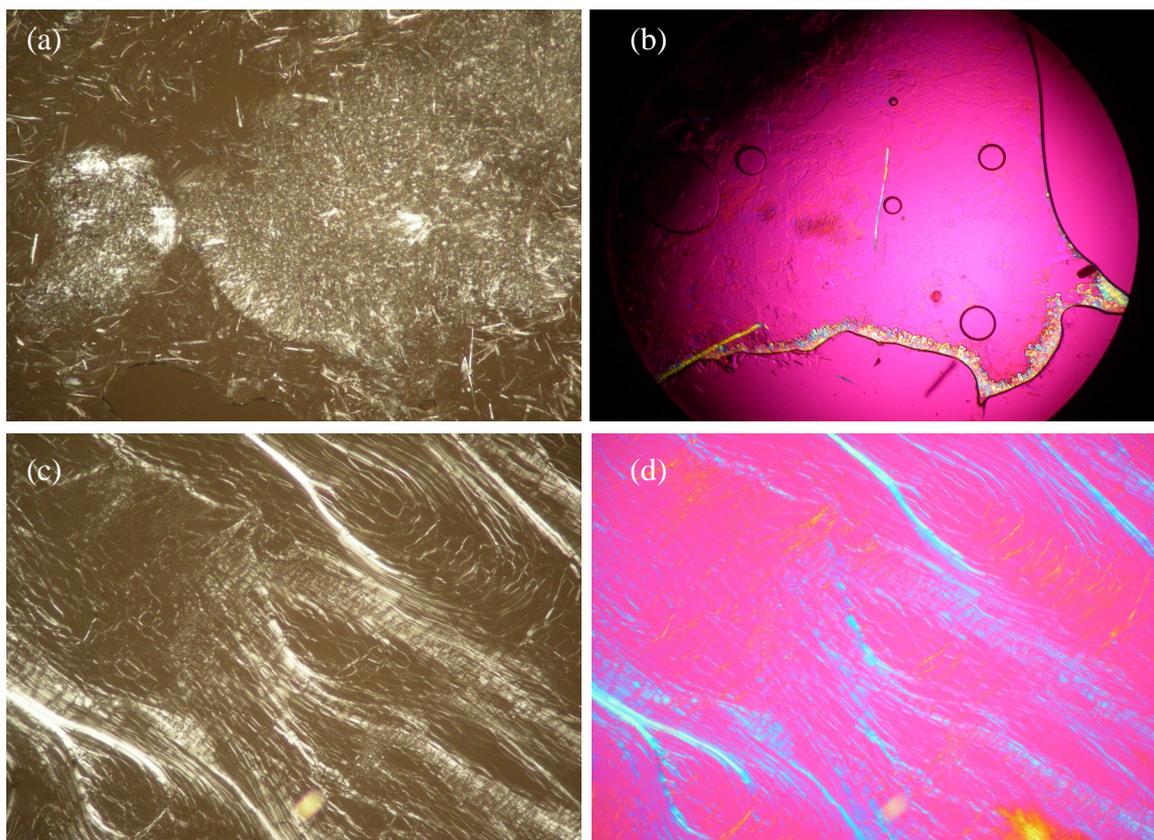


Figura 3.5: Microfotografías ópticas con luz polarizada, a) Asc_{16} 0,1 a 25 °C donde se observan cristales hidratados en líquido isotrópico sin placa de retardación, b) Asc_{16} 0,1 a 65 °C donde se observan figuras de mielina sobre el borde inferior (estructuras birrefringentes) en un líquido isotrópico con placa de retardación, c y d) Asc_{16} 0,3 a 85 °C se ven las vetas oleosas típicas de mesofases laminares, en este caso de baja birrefringencia, sin y con placa de retardación respectivamente. A esta temperatura las muestras son fluidas. Todas las concentraciones están expresadas en fracción en masa.

- Se analiza ahora la construcción del diagrama para el punto 0,7 (línea vertical de la figura 2.3) en fracción en masa. En el termograma de la figura 3.3 se puede observar que no hay presencia de picos a temperatura cercanas a 0 °C, correspondientes al agua.

Por encima de $\sim 0,48$ de fracción en masa de Asc_{16} no hay agua libre y solo queda el agua superficial unida a los grupos polares del anillo, no detectable por CDB. Por esto, solo se presentan picos entre 80 y 100 °C.

El termograma muestra dos picos que corresponden a dos cambios de fase. Uno entre $\sim 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\sim 88\text{ }^{\circ}\text{C}$, otro entre $\sim 93\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\sim 102\text{ }^{\circ}\text{C}$, transiciones que se evidencian cuando las muestras son observadas por microscopia de luz polarizada.

Por debajo de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se manifiesta la presencia cristales hidratados, la cual deja de ser evidente luego de alcanzar $88\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sistema va cambiando entre 80 y $88\text{ }^{\circ}\text{C}$ de cristales hidratados hasta un cristal líquido cúbico como se muestra en la figura 3.6a. Esta mesofase cúbica no se presenta a concentraciones menores de 0,48 de fracción en masa.

El cristal líquido cúbico se continúa observando hasta $\sim 93\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir de esta temperatura se va transformando en un cristal líquido laminar, como se presenta en la figuras 3.6c y d, por lo que por encima de $\sim 102\text{ }^{\circ}\text{C}$ se detecta solamente esta fase. Ésta, comienza a presentar centros de cristalización al ser enfriada, pasando primero a una fase gel y luego a cristales. Esto puede verse en la figura 3.6b.

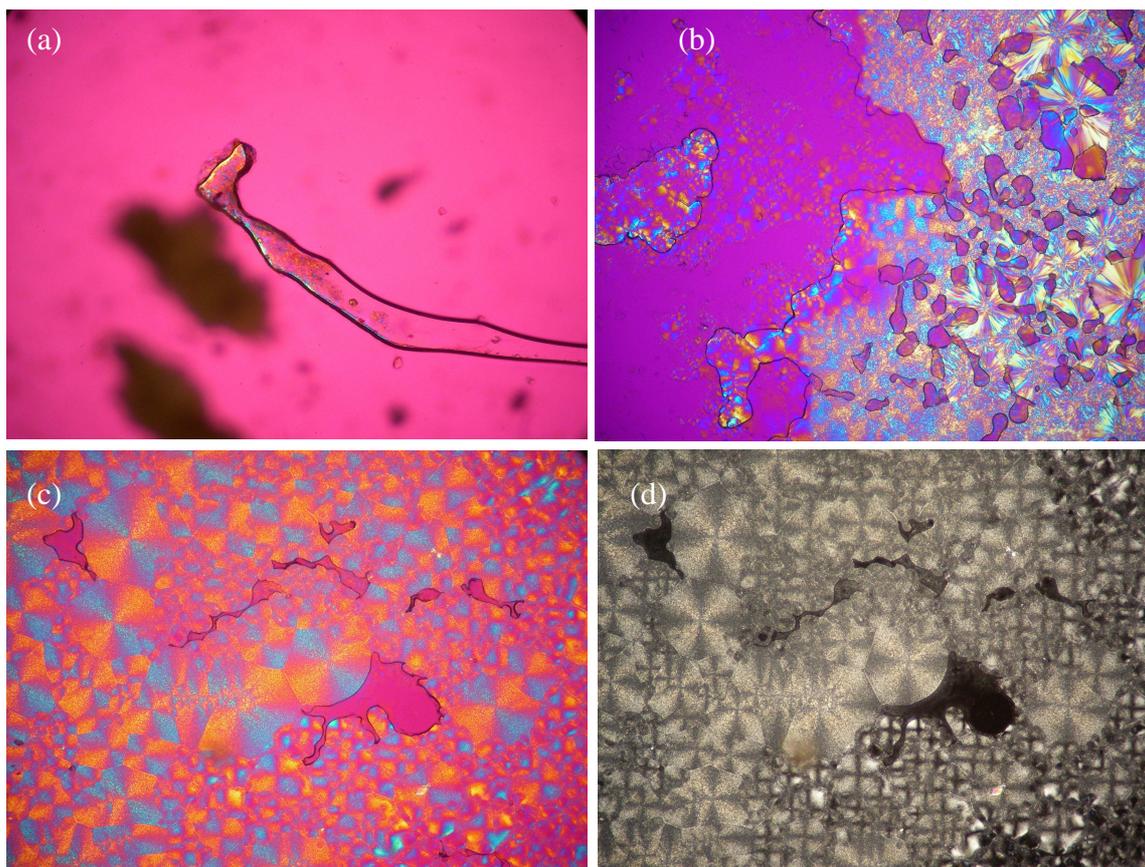


Figura 3.6: microfotografías realizadas, con polaroides cruzados: a) Asc₁₆ 0,8 a 90 °C con placa de retardación, b) Asc₁₆ 0,7 que se está enfriando luego de haber sido calentada por encima de 105 °C, c) Asc₁₆ 0,7 a 100 °C, d) Asc₁₆ 0,7 a 100 °C . Todas las concentraciones se expresan en fracción en masa.

Como se ha mencionado anteriormente, se presentan dos diferentes tipos de comportamiento del sistema por encima y por debajo de $\sim 0,5$ de fracción en masa. En ambas regiones, el aumento de temperatura termina formando dos mesofases laminares. Sin embargo, a mayores concentraciones las texturas son más gruesas, por lo que se han denominado como cristal líquido laminar de baja concentración (L_{LC}), por debajo de 0,5 de fracción en masa y cristal líquido laminar de alta concentración (L_{HC}) para los sistemas que se encuentren por encima de esta concentración.

La mesofase cúbica intermedia (entre los cristales hidratados y la mesofase laminar de alta concentración), hallada por aumento de la temperatura en el rango de concentraciones de $\sim 0,5$ a 0,95 en fracción en masa constituye solo una pequeña

porción horizontal del diagrama de fase. Generalmente, este tipo de cristales líquidos se encuentran en un pequeño dominio de existencia.

En la bibliografía no se encontró información sobre la existencia de esta fase cúbica, por lo cual, los resultados aquí mostrados constituyen un aporte original a la descripción de este tipo de sistemas.

a.2) Análisis Complementario de las Microfotografías del Sistema Asc₁₆-agua por Debajo de 0,5 de Fracción en Masa.

Se analizan, microfotografías ~ 0,45 de fracción en masa, tomadas a través del microscopio de luz polarizada con y sin placa de retardación. Esta muestra presenta un comportamiento similar al que se ve en la muestra de 0,1 de fracción en masa.

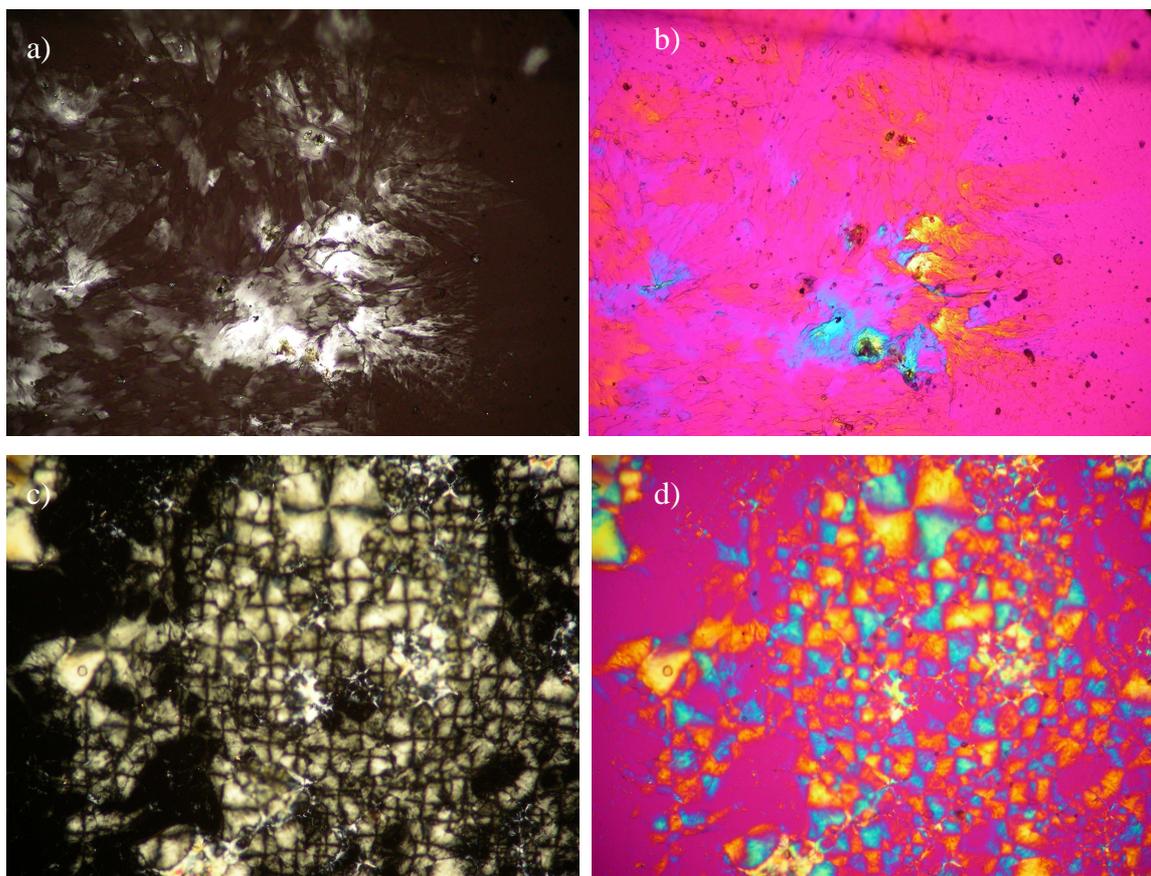


Figura 3.7: Microfotografías con luz polarizada a ~ 0,5 fracción en masa: a) y b) a 30 °C se observa una textura de gel con cristales, c) y d) a 75° enfriadas desde 98 °C donde se observan esferulitas positivas y negativas típicas de cristal líquido laminar.

La muestra correspondiente a las figuras 3.7a y b fueron obtenidas con y sin placa de retardación sobre polaroides cruzados, respectivamente. Aquí se evidencia la

presencia de cristales en un medio con características de gel (coagel). Esta muestra fue calentada por encima de 80 °C y dejada en reposo 72 h y luego fue observada a 30 °C.

Las figuras 3.7c y d muestran las denominadas esferulitas negativas y positivas correspondientes a un cristal líquido laminar. Esta muestra se observó a 75 °C.

El análisis de estas micrografías pone en evidencia lo descrito en la sección 3.2.1 de este capítulo en cuanto a lo que se refiere a la formación del coagel.

a.3) Análisis Complementario de las Microfotografías del Sistema Asc₁₆-agua por Encima de 0,5 de Fracción en Masa

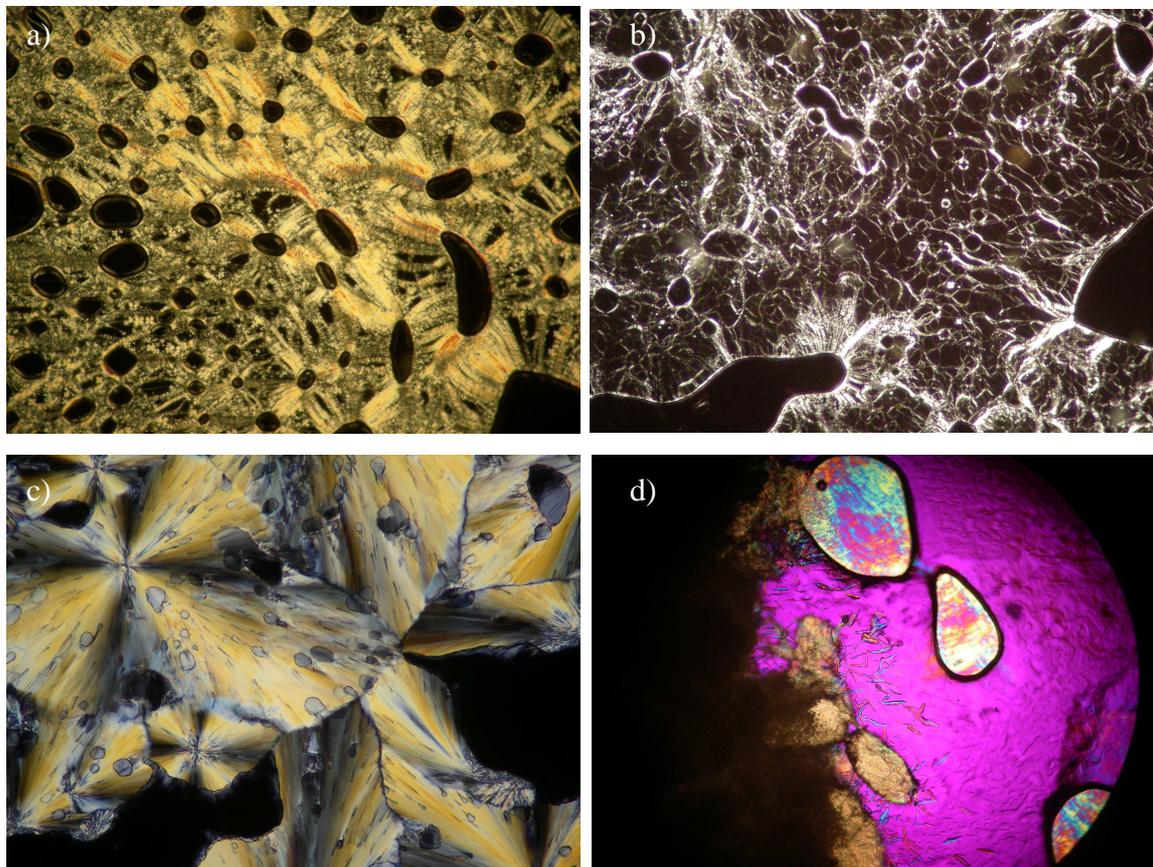


Figura 3.8: Microfotografías con luz polarizada con y sin placa de retardación de 1λ . Las fotos con fondo oscuro fueron sacadas sin placa de retardación y las que poseen fondo rosado (isotrópico) fueron sacadas con la placa. Todas las concentraciones han sido expresadas en fracción en masa. a) Asc₁₆ 0,8 a 105 °C mostrando vetas oleosas típicas de texturas laminares de alta birrefringencia b) Asc₁₆ 0,95 a 105 °C donde se muestra un mesofase laminar de alta birrefringencia, c) Asc₁₆ 0,95 textura de gel luego de enfriamiento desde 100 °C, d) Asc₁₆ puro a 134 °C mostrando un cristal líquido cúbico con mosaico laminar y cristales cerosos.

La microfotografía de la figura 3.8a muestra vetas oleosas gruesas correspondientes a una concentración de $\sim 0,8$ de fracción en masa a 105 °C. Las burbujas (zonas negras dentro de la foto) se forman cuando se “funde” el cristal. Solo se encuentra presente aquí el agua de hidratación y los cristales. No hay agua libre.

En la figura 3.8b se muestra una fase laminar de alta birrefringencia por encima de 104 °C cuando la concentración es de 0,95 en fracción en masa. Esta mesofase tiene una textura más birrefringente y vetas oleosas más gruesas que las que se encuentran por debajo de la fracción de ~ 0,5. Además de esta textura se puede notar la presencia de esferulitas negativas y positivas distribuidas entre las vetas oleosas.

Cuando se enfría la muestra anterior se observa en la figura 3.8c la presencia de fase gel producida a partir de una fase de cristal líquido laminar.

Para el Asc₁₆ puro calentado a 134 °C se obtuvo la micrografía de la figura 3.8d, donde se observa un cristal líquido cúbico con un mosaico laminar y cristales cerosos.

En estas concentraciones tan altas (> 0,90 fracción en masa) y por encima de 80 °C, se presentan texturas de “cristales cerosos”. Estos resultados están en consonancia con datos bibliográficos [22] que corresponden al comportamiento de surfactantes. Estos cristales cerosos aparecen cuando las bicapas polares de los cristales siguen estando "sólidas", mientras que la bicapas de la porción hidrocarbonada se "funden". Cuando esto sucede, la cohesión de la red polar hidratada se debilita, pierde la cohesión y colapsa dando lugar a la formación de una mesofase. Pero la cohesión de las bicapas polares anhidras es más alta y conserva la estructura cristalina externa cuando las cadenas alifáticas "funden".

a.4) Verificación por Conductividad y UV de Algunas de las Temperaturas de Transición Determinadas por CDB.

Se realizaron 3 determinaciones de conductividad para corroborar las temperaturas de transición establecidas por el CDB. Las concentraciones de Asc₁₆ en fracción en masa usadas fueron [C] = 0,1; 0,3 y 0,6.

En las figuras 3.9 a, b y c se grafican, respectivamente los resultados de las comparaciones de los termogramas de CDB con las determinaciones obtenidas por conductividad. La comparación se realizó a las mismas concentraciones.

La determinación de la temperatura de transición por conductividad se estableció por el cambio brusco de pendiente de la curva.

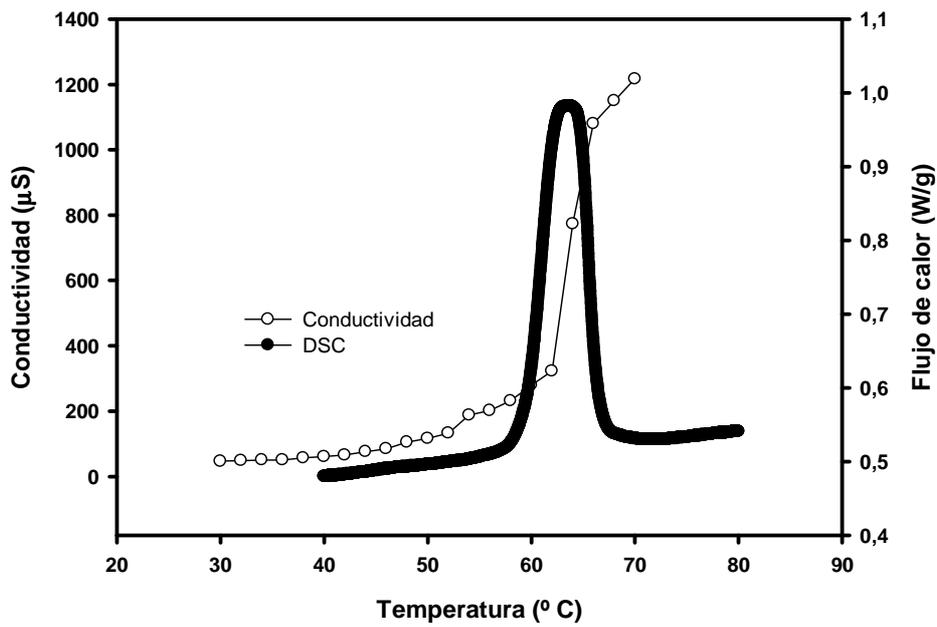


Figura 3.9 a: Comparación de la temperatura de transición obtenida por CDB (●) y por conductividad (○) para una muestra de $Asc_{16} \sim 0,1$ en fracción en masa.

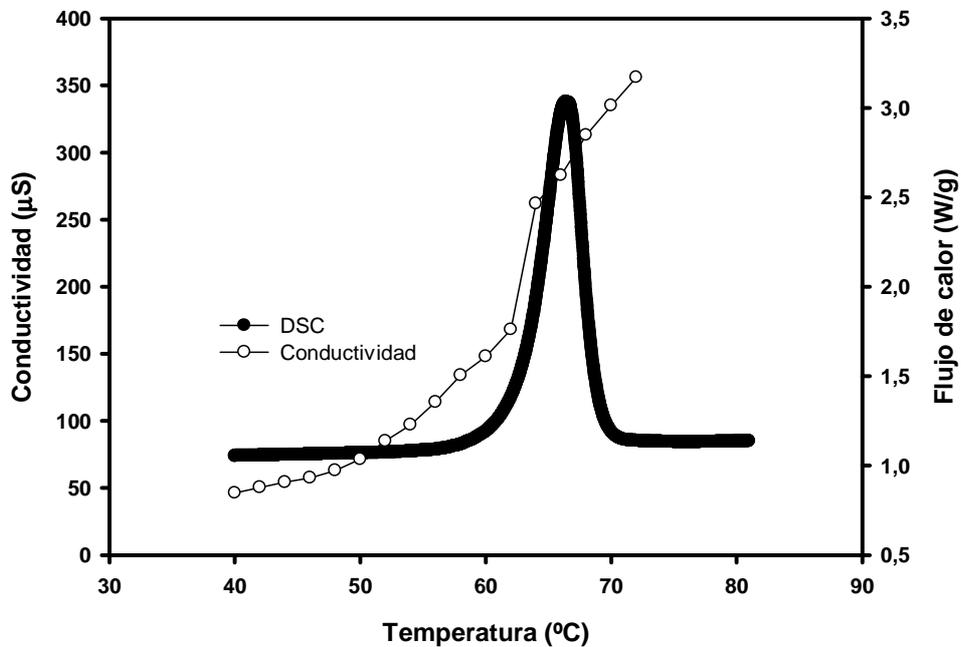


Figura 3.9 b: Comparación de la temperatura de transición obtenida por CDB (●) y por conductividad (○) para una muestra de $Asc_{16} \sim 0,3$ en fracción en masa.

Para las muestras de las figuras 3.9a y b las temperaturas de transición por conductividad para ambas fueron de ~ 62 °C. Esto se correlaciona con las temperaturas determinadas por CDB, que fueron de ~ 61 °C y ~ 62 °C para las muestras 0,1 y 0,3, respectivamente. También se obtuvo una muy buena concordancia para las muestras de 0,6 en fracción en masa, donde la temperatura de transición obtenida por CDB fue de ~ 80 °C y por conductividad de ~ 79 °C. Estos datos se presentan en la figura 3.9 c

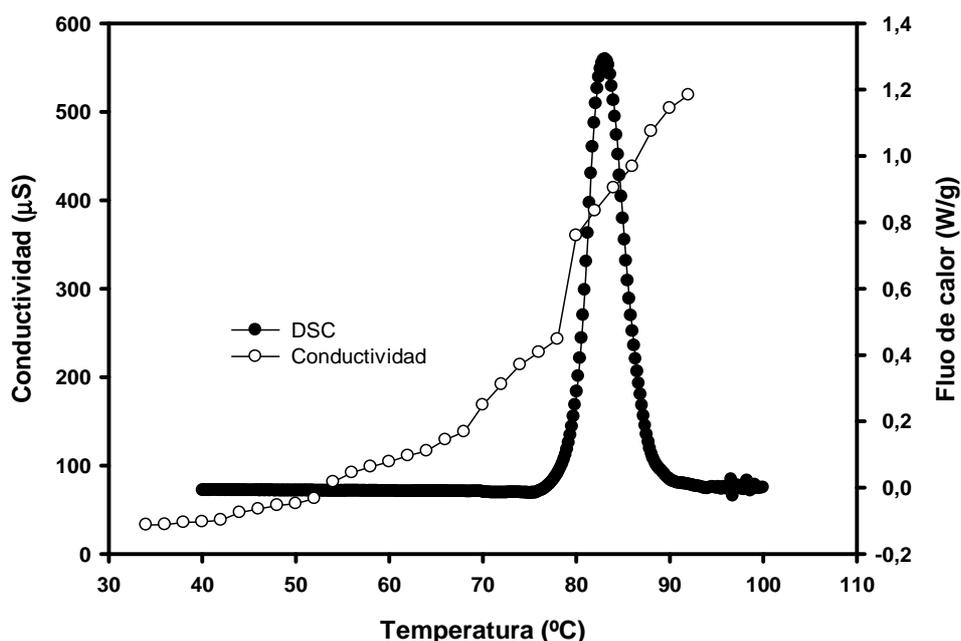


Figura 3.9 c: Comparación de la temperatura de transición obtenida por CDB (●) y por conductividad (○) para una muestra de $Asc_{16} \sim 0,6$ en fracción en masa.

En la figura 3.9 d se muestra el valor de la temperatura de transición determinada por CDB (~ 61 °C) comparado con la variación de la solubilidad del compuesto en agua, obtenida por UV, en las proximidades del punto. Un aumento marcado de la solubilidad se produjo a los ~ 62 °C. Cabe destacar que el valor de temperatura a la cual aumenta la solubilidad, concuerda con el de de la temperatura de transición determinado por CDB, de lo que se puede inferir que el aumento de la solubilidad corresponde a la transición de cristales hidratados a cristal líquido laminar.

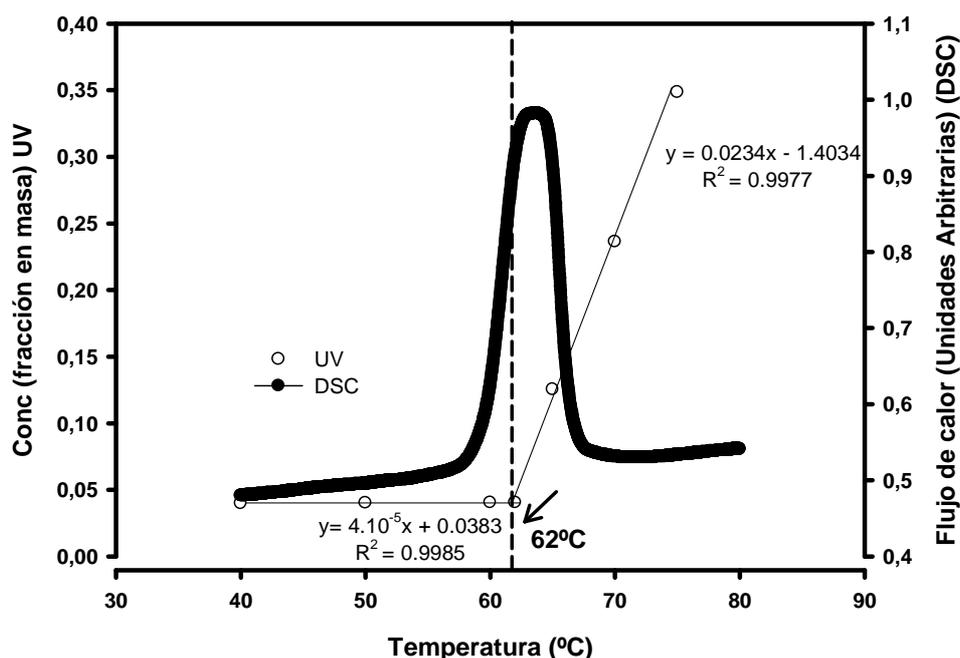


Figura 3.9 d: Determinación de la temperatura de transición del Asc₁₆ mediante UV. La flecha indica el comienzo de la transición de cristales hidratados y líquido isotrópico a un cristal líquido laminar de baja birrefringencia. En línea gruesa la determinación de este mismo punto de transición por CDB para una muestra de Asc₁₆-agua 0,1 en fracción en masa.

b) Análisis de la Región Próxima a 0 °C

El análisis que aquí se realiza es a partir de los datos de los termogramas. No se utilizó microscopía de luz polarizada porque las muestras no pueden ser enfriadas por el sistema con el que cuenta el microscopio en la región cercana a 0 °C.

b.1) Determinación de los Estados del Agua en el Sistema Asc₁₆-Agua por CDB

En la figura 3.3 se muestran las corridas de CDB completas para cada una de las muestras sobre las cuales fueron explicadas las mesofases que aparecen en función de la temperatura. En esta sección, interesa analizar el comportamiento del agua y para esto se centra la atención en los picos que están cercanos a 0 °C.

Se ha determinado el número de moléculas de agua de hidratación del Asc₁₆ utilizando las entalpías de transición obtenidas de los termogramas de la figura anteriormente mencionada. De la deconvolución de los picos se puede apreciar la existencia de dos tipos de agua. Sin embargo, por diferencia entre la cantidad de agua detectada por CDB y el contenido total de agua del sistema, se deduce que hay un tercer tipo de agua. En la figura 3.10 se muestra uno de los termogramas obtenido con la correspondiente integración de los picos del agua y del surfactante.

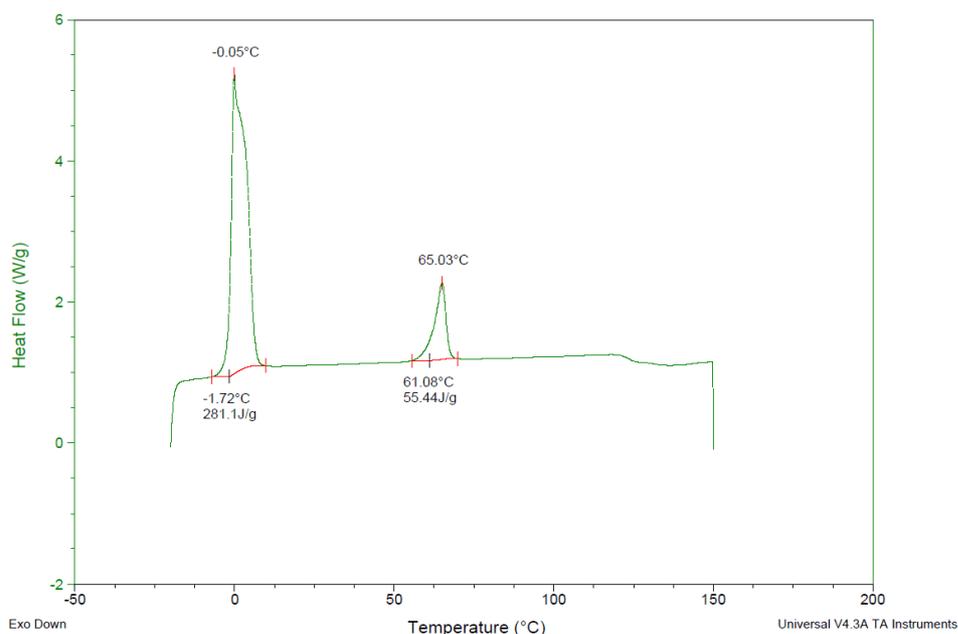


Figura 3.10: Termograma (Temperatura vs. flujo de calor) de CDB correspondiente a muestra de Asc₁₆ ~ 0,2 fracción en masa en agua donde se observan los picos del agua y del surfactante integrados (TA Universal Analysis). Se muestra en la porción superior la temperatura a la cual se alcanza el punto más alto del pico. En la porción inferior se muestra el ΔH en J/g de muestra. Debe notarse que el pico del agua está compuesto por superposición de dos picos diferentes.

Los termogramas de las muestras que se encuentran por debajo de 0,5 de fracción en masa de Asc₁₆ evidencian picos de fusión de agua. Al analizar la transición de la fusión, se puede notar que cada uno de estos picos está en realidad formado por dos picos, los cuales fueron separados en sus componentes gaussianas por deconvolución utilizando el programa informático Peakfit 4.12

En estos termogramas se observan dos picos correspondientes al agua. A cada uno de estos le corresponde una temperatura de fusión característica. El tercer tipo de agua se infiere de los análisis realizados posteriormente.

En primer lugar se definirán los tipos de agua correspondientes a los picos encontrados y luego se establecerán las características del tipo de agua que no aparece en el termograma.

Los dos tipos de agua que se encontraron en los termogramas fueron denominados provisionalmente “agua 1” y “agua 2”. La figura 2.12 muestra los puntos de fusión de ambos tipos de agua. Los errores de los puntos no están representados porque las desviaciones estándar son demasiado pequeñas para ser distinguibles en la gráfica. Las desviaciones estándar de los puntos de fusión de estos tipos de agua son $0,022 \pm 0,019$ °C y $0,022 \pm 0,014$ °C, respectivamente.

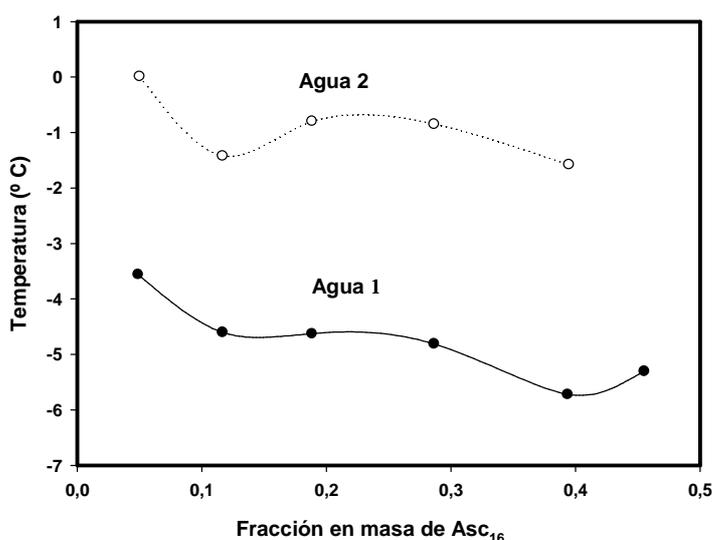


Figura 3.11: Punto de fusión del agua 1 (agua asociada a superficies) y el agua 2 (agua libre) en función de la composición del sistema. Las desviaciones estándar del agua 1 y 2 fueron $0,022 \pm 0,019$ °C y $0,022 \pm 0,014$ °C, respectivamente.

Existen ejemplos en la literatura de diferentes tipos de agua presente en los sistemas con surfactantes. En numerosos sistemas acuosos de este tipo, parte del agua no se congela. Su cantidad es prácticamente la misma cuando se determina por

diferentes métodos [23] y coincide estrechamente con los números de hidratación de los grupos hidrofílicos medidos a temperatura ambiente como se indica en la referencia [24]. El agua no congelada tiene una presión de vapor muy pequeña [25]. En la figura 3.11 se muestra que el punto de fusión del agua 2 es ~ 0 °C, lo que sugiere que esta corresponde al agua libre. El punto de fusión del agua 1 es menor, y corresponde al agua asociada a la superficie, cuyos enlaces por puentes de hidrógeno son más débiles que en el agua libre. A medida que se aumenta la concentración de surfactante, los picos del agua van desapareciendo. Sin embargo, el pico del agua 2 desaparece antes de que lo haga el agua 1. En concordancia con las interpretaciones realizadas en la referencia [23-26], el agua 1 es afectada por la superficie del surfactante ya que está más cerca de esta que el agua libre. Como consecuencia de ello, el agua 1 fue identificada como el agua asociada a la superficie polar de los cristales del surfactante y el agua de 2 como agua libre.

En las figuras 3.12 a y b se muestran los dos picos de fusión correspondientes a estos dos tipos diferentes de agua. De esta manera, se puede determinar la temperatura en la cual se inicia la fusión y las entalpías respectivas. Los parámetros de la deconvolución de los picos del agua se muestran a continuación en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Parámetros de deconvolución de picos de agua superficial y libre.

C (wt %)	4,9	11,6	18,9	28,7	39,5	45,6
R ²	0,9991	0,998	0,992	0,987	0,9856	0,997
Agua superficial						
Centro de pico (°C)	0,912	0,605	0,0927	-0,4	-0,223	0,102
Desvío Standard (°C)	0,0043	0,0089	0,0097	0,031	0,019	0,06
Agua libre						
Centro de pico (°C)	3,74	3,64	3,64	3,8	0,398	2,46
Desvío Standard (°C)	0,0043	0,0023	0,0014	0,0035	0,036	0,034

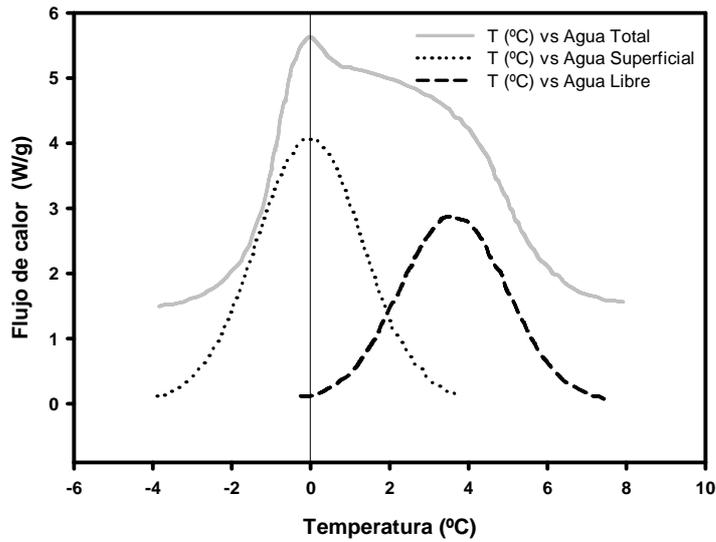


Figura 3.12 a: Deconvolución de los picos de fusión del agua (del termograma de la figura 3) de una muestra de $Asc_{16} \sim 0,2$ fracción en masa en agua donde se muestran los picos correspondientes al agua superficial y al agua libre debajo del pico total.

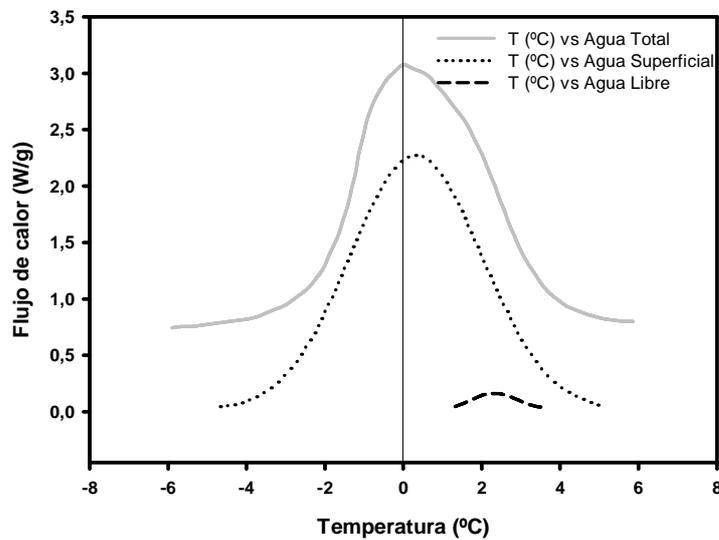


Figura 3.12 b: Deconvolución de los picos de fusión del agua de una muestra de $Asc_{16} \sim 0,5$ fracción en masa en agua donde se muestran los picos correspondientes al agua superficial y al agua libre debajo del pico total.

El tipo de agua que no es observado por CDB se determina por la ausencia de picos de fusión, es decir, se detecta por la desaparición de los picos de fusión del agua cuando la entalpía por gramo de muestra se grafica en función de la concentración.

Estos resultados se muestran en la figura 3.13. Este tipo de agua es la de hidratación primaria, es decir, que es el agua fuertemente ligada a las cabezas polares del surfactante. No se congela y por lo tanto, no es detectada por CDB. Estos resultados concuerdan con los encontrados en la bibliografía para otros sistemas estudiados en la referencia [24].

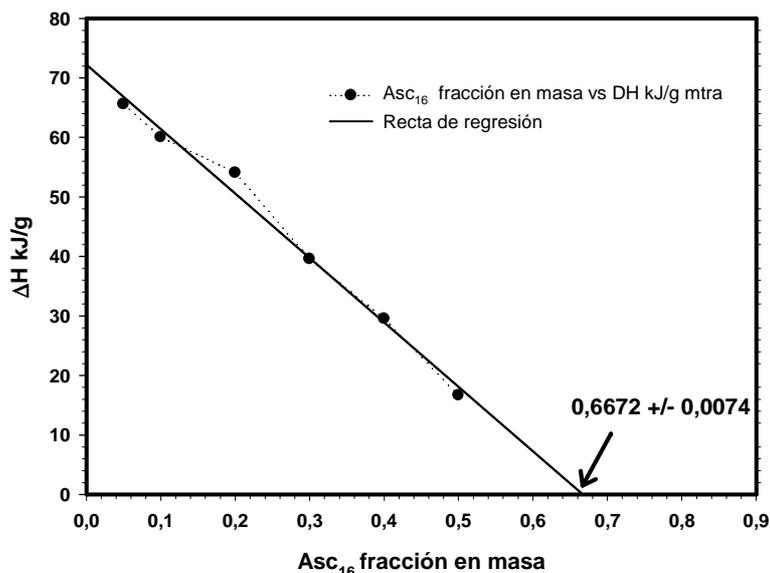


Figura 3.13: Entalpías totales de fusión del agua por gramos de muestra vs. fracción en masa de Asc₁₆.

La desaparición total de los picos de fusión del agua ocurre en $[C] = 0,667 \pm 0,007$ en fracción en masa, lo que corresponde a un número de hidratación de $11,5 \pm 1,3$ moléculas de agua por molécula de Asc₁₆. Esto se calcula haciendo la diferencia entre el número de moléculas de surfactante presentes en la fracción 0,667 de Asc₁₆ y las moléculas de agua presentes a esa concentración en la muestra.

La distribución de las moléculas de agua por moléculas de surfactante ($N_{\text{agua}} / N_{\text{surf}}$) se muestra en la figura 3.14 y fue obtenida con las áreas relativas de los picos de agua deconvolucionados. A cada tipo diferente de agua le corresponde un porcentaje determinado del área del pico del agua total.

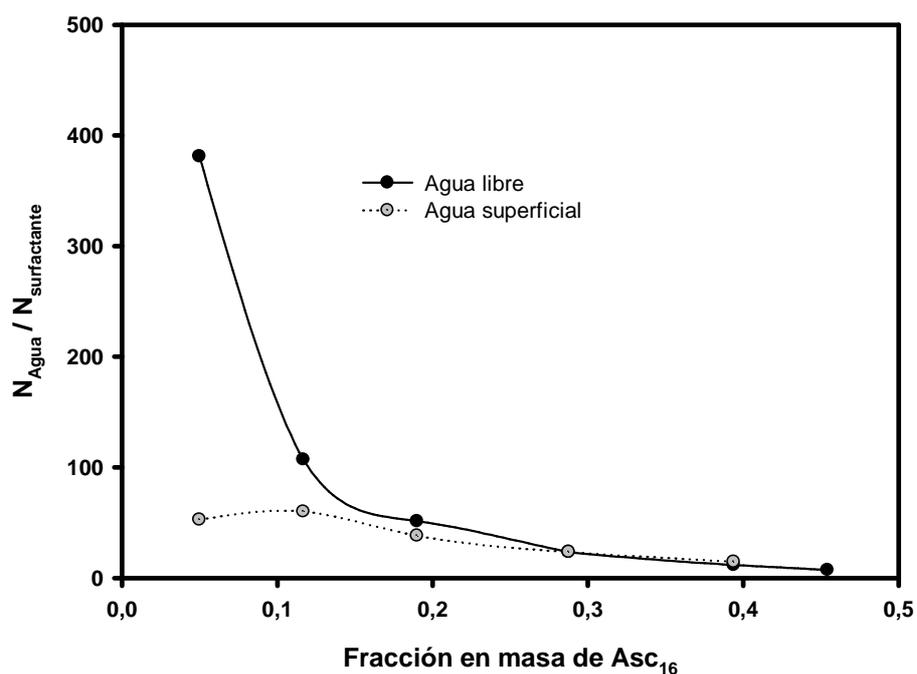


Figura 3.14: Número de moléculas de agua por molécula de surfactante:(▲) agua libre y (○) agua superficial.

Se puede observar en la figura 3.14 que el agua libre disminuye hasta desaparecer en $[C] \approx 0,48$ fracción en masa. El agua asociada a la superficie permanece casi constante entre el $[C] = 0,049$ y $0,12$ de fracción en masa, con un valor de $N_{\text{agua}} / N_{\text{surf}} = 54 \pm 4$ que luego disminuye y desaparece en $[C] = 0,667 \pm 0,0074$ de fracción en masa. Este tipo de agua se supone que es afectada por la presencia de moléculas de surfactante. Estos puntos límites fueron determinados extrapolando a cero la entalpía por gramo de muestra, cuando ésta se grafica en función de la concentración como se observa en la figura 3.13.

A continuación, se da un ejemplo de cómo han sido tratados los datos que se muestran en los termogramas de la figura 3.3 del sistema Asc₁₆-agua, para obtener los valores que fueron utilizados en la realización del gráfico de la figura 3.14:

El ejemplo corresponde a la fracción en masa de 0,05:

A partir de los datos de deconvolución del termograma correspondiente a este punto, se tomaron los porcentajes de agua correspondientes al agua libre y al agua de la segunda capa de hidratación, que son los dos tipos de agua que se pueden determinar por la presencia de picos en el CDB. Por lo tanto, para 0,05 en fracción en masa de Asc₁₆, tomando en cuenta el agua total = 0,95 (fracción en masa de agua)/18 (masa molar del agua) = 0,053. Esto se desglosa en un porcentaje para el agua libre, que es del 88 % y de 12 % para el pico de la segunda capa de hidratación. Como de Asc₁₆ está en un 5 % entonces $0,05/414$ (masa molar del Asc₁₆) = 0,00012. Ahora el 88% de 0,053 es = 0,04664 (correspondiente al agua “bulk”) y el 12% es 0,00636 que es el valor correspondiente al agua de la segunda capa de hidratación. Entonces el número de moléculas correspondientes al fase libre a 0,05 en fracción en masa de Asc₁₆ es de = $0,04664/0,00012 \approx 389$ moléculas de agua por molécula de surfactante; y para la segunda capa de hidratación es de = $0,00636 / 0,0012 \approx 54$ moléculas de agua por molécula de Asc₁₆. De esta forma se calculan el resto de los valores del gráfico.

Aunque el agua libre se define generalmente como el agua que tiene las propiedades del agua pura, esto no es estrictamente cierto y en sistemas relativamente concentrados sus propiedades difieren de las del agua pura, porque la estructura del agua está perturbada por la presencia de otros componentes del sistema [26].

El hecho de que el valor de $N_{\text{agua}} / N_{\text{surf}}$ del agua asociada a la superficie disminuye con el aumento de [C], indica que el agua está débilmente relacionada con la superficie y un aumento de la aglomeración de los grupos polares liberaría algunas moléculas de agua.

Diferentes determinaciones de la hidratación primaria de los surfactantes no iónicos basados en polioxietileno, dieron entre 2 y 3 moléculas de agua por átomo de oxígeno [27-31]. Otros valores de la bibliografía [25,32] son 4,47 y de la [33] 5,05 moléculas de agua por átomos de oxígeno. También se ha registrado para micelas en [26] valores que van desde 8,23 hasta 10,06. Los diferentes valores se deben probablemente a la sensibilidad del método utilizado para determinar la cantidad de agua con propiedades diferentes de las del agua libre.

Las moléculas Asc₁₆ tienen 7 átomos de oxígeno, entonces la primera capa de hidratación de agua estaría formada por 11,5 (moléculas de agua por moléculas de surfactante de la primera capa de hidratación / 7 (que son los átomos de oxígeno que le

corresponden al $Asc_{16}) \approx 1,6 \pm 0,2$ moléculas de agua por cada átomo de oxígeno y para la segunda capa es $54 / 7 \approx 7,7 \pm 0,6$ moléculas de agua por átomos de oxígeno. Estos valores están cercanos a los mencionados anteriormente.

Otros sistemas con surfactantes muestran diferentes tipos de agua [26]. En el gel y coagel de cloruro de dioctadecil dimetil amonio en agua fueron detectados dos tipos de moléculas de agua por mediciones de FT-IR [34].

En la referencia [1], utilizando derivados de vitamina C, se detectaron dos tipos de agua, encontrándose agua libre y agua de hidratación interfacial, mientras que aquí se ha encontrado un tercer tipo agua, que corresponde a la segunda capa de hidratación.

El número de moléculas de agua de hidratación por grupo polar fue inferido de los resultados experimentales, obteniéndose por CDB un valor de 54 moléculas de agua por molécula de surfactante para la segunda capa de hidratación, y de 11 para la primera que es muy similar a los números obtenidos por la aproximación que utiliza el número de átomos de oxígeno para suponer estos valores.

Según la referencia [1] para el Asc_{16} en fracción de 0,4 en masa, el espaciado d dado por DRX fue $45,4 \pm 1,1$ Å y el largo de la cadena completamente estirada fue de 21,7 Å. La hidratación de la capa hidratada fue de $23,7 \pm 0,6$ Å. El agua de hidratación de los grupos polares, a_{hng} , fue igual a $46,0 \pm 0,1$ Å (radio = $3,83 \pm 0,01$ Å). Los estudios calorimétricos de la referencia [1] también mostraron la presencia de dos tipos de agua en la fase coagel: la libre, que es el agua libre que se congela y funde a 0 °C y por otro lado, el agua fuertemente unida que no se funde en el intervalo de temperaturas investigado. Las moléculas de agua fuertemente ligadas forman un compartimiento delgado intercalado entre las bicapas de surfactante, mientras el que agua libre rodea como "islas" y disuelve los pocos monómeros en equilibrio con la fase coagel. El número de moléculas de agua fuertemente ligadas al anfifilo, N_{agua} / N_{surf} , también se midieron por un procedimiento diferente al que se utiliza aquí [1]. Estos valores se mantienen constantes entre $C = 0,0541$ y $0,0940$ siendo los valores de moléculas de agua por molécula de surfactante de 22,7 y 20,9 respectivamente. Se observa además que disminuye el número de moléculas de agua a 9,0 para una fracción en masa de 0,42. Se puede observar el mismo comportamiento que el que se ha encontrado en este

trabajo. Los valores de la hidratación de la referencia [1] incluyen probablemente, a baja concentración, parte de la segunda capa de hidratación, pero a mayor concentración el valor es de sólo un 18 % inferior al contenido en la primera capa de hidratación que se encuentra calculada aquí. Por consiguiente, se puede suponer que la concordancia ha sido muy buena usando un procedimiento diferente que del que figura en bibliografía.

3.5.2 *Sistemas de Asc₁₆ en Diferentes Soluciones Acuosas de PEG₄₀₀*

En bibliografía no se han encontrado estudios sistemáticos sobre el comportamiento de fase del Asc₁₆ en soluciones de PEG₄₀₀ y agua. Sin embargo, Ambrosi y colaboradores [1] han determinado algunas temperaturas de transición para sistemas de Asc₁₆ en soluciones acuosas de PEG₄₀₀. En esta cita también se informa que el aumento de la concentración de PEG₄₀₀ disminuye las temperaturas de transición de los surfactantes derivados de vitamina C.

La importancia del estudio realizado en esta sección, radica en la descripción de las fases que se forman al variar las propiedades de los sistemas Asc₁₆-agua por el agregado de un cosolvente, el cual produce la disminución de las temperaturas de transición de las mesofases formadas.

Cabe recordar que las temperaturas de transición obtenidas en este estudio para el sistema Asc₁₆-agua indican que las estructuras de agregación fluidas de este surfactante en solución acuosa (cristales líquidos) aparecen ~ 62 °C. Para modificar los límites de los dominios de existencia de los diferentes agregados hacia menores temperaturas se utiliza al PEG₄₀₀ como cosolvente, debido a que este compuesto es no-tóxico y se emplea con frecuencia en formulaciones farmacéuticas.

Las mezclas de Asc₁₆ fueron estudiadas por CDB y MOP. El intervalo de concentraciones de Asc₁₆ en las soluciones de Agua / PEG₄₀₀ fue entre 0,05 - 0,9 en fracciones en masa (w/w). Las proporciones de PEG₄₀₀ en agua utilizadas fueron: 25%, 50%, 75%.

3.5.2.1 Diagramas de Fase

Todos los diagramas de fases se construyeron de la misma manera que el descrito en la figura 3.4 para el sistema Asc₁₆- agua. Entonces, el ejemplo de cómo se construyen los puntos del diagrama de fase debe revisarse en la sección 3.4.1.1 de este capítulo.

a) Diagrama de Fase del Sistema Asc₁₆ / 75% Agua - 25% PEG₄₀₀

La figura 3.15 muestra una gráfica con los termogramas a partir de los cuales se tomaron las temperaturas de transición de las diferentes mesofases.

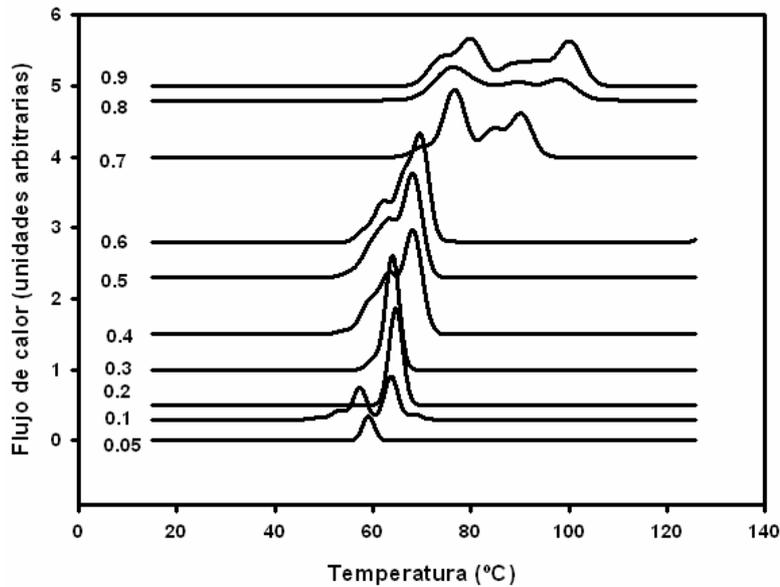


Figura 3.15: termogramas CDB del sistema Asc₁₆/ agua 75% - PEG₄₀₀ 25%. Flujo de calor en función de la Temperatura. Las ordenadas se expresan en unidades arbitrarias para poder superponer las gráficas. El CDB provee las unidades de flujo de calor en Watt /gramo. Los números que aparecen del lado izquierdo de cada termograma indican la fracción en masa a la que fue realizada la corrida.

La Figura 3.16 muestra el diagrama de fase obtenido por medidas de CDB y microscopia de luz polarizada.

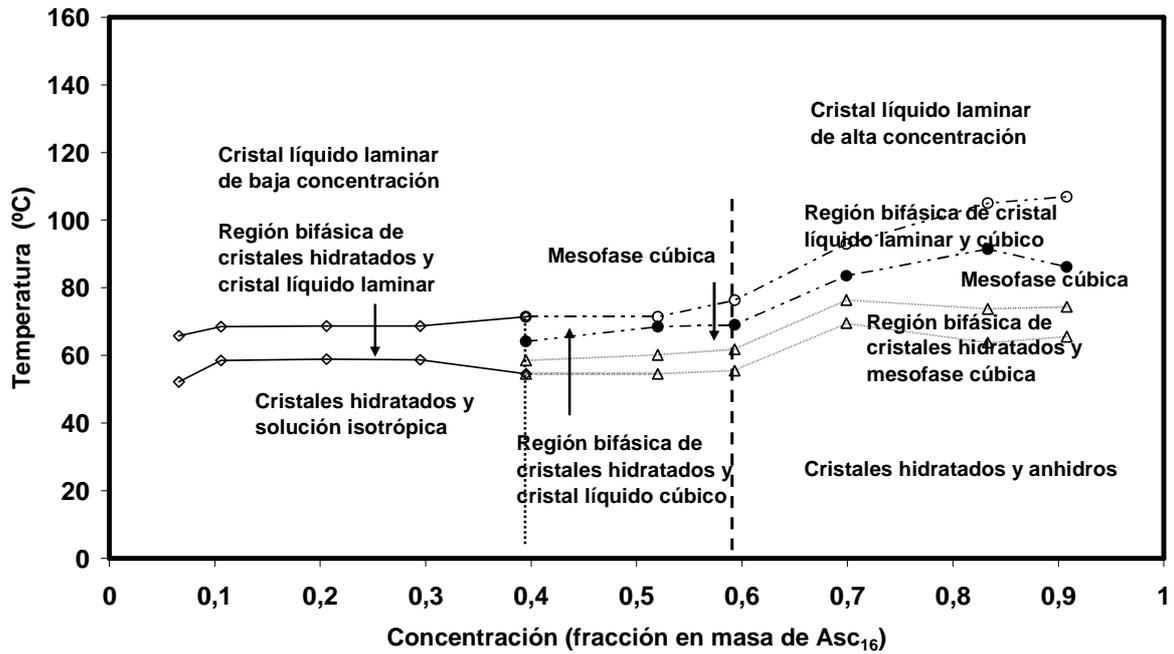


Figura 3.16: Diagrama de fase completo de Asc₁₆ en solución de PEG₄₀₀ al 25% en 75% de agua, donde se grafica temperatura (°C) en función de la concentración en fracción en masa de surfactante.

En este diagrama pueden observarse zonas con texturas similares a las presentes en el sistema Asc₁₆- agua. La diferencia radica en que la mesofase cúbica comienza a aparecer a menores concentraciones y temperaturas; ~ 0,4 fracción en masa y ~ 54 °C, mientras que para el sistema Asc₁₆- agua la aparición de esta fase se encuentra a ~ 0,5 (fracción en masa) y ~ 79 °C.

Las texturas características de este sistema por debajo de 0,4 en fracción en masa, se muestran en la figura 3.17.

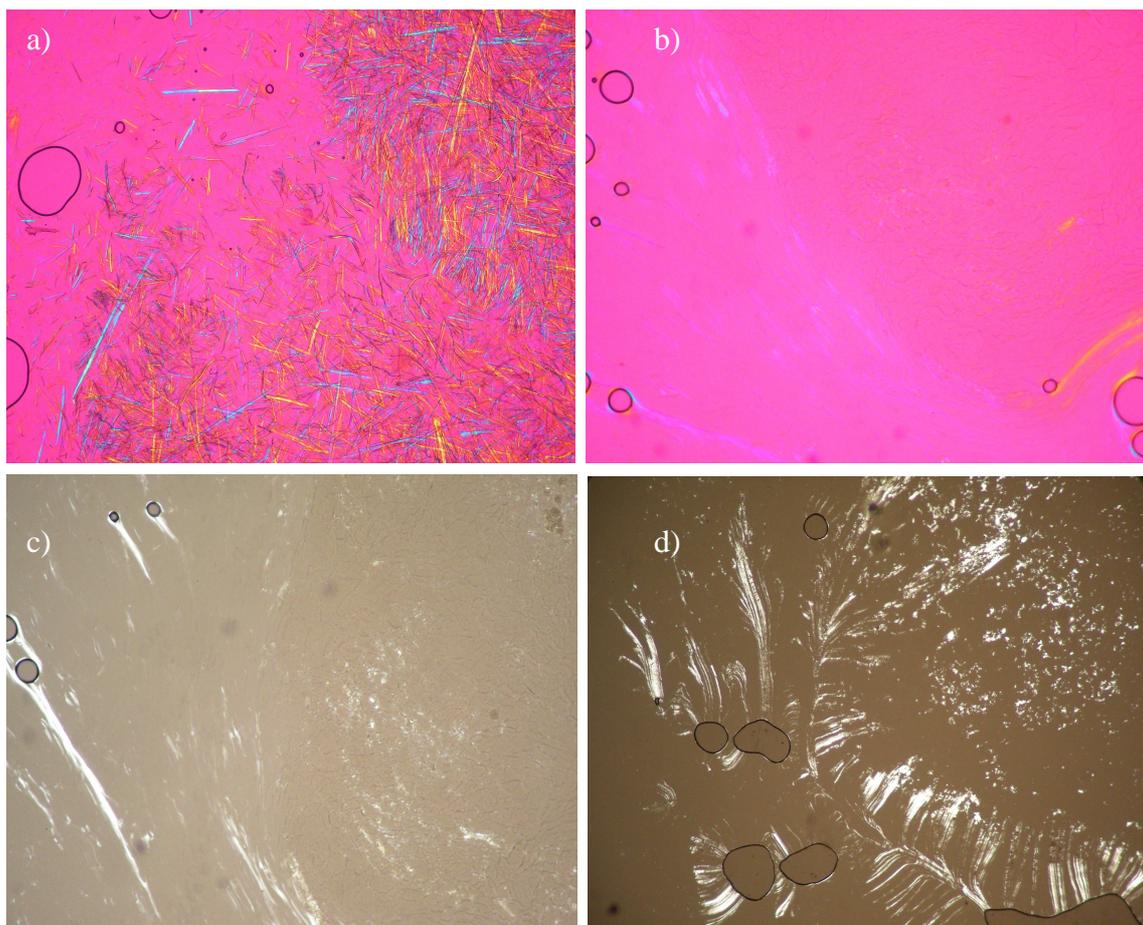


Figura 3.17: Asc₁₆ en solución de 75% de agua y 25% de PEG₄₀₀. Microfotografías con polarizada con y sin placa de retardación de 1 λ . Las fotos con fondo oscuro fueron sacadas sin placa de retardación y las que poseen fondo rosado fueron sacadas con la placa. a) Asc₁₆ 0,1 a 25 °C donde se observan cristales aciculares en líquido isotrópico, b) Asc₁₆ 0,2 a 75 °C donde se observa en un líquido isotrópico vetas oleosas de baja birrefringencia (son las líneas más claras sobre el fondo rosado), c) Asc₁₆ 0,2 a 75 °C similar a la anterior pero sin placa de retardación, d) Asc₁₆ 0,3 a 75 °C se ven las vetas oleosas típicas de mesofases laminares de baja birrefringencia. Todas las concentraciones son expresadas en fracción en masa.

En la figura 3.17a, se observan cristales aciculares birrefringentes de Asc₁₆ a 0,1 (fracción en masa) en un líquido isotrópico formado por agua y PEG₄₀₀ a temperatura ambiente. Aquí se está en la zona inferior izquierda del diagrama de fases de la figura 3.16. Esta imagen no presenta diferencias con la primera fotografía de la figura 3.5 correspondiente al sistema Asc₁₆- agua.

Las fotografías b y c de la figura 3.17 muestran cristales líquidos laminares de baja birrefringencia para una muestra de 0,2 a 75 °C, aquí se está en la región superior

izquierda del diagrama de la figura 3.16. Estas vetas oleosas son típicas de cristales líquidos laminares y presentan baja birrefringencia, por lo que fueron denominadas de la misma manera que para el sistema Asc₁₆-agua “cristal líquido laminar de baja concentración”.

En la figura 3.17d se muestran vetas oleosas sensiblemente más definidas, en un sistema 0,3 en fracción en masa a 75 °C.

Para este sistema, Asc₁₆- 75% agua/ 25% PEG₄₀₀, las temperaturas de transición de fase desde 0,05 hasta una concentración de ~ 0,4 en fracción en masa, no varían apreciablemente respecto del sistema Asc₁₆-agua, que fueron presentadas en el diagrama de la figura 3.4.

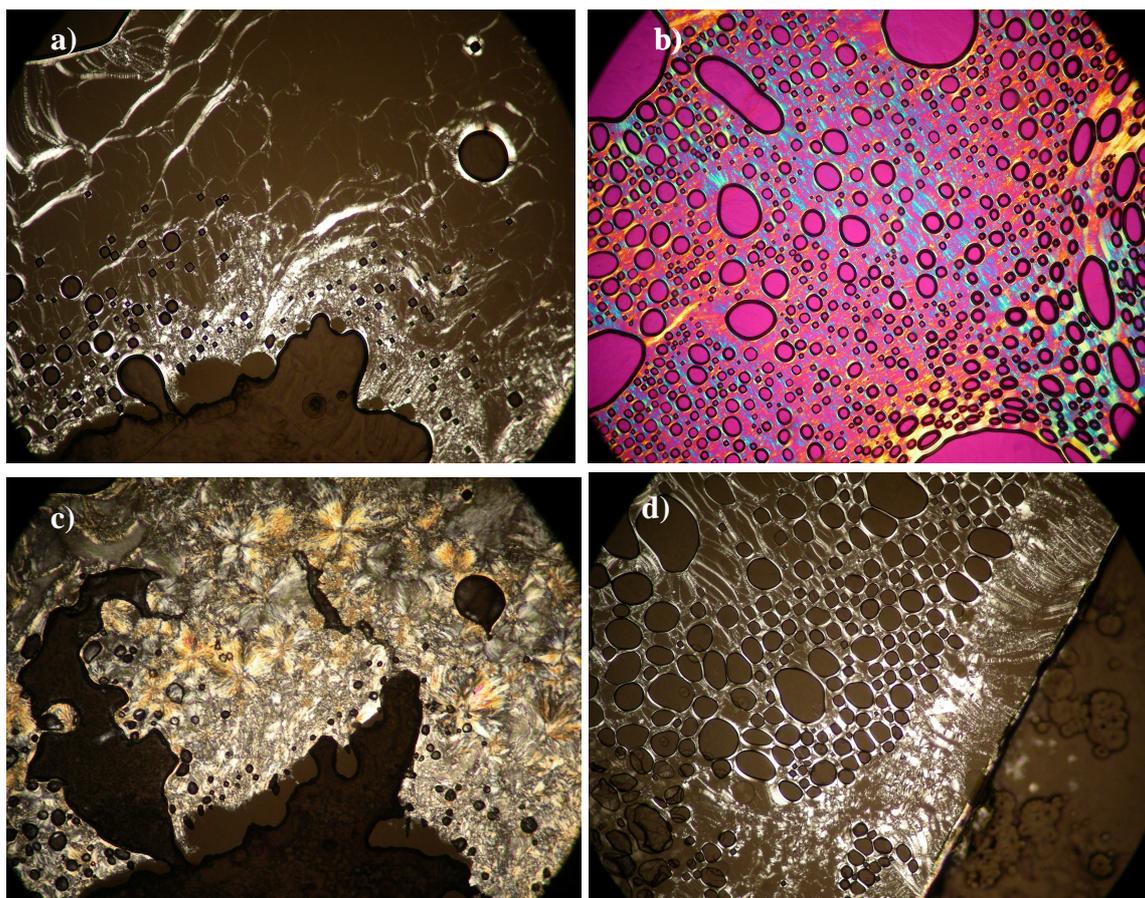


Figura 3.18: Asc_{16} en solución de 25% de PEG_{400} y 75% de agua: microfotografías de luz polarizada con y sin placa de retardación de 1λ . Las fotos con fondo oscuro fueron sacadas sin placa de retardación y las que poseen fondo rosado con la placa. a) Asc_{16} 0,5 a $70 \text{ }^\circ\text{C}$, se ven las vetas oleosas típicas de mesofases laminares, en este caso de baja birrefringencia y algo de mesofase cúbica, b) Asc_{16} 0,5 a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ donde se observan vetas oleosas típicas de cristal líquido laminar c) Asc_{16} 0,5 a $68 \text{ }^\circ\text{C}$: se ve una fase de gel y una mesofase cúbica, d) Asc_{16} 0,6 a $80 \text{ }^\circ\text{C}$, se ven vetas oleosas. Todas las concentraciones son expresadas en fracción en masa.

En la microfotografía de la figura 3.18a correspondiente a una concentración de 0,5 en fracción en masa y a una temperatura de $70 \text{ }^\circ\text{C}$, se observan, en la porción superior, texturas de vetas oleosas de baja birrefringencia; y en la porción inferior, líquido isotrópico compatible con cristal líquido cúbico. En la figura 3.18b, se observa, para la misma muestra a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ y con placa de retardación, la presencia de vetas oleosas típicas de un cristal líquido laminar homogéneamente distribuidas por toda la muestra. Es evidente que si se compara esta textura con las encontradas a la misma concentración

pero en el sistema Asc₁₆-agua, se ve que la temperatura de transición es sustancialmente menor. Tanto en esta fotografía como en la figura 3.18d se evidencian zonas sin textura de forma circular, burbujas. La presencia de estas, se produce cuando se funde el cristal en la solución.

En este punto cabe destacar que la disminución de las temperaturas de transición en el intervalo de concentraciones de 0,1 a 0,4 de Asc₁₆ para este sistema no es muy evidente respecto al sistema de la figura 3.4. Esto se condice con los resultados obtenidos en la referencia [1] donde se muestra que cuando las soluciones de PEG₄₀₀ se encuentran alrededor de 25% las entalpías por gramo de muestra no difieren sustancialmente respecto a los valores obtenidos para el sistema Asc₁₆-agua. Sin embargo, una vez que se pasa por encima de una concentración de 0,4 y hasta 0,6 se observa un cambio significativo de estas transiciones, respecto al sistema Asc₁₆- agua, con la obtención de mesofases a temperaturas inferiores.

No se han encontrado en bibliografía publicaciones donde se informe el comportamiento del sistema Asc₁₆ en solución de PEG₄₀₀ al 25% en agua en este intervalo de concentraciones.

Se observa que existe una disminución de temperaturas de transición de ~ 20 °C en el diagrama de la figura 3.16 con respecto al de la figura 3.4 en el intervalo de concentraciones entre 0,5 - 0,6 en fracción en masa. En estas condiciones el sistema resulta inviable para ser usado como sistema portador, dado las altas temperaturas de transición que presentan.

En la fotografía de la figura 3.18c correspondiente a una fracción en masa de Asc₁₆ de 0,5 a 68 °C se refleja la aparición, durante el enfriamiento, de una fase laminar tipo gel. Esta fase se encuentra en coexistencia con otra isotrópica, compatible con una cúbica. La fase gel aparece al enfriar el sistema y no se presenta mientras se calienta. No existe cambio en el termograma a medida que vamos aumentando la temperatura. Una posible explicación para esto es que, la fase gel posee un arreglo laminar igual que el del cristal líquido laminar que se encuentra al aumentar la temperatura y por esto en el termograma no se presentan picos correspondientes a las transiciones de fase. Estas observaciones se condicen con el hecho de que los coageles aparecen al enfriar el

sistema luego de que se llegara a su temperatura de transición, como se muestra en la referencia [8].

En la figura 3.18d se muestra un sistema en fracción en masa 0,6 de Asc_{16} a 80 °C donde aparecen, en la porción superior izquierda, figuras de mielina junto con vetas oleosas típicas de mesofases laminares. Aquí se nota una refringencia mayor que en los sistemas más diluidos.

Hasta aquí comparando los diagramas de fase de la figura 3.16 y el de la figura 3.4, se puede decir que, en el primero, existe una reducción de las temperaturas de transición de 20 °C respecto del segundo, entre las concentraciones que van desde ~ 0,45 hasta ~ 0,7 de fracción en masa.

Otra diferencia de consideración es que en la figura 3.16 la extensión de la mesofase cúbica se desplaza hacia concentraciones menores que ~ 0,5.

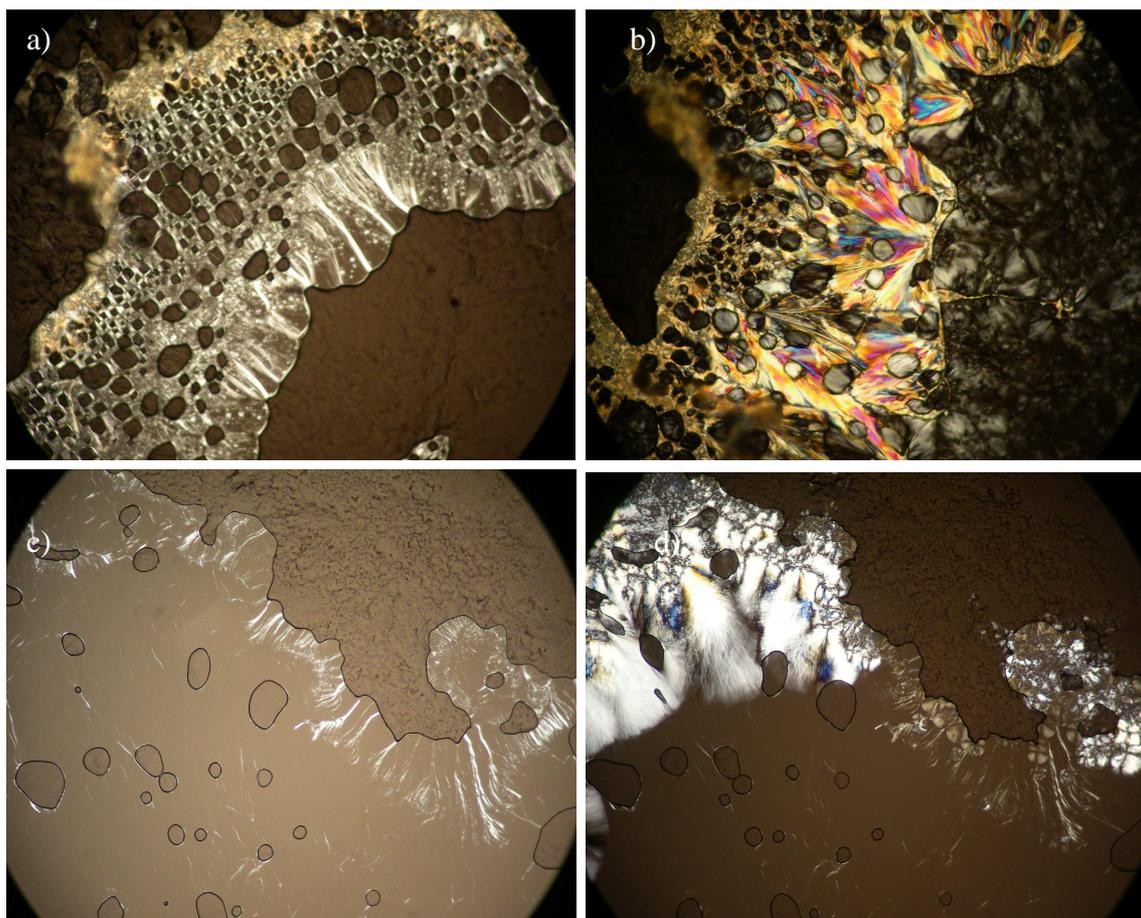


Figura 3.19: Asc₁₆ en solución de 25% de PEG₄₀₀ y 75% de agua: microfotografías de luz polarizada con y sin placa de retardación de 1 λ . a) Asc₁₆ 0,7 a 90 °C se observan un gel con cristal líquido laminar y luego cúbico, b) Asc₁₆ 0,7 a 85 °C se observan una matriz de gel y con cristal líquido cúbico, c) Asc₁₆ 0,9 a 104 °C se observa líquido isotrópico compatible con mesofase cúbica en coexistencia con laminar, d) Asc₁₆ 0,9 94 °C mostrándose estructuras típicas de mesofases laminares con cristales líquidos cúbicos y gel. Todas las concentraciones son expresadas en fracción en masa.

En la fotografía a de la figura 3.19, por calentamiento a 90 °C de la muestra de Asc₁₆ de 0,7 (fracción en masa), se observan vetas oleosas típicas que corresponden a una mesofase laminar (zona intermedia) y líquido isotrópico compatible con una fase de cristal líquido cúbico (zona inferior derecha). Se trata de la zona bifásica de transición más alta del diagrama de la figura 3.16.

Dejando enfriar la muestra a 85 °C, se saca la foto b donde se sigue observando algo de cristal líquido cúbico (porción inferior derecha). Sin embargo, la fase laminar ahora comienza a solidificar, transformándose en una textura tipo gel (porción intermedia birrefringente de la fotografía).

En la fotografía figura 3.19c se observa, la muestra de Asc₁₆ 0,9 a 104 °C un cristal líquido laminar (porción inferior izquierda de la foto). Este se define por la presencia de vetas oleosas en coexistencia con un cristal líquido cúbico (porción superior derecha).

La figura 3.19d se obtiene al enfriar la muestra anterior desde 104 a 94 °C. Aquí comienza a aparecer una fase gel donde estaba la de cristal líquido laminar mientras que se sigue notando la presencia de cristal líquido cúbico.

Como se puede observar en la zona ~ 0,8 y 0,9 de fracción en masa, no hay cambios en las temperaturas de transición respecto al diagrama del sistema Asc₁₆-agua. Se puede concluir entonces que la presencia de 25% de PEG₄₀₀ en una solución acuosa solo modifica las temperaturas de transición en una zona intermedia de concentraciones.

Entonces, **a bajas concentraciones**, no se modifican las temperaturas de transición ni las texturas que aparecen respecto del sistema Asc₁₆-agua. Esto se ve reflejado en la similitud en las entalpías de transición de estos sistemas. Esto concuerda con los resultados obtenidos en la referencia [1] donde el sistema ha sido estudiado el sistema hasta 0,4% en peso del surfactante.

Una posible explicación sería que a **bajas concentraciones** existe agua, que puede solubilizar una determinada proporción de PEG₄₀₀. El sistema PEG₄₀₀-agua no afectaría las fuerzas atractivas de Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas del surfactante porque el polímero pierde la capacidad de meterse entre estas por el agua que lleva. Por otro lado, la fuerte hidratación del PEG₄₀₀ posiblemente lo excluya de la capa polar de los agregados de Asc₁₆ y entonces tampoco llegaría a debilitar las interacciones entre los grupos polares del mismo. Entonces, la temperatura a la cual se forman los cristales líquidos no variaría.

A alta concentración de surfactante el efecto de disminución de temperatura a la cual aparecen la mesofases tampoco es evidente ya que la poca agua existente se encuentra relacionada con las cabezas polares y solo se encontraría circunscripta a láminas de agua entre cabezas polares del Asc₁₆. Entonces el PEG₄₀₀ no se mezclaría en

la proporción adecuada con el agua para debilitar las atracciones entre los grupos polares.

Por otro lado, en **concentraciones intermedias** existe una proporción de agua que está fuertemente unida a las cabezas polares y otro tipo de agua asociada al polímero que puede ocupar el espacio entre las cabezas polares. Esto debilitaría las atracciones entre las cabezas. En relación a las cadenas hidrocarbonadas entre si, al poseer cierta hidrofobicidad, el PEG₄₀₀, disminuiría las fuerzas de van del Waals entre las colas hidrocarbonadas [1], así debilitando la cohesión entre las cabezas polares por un lado y las colas, por otro, se pueden obtener cristales líquidos a menores temperaturas.

b) Diagrama de Fase del Sistema Asc₁₆ / 50 % Agua - PEG₄₀₀ 50 %

Aquí se realiza un análisis completo del comportamiento de fase del sistema Asc₁₆/Agua50%-PEG₄₀₀50%.

La Figura 3.20 muestra el diagrama de fases obtenido por medidas de CDB y microscopia de luz polarizada.

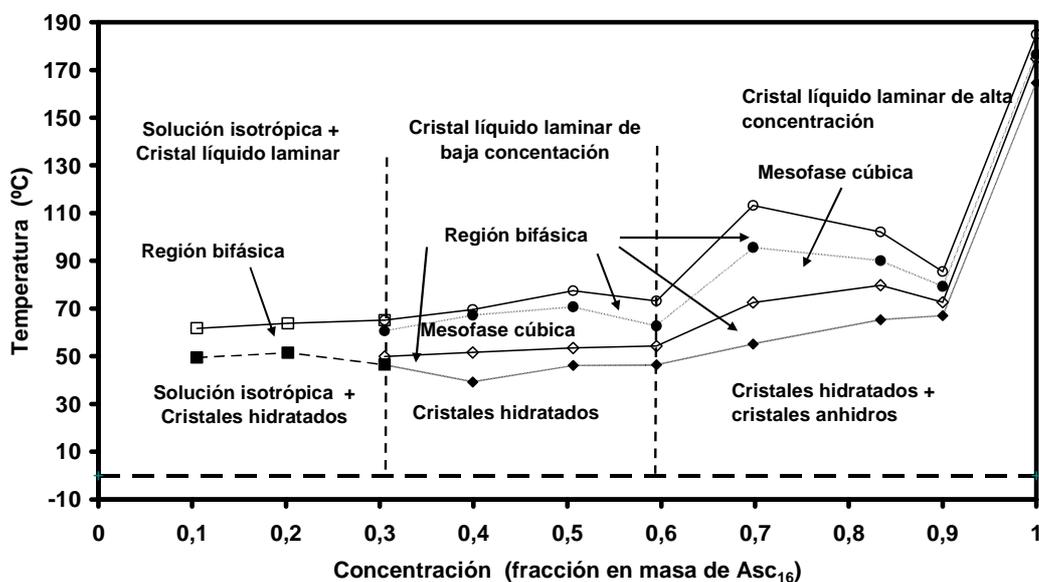


Figura 3.20: Diagrama de fases completo de Asc₁₆ en solución de PEG₄₀₀ al 50% en 50% de agua, donde se grafica temperatura (°C) vs. concentración en fracción en masa de surfactante.

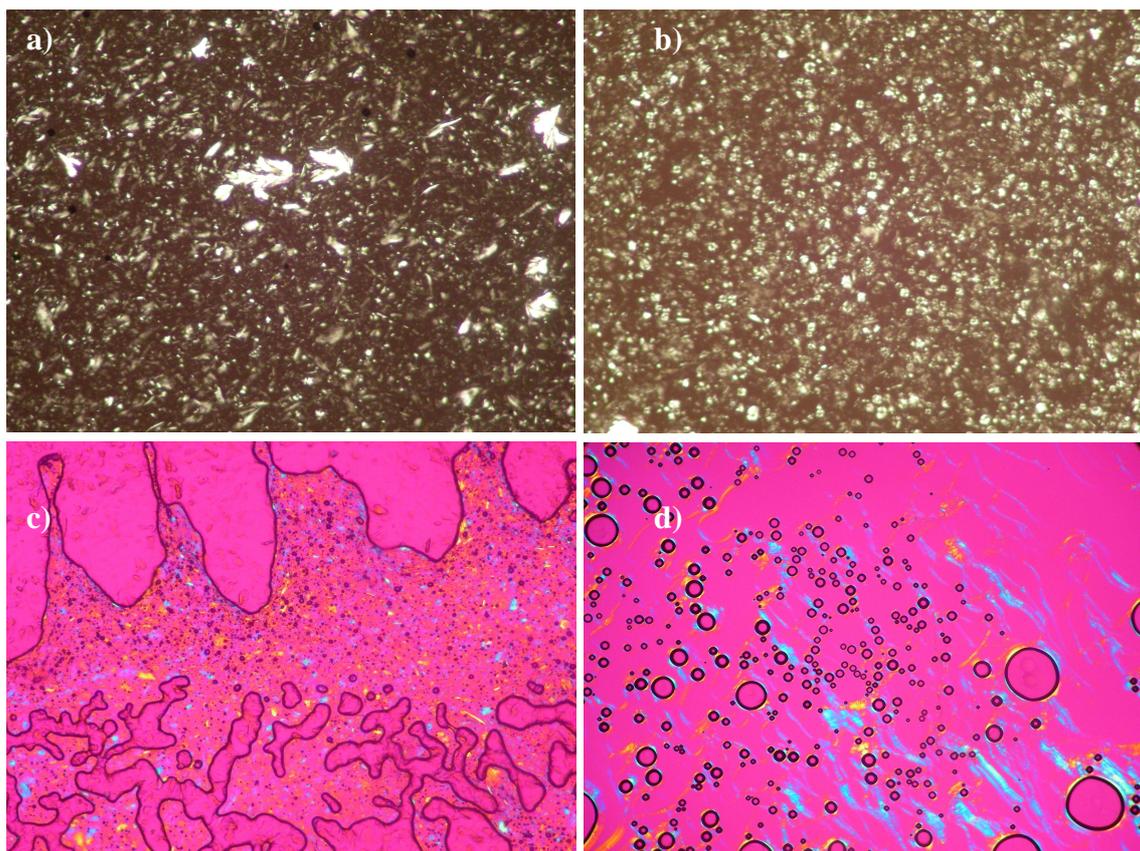


Figura 3.21: Asc₁₆ en solución de 50% de PEG₄₀₀ y 50% de agua: microfotografías con luz polarizada con y sin placa de retardación de 1 λ . Las fotos con fondo oscuro fueron sacadas sin placa de retardación y las que poseen fondo rosado fueron sacadas con la placa. a) Asc₁₆ 0,1 a 25 °C donde se observan cristales en líquido isotrópico, b) Asc₁₆ 0,1 a 58 °C donde se observan cristales con algunas figuras de interferencia negativas, c) Asc₁₆ 0,3 a 25 °C se observan cristales en líquido isotrópico, d) Asc₁₆ 0,6 a 75 °C se ven las vetas oleosas típicas de mesofases laminares. Todas las concentraciones son expresadas en fracción en masa.

En las fotografías a y b de la figura 3.21 se observa en una suspensión de cristales birrefringentes en una muestra de baja concentración de Asc₁₆ (0,1) a temperatura ambiente. Cuando esta muestra es calentada a 58 °C, además de los cristales existentes, comienzan a notarse algunas esferulitas negativas. Esto indica la presencia de una mesofase laminar.

Al aumentar la concentración a 0,3 en fracción en masa, a temperatura ambiente, se observa, en un medio isotrópico, cristales birrefringentes suspendidos en la solución acuosa de PEG₄₀₀ (figura 3.21c). Al aumentar la temperatura, esta suspensión presenta, a diferencia del sistema con 25% de PEG₄₀₀, una mesofase de cristal líquido cúbico

antes de la laminar. Aquí, la temperatura a la que aparece la mesofase laminar es sensiblemente ($\sim 10\text{ }^{\circ}\text{C}$) más baja que en el sistema con menor contenido de polímero.

En figura 3.21 d se observa la presencia de vetas oleosas típicas de un cristal líquido laminar en una suspensión de 0,6 fracción en masa a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$.

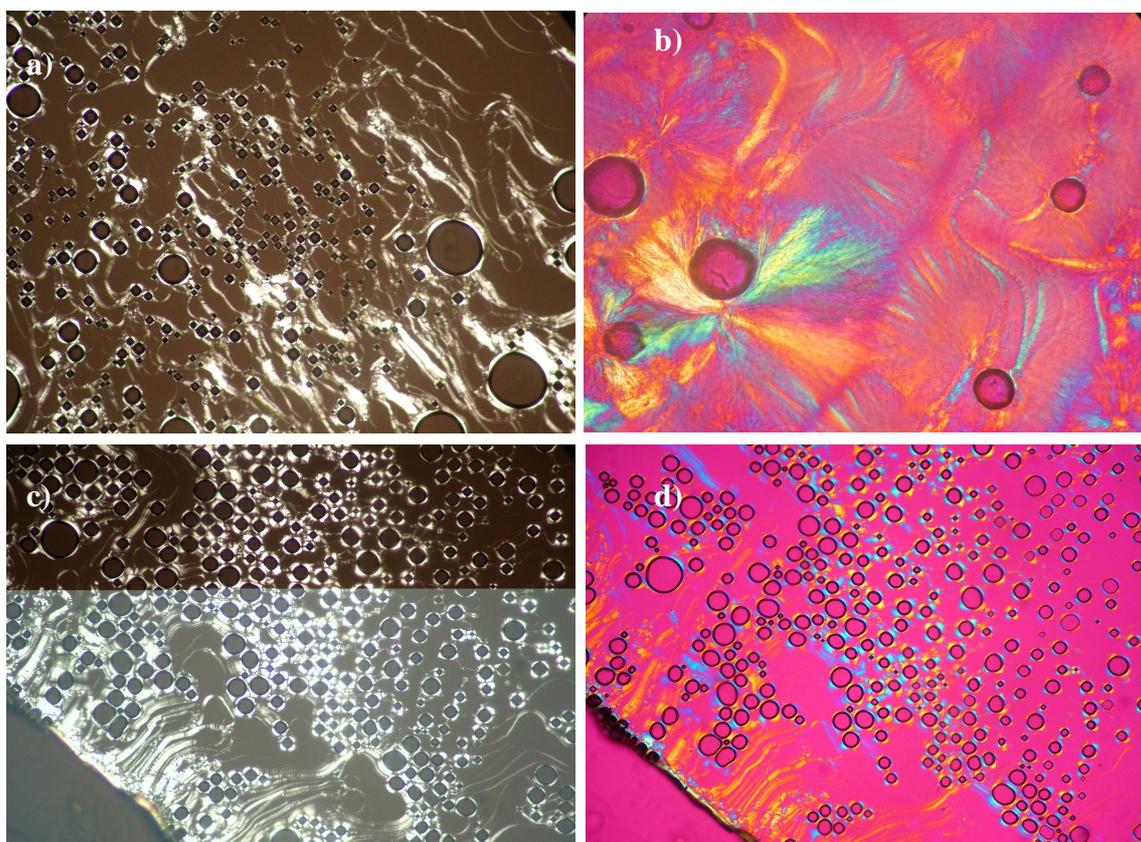


Figura 3.22: Asc_{16} en solución de 50% de PEG_{400} y 50% de agua: microfotografías con luz polarizada con y sin placa de retardación de 1λ . a) Asc_{16} 0,6 a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$, se ven las vetas oleosas típicas de mesofases laminares, b) Asc_{16} 0,6 enfriando, donde se observan estructuras típicas de gel provenientes de una fase líquido cristalina laminar, c y d) Asc_{16} 0,7 a $115\text{ }^{\circ}\text{C}$: se ve fase líquido cristalina laminar con figuras de mielina. Todas las concentraciones son expresadas en fracción en masa.

En la figura 3.22 a se observa para una suspensión de 0,6 (fracción en masa) a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$, la presencia de vetas oleosas típicas de un cristal líquido laminar. Al enfriar esta muestra se obtiene la imagen de la figura 3.22b donde se presenta una fase gel que cristaliza en forma de “cruz maltesa”. Para este sistema, el intervalo de concentraciones con menor disminución de las temperaturas de transición está entre 0,3 y 0,6 en fracción

en masa y no a partir de 0,4 como en el caso del diagrama de fases del sistema Asc_{16} en solución de 25 % de PEG_{400} y 75 % de agua.

Las fotografías de la figura 3.22c y d corresponden al mismo sistema concentrado de fracción en masa 0,7 sin y con placa de retardación de 1λ , respectivamente. Aquí se observan figuras de mielina y algunas esferulitas propias de una mesofase laminar.

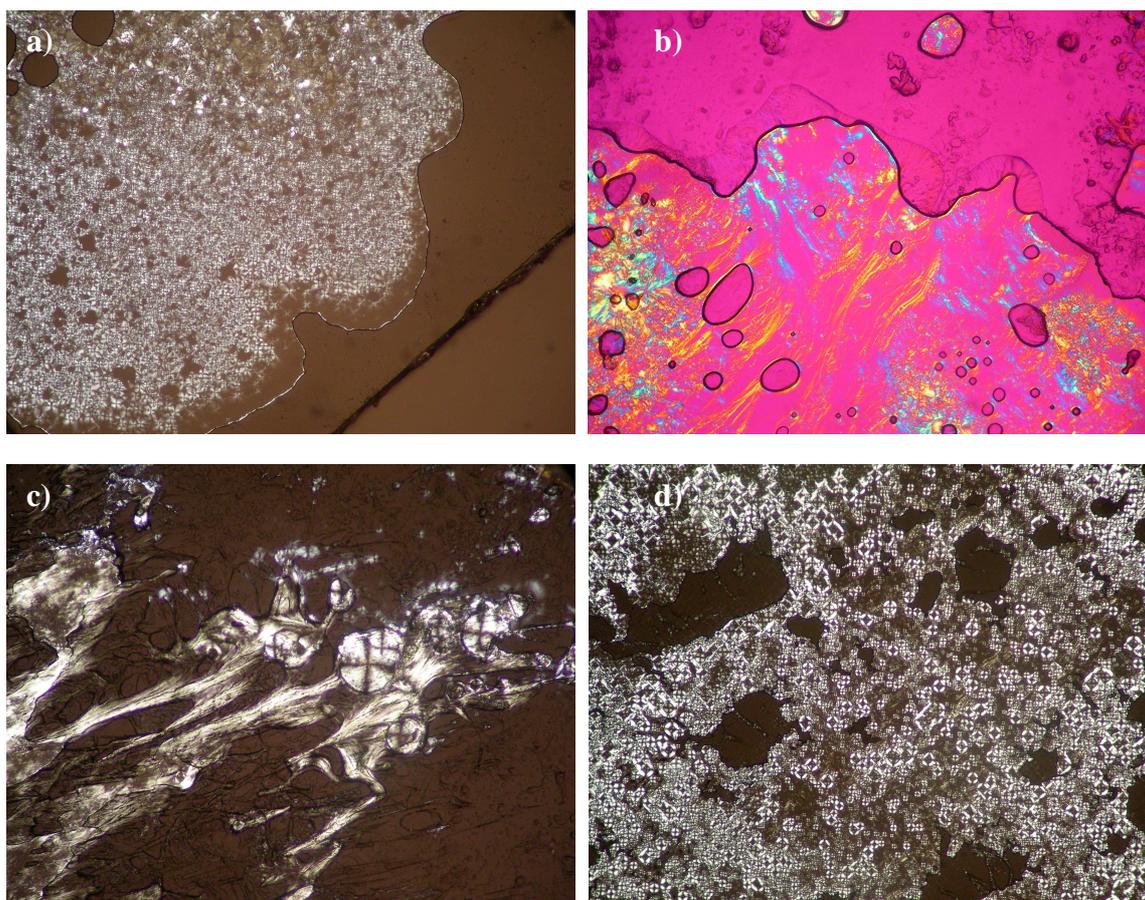


Figura 3.23: Asc_{16} en solución de 50% de PEG_{400} y 50% de agua: microfotografías de luz polarizada con y sin placa de retardación de 1λ . a) Asc_{16} 0,7 a $100 \text{ }^\circ\text{C}$, se observan un cristal líquido laminar con algunas núcleos de gel, b) Asc_{16} 0,8 a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ donde se observan un cristal líquido laminar con partes de gel y luego mesofase cúbica, c) Asc_{16} 0,9 a $80 \text{ }^\circ\text{C}$: se observa en coexistencia una mesofase laminar con una gel, d) Asc_{16} 0,9 $89 \text{ }^\circ\text{C}$, mostrándose estructuras típicas de mesofases laminares con pequeñas porciones de cristales líquidos cúbicos. Todas las concentraciones son expresadas en fracción en masa.

En la fotografía de la figura 3.23a se observa a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ y una concentración de fracción en masa de 0,7 esferulitas negativas propias de una mesofase laminar. Se puede

apreciar en la zona superior derecha la presencia de núcleos de gelificación. Esto puede deberse a que la temperatura no es homogénea y comienza a cristalizar por los bordes de la muestra, por donde se va enfriando.

En la fotografía siguiente 3.23b, se presenta además la coexistencia de estas fases laminares (líquido cristalina y gel) con un gran dominio de cristal líquido cúbico. Este dominio se evidencia por la suave textura que presenta el líquido isotrópico en la porción superior de la foto.

En la figura 3.23c se observa en una muestra de Asc_{16} 0,9 en fracción en masa, la aparición de una fase tipo gel con esferulitas positivas bien definidas tipo cruces maltesas. La foto ha sido captada luego que muestra hubo sido enfriada hasta 80 °C.

La figura 3.23d presenta para una muestra de Asc_{16} 0,9 en fracción en masa, un mosaico de esferulitas negativas y positivas que evidencian la presencia de cristal líquido laminar y porciones de mesofase cúbica (porciones isotrópicas dentro del mosaico) a 89 °C.

Cabe destacar que en este caso la viscosidad del sistema hace que la temperatura no sea homogénea en la muestra y por arriba de la temperatura de transición (85 °C) se siga viendo la mesofase cúbica.

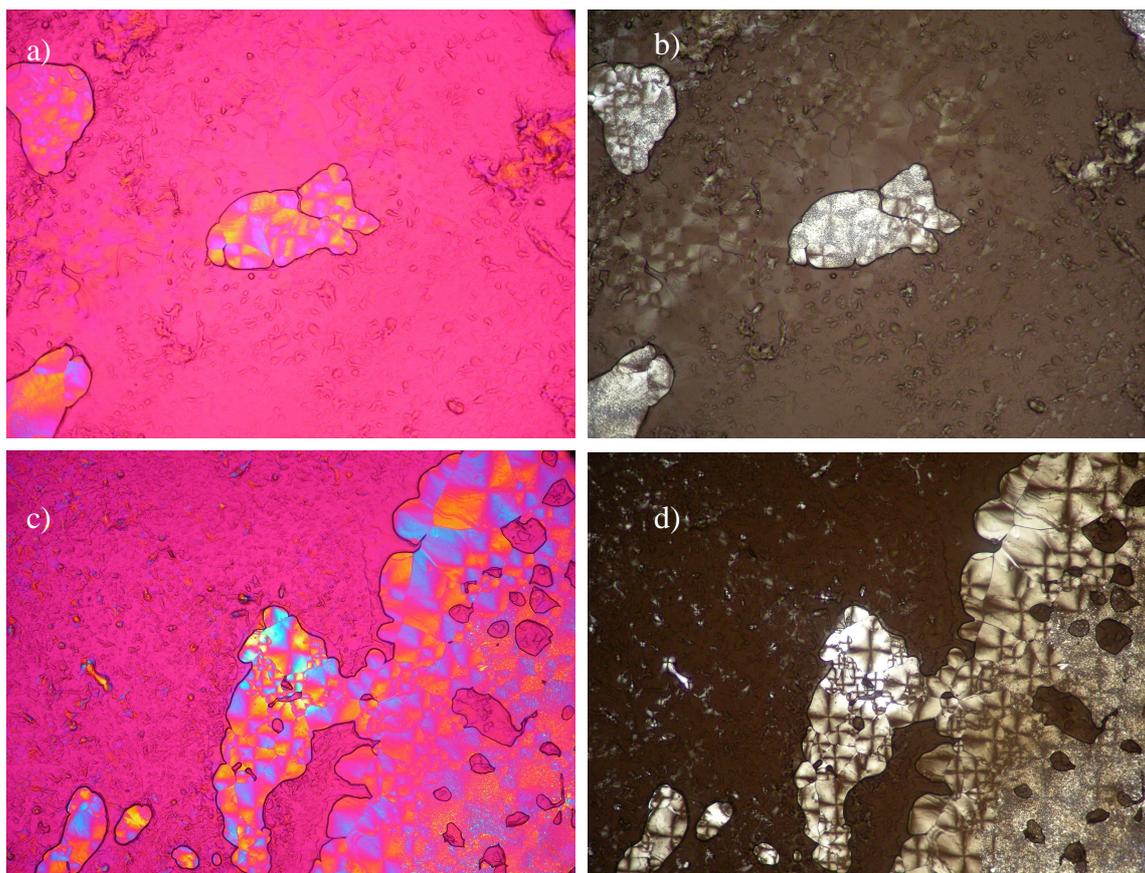


Figura 3.24: Asc₁₆ en solución de 50% de PEG 400 y 50% de agua: microfotografías con luz polarizada con y sin placa de retardación de 1 λ . Las fotos con fondo oscuro fueron sacadas sin placa de retardación y las que poseen fondo rosado fueron sacadas con la placa. a y b) Asc₁₆ 0,9 a 87 °C, se observan cristales líquidos laminares y gel, c y d) Asc₁₆ 0,9 a 83 °C (enfriando del anterior) donde se observan las mismas texturas que antes pero con mayor proporción de gel. Todas las concentraciones son expresadas en fracción en masa.

En las fotos a y b) de la figura 3.24 puede verse una muestra de Asc₁₆ 0,9 en fracción en masa a 87 °C con y sin placa de retardación, con gelificación a partir de una mesofase laminar.

En las figuras 3.24 c y d, se ve la misma muestra de la figura anterior, a menor temperatura (83 °C) y se observa gel (abajo hacia la derecha), proveniente de una mesofase laminar de alta concentración, con porciones de cristal líquido cúbico (huecos de líquido isotrópico con suave textura). Hacia la izquierda y arriba se presentan porciones de cristal líquido laminar más claro con esferulitas positivas.

Se quiere remarcar que en este sistema las temperaturas de transición disminuyen en todas las regiones hasta llegar a 0,6 de fracción en masa. Además se hace evidente la

presencia de mesofase cúbica a partir de una concentración de 0,3. Se recuerda que para el sistema anterior (PEG₄₀₀ al 25% en agua) el comienzo de la mesofase cúbica aparece ~ 0,4. Aquí el efecto del cosolvente se hace más evidente.

En este sistema la disminución de las temperaturas de transición se llevan a cabo desde 0,05 hasta 0,6 de fracción en masa. Aquí hay 100% más de polímero que en el sistema anterior. Esto podría evidenciar que el “efecto desordenador” del polímero es mayor cuando hay cierta proporción específica de agua-polímero presente.

c) Diagrama de Fase del Sistema Asc₁₆ / 25% Agua - 75% PEG₄₀₀

La Figura 3.25 muestra el diagrama de fases obtenido por medidas de CDB y microscopia de luz polarizada para este sistema. La determinación de la naturaleza de las diferentes fases presentes fue realizada por observación de texturas en el microscopio de polarización a diferentes concentraciones y temperaturas. Luego de esta figura se presentan las microfotografías y sus correspondientes interpretaciones.

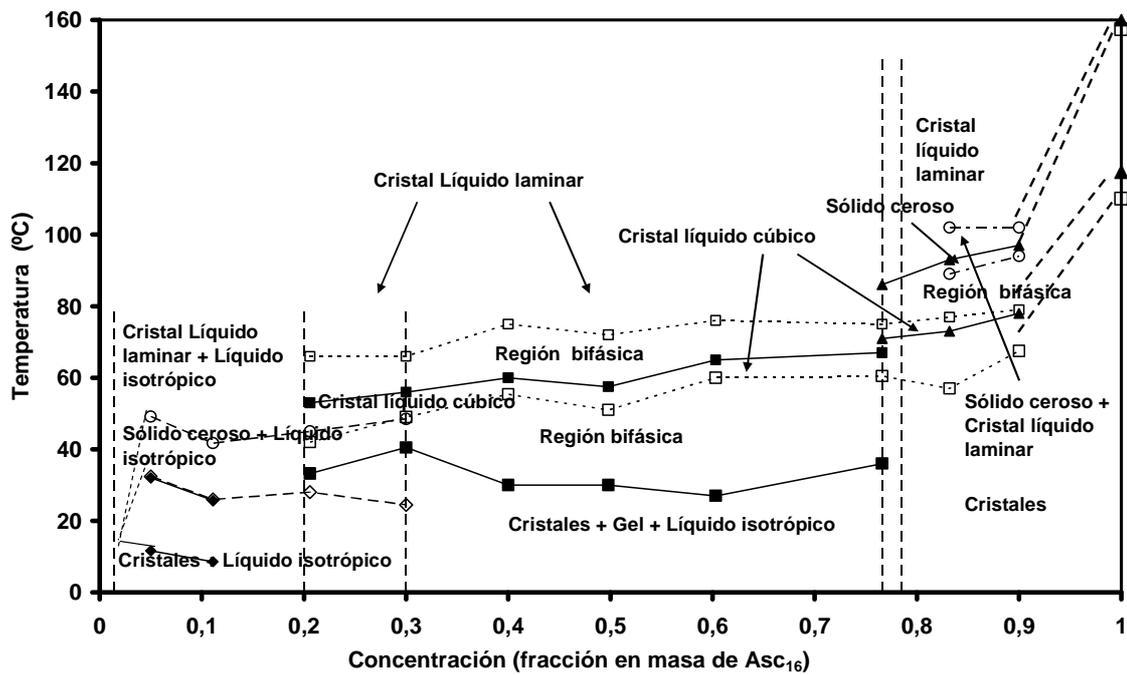


Figura 3.25: Diagrama de fase completo de Asc₁₆ en solución de PEG₄₀₀ al 75% en 25% de agua, donde se grafica temperatura (°C) en función de la concentración en fracción en masa de surfactante.

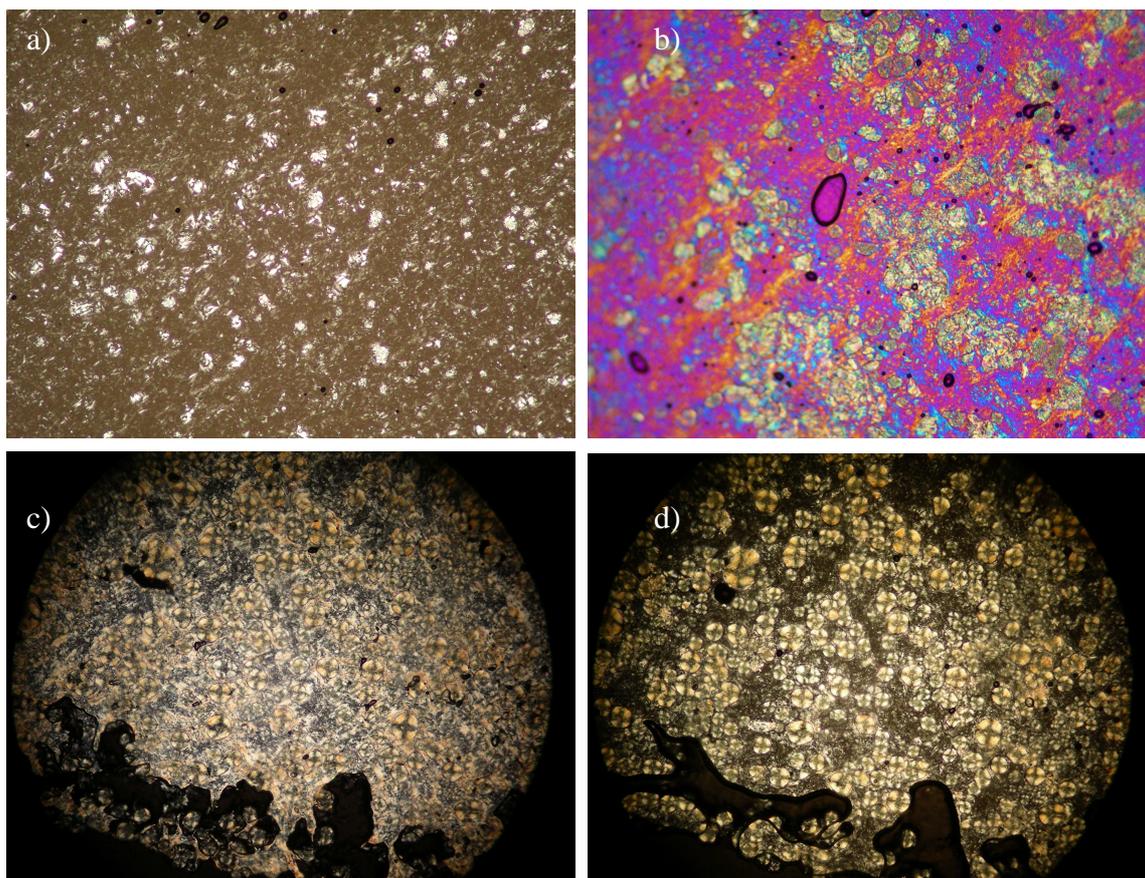


Figura 3.26: Asc₁₆ en solución de 75% de PEG₄₀₀ y 25% de agua: microfotografías con luz polarizada con y sin placa de retardación de 1 λ . Las fotos con fondo oscuro fueron sacadas sin placa de retardación y las que poseen fondo rosado fueron sacadas con la placa. a) Asc₁₆ 0,2 a 25 °C donde se observan cristales en líquido isotrópico, b) Asc₁₆ 0,3 a 25 °C donde se observan cristales con cúmulos amorfos en una matriz birrefringente, c) Asc₁₆ 0,5 a 30 °C: se ve una fase de gel con estructuras compatibles con mesofase cúbica, d) Asc₁₆ 0,5 a 35° C con texturas similares a las anteriores. Todas las concentraciones son expresadas en fracción en masa.

En la microfotografía figura 3.26a se pueden observar cristales en líquido isotrópico y en la b, cúmulos amorfos en un medio birrefringente. Estas fotos pertenecen a muestras con baja concentración de tensioactivo, 0,2 y 0,3 en fracción en masa respectivamente, tomadas a temperatura ambiente (25 °C).

Las microfotografías c y d de la misma figura corresponden a una muestra de fracción en masa de surfactante 0,5 a 30 y 35 °C respectivamente. En la primera, se observa una fase gel que se formó a partir de una laminar por enfriamiento. Esta fase gel comienza a hacerse más fluida a medida que aumenta la temperatura, tornándose más isotrópica.

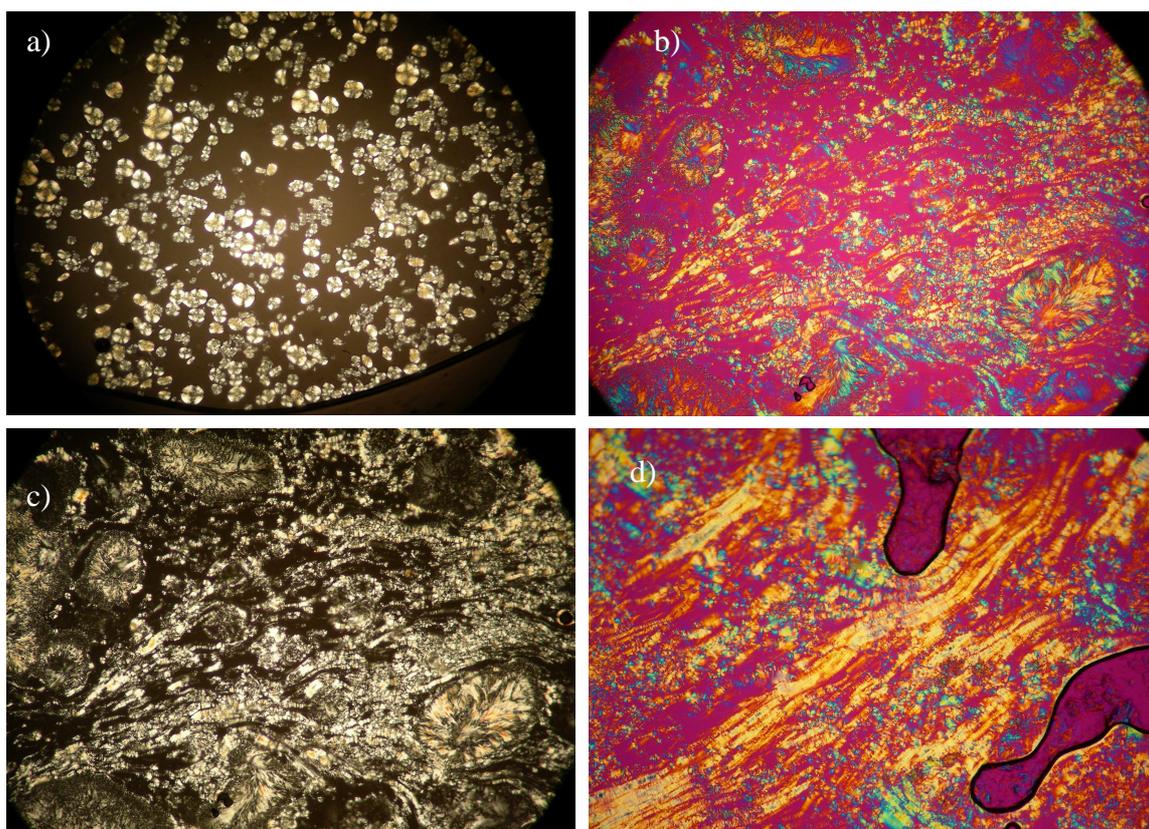


Figura 3.27: Asc₁₆ en solución de 75% de PEG₄₀₀ y 25% de agua: microfotografías con luz polarizada con y sin placa de retardación de 1 λ . , a) Asc₁₆ 0,5 a 40 °C se observan las mismas figuras que en la anterior pero en un líquido más isotrópico, b y c) Asc₁₆ 0,6 a 70 °C donde se observan vetas oleosas típicas de cristal líquido laminar y fase gel, d) Asc₁₆ 0,7 a 75 °C se observan vetas oleosas de alta birrefringencia con fase gel y mesofase cúbica. Todas las concentraciones son expresadas en fracción en masa.

En las microfotografías figura 3.27a se presenta un sistema de fracción en masa de surfactante 0,5 a 40 °C observándose texturas similares a las de la figura 3.26d aunque más fluidas e isotrópicas. Estas texturas aparecen luego del enfriamiento del sistema una temperatura de ~ 60 °C.

Las fotos b y c de la misma figura pertenecen a una muestra de fracción en masa de surfactante 0,6. Esta muestra fue calentada por encima de 80 °C y luego enfriada. A continuación, se fue calentando nuevamente y a 70 °C se tomaron las fotografías. La primera con y la segunda sin placa de retardación. Aquí se muestran texturas fluidas que se van asemejando a las vetas oleosas características de mesofases laminares. Sin embargo, el sistema se encuentra en estado de gel.

La foto d de la misma figura corresponde a un sistema de 0,7 de fracción en masa. Calentado a 75 °C presenta estas vetas oleosas definen a un cristal líquido laminar. Aquí las vetas oleosas presentes son gruesas y de alta birrefringencia.

Entonces, en este caso y de la misma forma que sucede en los sistemas con menos proporción de polímero, hay una región de cristal líquido laminar de baja y otra de alta concentración con características diferentes.

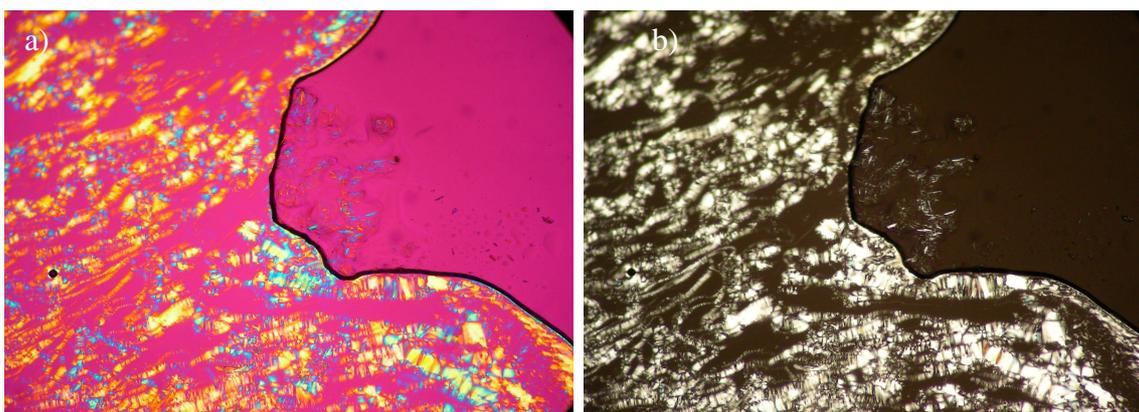


Figura 3.28: Asc₁₆ en solución de 75% de PEG₄₀₀ y 25% de agua: microfotografías con luz polarizada con y sin placa de retardación de 1 λ . a y b) Asc₁₆ 0,7 a 85 °C se observan vetas oleosas acompañadas por cristal líquido cúbico. Las concentraciones son expresadas en fracción en masa.

En la figura 3.28, las fotos a y b correspondientes a muestras de Asc₁₆ 0,7 en fracción en masa a 85 °C presentan zonas en la parte derecha con isotropía compatibles con la de las mesofases cúbicas, y en la izquierda las vetas oleosas típicas de cristal líquido laminar. A esta concentración la muestra a temperatura ambiente se presenta en forma de polvo humedecido, formando gránulos. Por esto, se supone que la isotropía no puede corresponder a un solvente sino a la formación de nuevas fases.

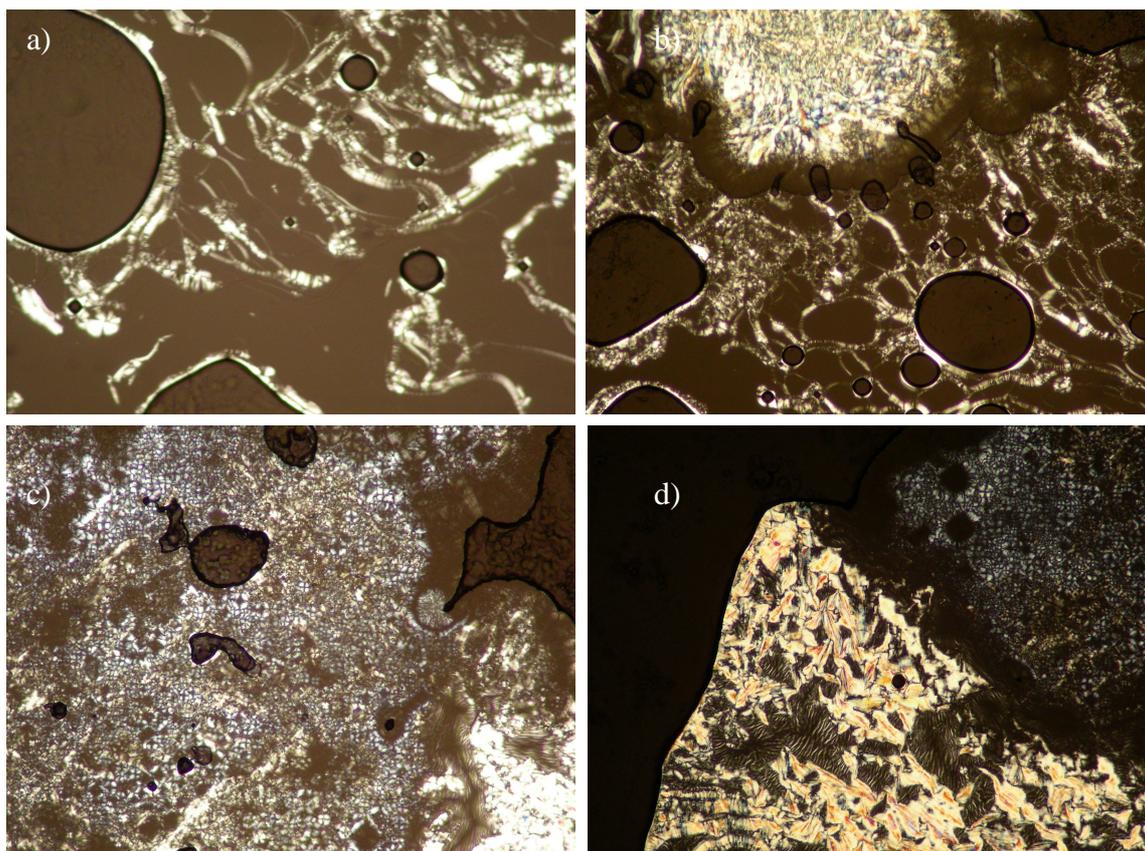


Figura 3.29: Asc₁₆ en solución de 75% de PEG₄₀₀ y 25% de agua: microfotografías con luz polarizada con y sin placa de retardación de 1 λ . a, b c y d) Asc₁₆ 0,8 secuencia de enfriamiento desde mesofase laminar a 100 °C hasta coexistencia con fase gel y cúbica a 73 °C. Todas las concentraciones son expresadas en fracción en masa.

La figura 3.29 presenta una secuencia de enfriamiento en la cual una muestra de 0,8 en fracción en masa del surfactante fue calentada hasta 100 °C y luego fue enfriada. En primer lugar, se obtuvo la foto a donde se presentan vetas oleosas típicas con algunas figuras de mielina características de las mesofases laminares. En la siguiente foto (b) se comienzan a notar en la parte superior núcleos de enfriamiento que tienden a cristalizar dando una fase de gel con una zona intermedia de solución isotrópica compatible con cristal líquido cúbico. Más abajo, se ven las mismas vetas oleosas que en la foto anterior. Esto se debe a que la parte más fría de la muestra está en la porción superior y la temperatura más alta está en la parte inferior. Las fotos c y d de la misma figura son en realidad la misma foto solo que la segunda está sacada con mayor resolución (objetivo de 10 X). En la primera, sacada con el objetivo de 4 X, se observa un mosaico de cristal líquido laminar con esferulitas positivas y negativas. En la porción inferior se

nota la presencia de una zona tipo gel que estaría en equilibrio con una mesofase cúbica y la laminar descripta.

En la segunda foto, más magnificada, se muestra más claramente, en la porción superior derecha, la presencia de un mosaico correspondiente a un cristal líquido laminar. Más abajo y hacia la izquierda, con características isotrópicas, una zona que corresponde a un cristal líquido cúbico y en la región más inferior e izquierda la presencia de una fase más cristalina tipo gel.

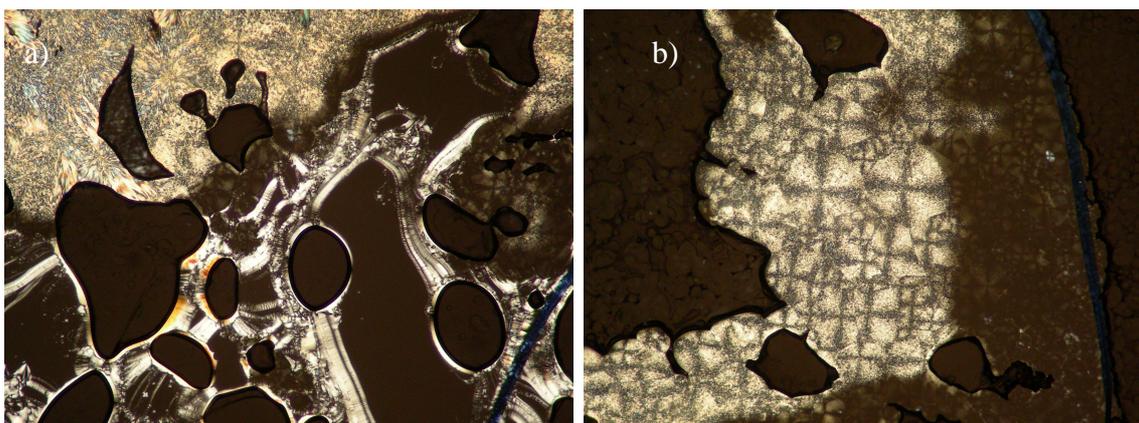


Figura 3.30: Asc_{16} en solución de 75% de PEG₄₀₀ y 25% de agua: microfotografías con luz polarizada con y sin placa de retardación de 1λ . a y b) Asc_{16} 0,9: secuencia de enfriamiento desde 95 hasta 80 °C, donde el sistema pasa desde cristal líquido laminar a gel y mesofase cúbica. Las concentraciones son expresadas en fracción en masa.

Una secuencia similar a la de la figura 3.29 se realizó para la 3.30, donde un sistema de 0,9 en fracción en masa de tensioactivo es enfriado desde 95 °C hasta 80 °C. Se observa, de arriba hacia abajo en la foto a, una fase tipo gel y a continuación una fase laminar con textura característica de vetas oleosas. En la siguiente foto, b, el sistema está formado en casi su totalidad por gel y una fase isotrópica compatible con una mesofase cúbica.

La disminución de la temperatura de transición en el sistema Asc_{16} en solución de 75% de PEG₄₀₀ y 25% de agua se hace importante hasta 0,8 de fracción en masa de Asc_{16} , aunque cuando el sistema se concentra más se comporta de la misma manera que el Asc_{16} -agua. De la misma forma que sucede para los sistemas previamente estudiados,

se necesita determinada proporción de agua para que el polímero llegue a reducir la temperatura de transición.

En el sistema con un 25% de PEG₄₀₀ en agua, el pico de fusión del agua en el CDB desaparece en una fracción en masa de 0,3 de Asc₁₆. Estos picos se encuentran desplazados, por lo que no se detectó aquí agua asociada a las superficies ni agua libre. En los sistemas con mayor proporción de PEG₄₀₀ este pico no se detectó, por lo que entonces se puede concluir que en ninguno de los sistemas con el polímero se detectaron los diferentes tipos de agua encontrados para el sistema Asc₁₆-agua. Esto puede ser causado por la fuerte hidratación del el polímero eliminando la mayor parte de agua del sistema.

A una muy alta concentración, > 0,8 en fracción en masa y por encima de ~ 80 °C, para todos los sistemas con polímero y también para el sistema Asc₁₆- agua, los cristales muestran una textura cerosa. Esta textura aparece cuando las bicapas polares de los cristales permanecen como "sólidas", mientras que las bicapas de cadenas hidrocarbonadas se encuentran "fundidas" [22]. Cuando las cadenas en los cristales hidratados se funden, la cohesión de la red polar se debilita por la hidratación, se colapsa y termina formando un cristal líquido. Sin embargo, la cohesión de las bicapas polares anhidras es superior y conserva la estructura cristalina externa cuando las cadenas alifáticas "se funden".

A partir de $C \approx 0,9$ de fracción en masa, para todos los sistemas, se evidencia un cambio repentino en el diagrama de fases. Esto probablemente significa que la hidratación de la molécula de anfifilo en los cristales es alrededor de 2,5 moléculas de agua por cada una de Asc₁₆, o sea, el 10% en peso del agua.

Cuando los sistemas concentrados se enfrían rápidamente desde el cristal líquido laminar, aparecen estructuras gruesas típicas de fase gel. A medida que la temperatura sigue bajando el sistema se convierte en una mezcla de solución isotrópica y microcristales.

3.6 Conclusiones del Capítulo

En este capítulo se determinó el diagrama de fases completo del sistema de Asc₁₆-agua. Para este sistema se muestran dos diferentes mesofases laminares, una cuando el agua libre está presente y otra cuando sólo hay agua de hidratación (capa de hidratación de primaria y secundaria). Cuando no existe agua libre, la formación de un cristal líquido laminar de alta concentración es precedida por una transición desde cristales hidratados a cristales líquidos cúbicos.

Para este mismo sistema (Asc₁₆-agua) se pudo determinar, a través del CDB y los modelos citados que el agua se encuentra en tres estados diferentes. La primera capa de hidratación se compone de alrededor de 11 moléculas de agua por cada molécula de surfactante, que están fuertemente ligadas al oxígeno y los átomos de hidrógeno de los grupos-OH de la cabeza polar por puentes de hidrógeno y no son detectables por CDB. La segunda capa de hidratación está formada por cerca de 50-60 moléculas de agua por molécula de surfactante, las cuales están asociadas con las de la primera capa de hidratación y por esto se encuentran afectadas lo suficiente por la presencia de las cabezas polares como para presentar un pico de fusión diferente a la del agua libre. El agua no incluida en estas dos categorías se comporta como agua libre. Los diferentes tipos de agua en el sistema Asc₁₆-agua afectan a la naturaleza de las mesofases formadas cuando el sistema se calienta.

En los sistemas Asc₁₆/agua-PEG₄₀₀, se observa una disminución de las temperaturas de transición a medida que aumenta la proporción del polímero. Además, bajo estas condiciones, existe un desplazamiento de las zonas de existencia del dominio de cristal líquido cúbico hacia menores concentraciones. No se ha encontrado en bibliografía información previa de la existencia de este dominio.

En concentraciones cercanas a 0,8 de fracción en masa, los cristales cerosos que poseen las bicapas hidrocarbonadas fundidas conservan su estructura exterior cristalina, mientras que las bicapas polares siguen siendo rígidas.

En los sistemas que contienen el polímero como cosolvente las texturas de las mesofases encontradas a alta y baja concentración también difieren entre sí. En estos sistemas no se han podido detectar los distintos tipos de agua.

3.7 Referencias del capítulo

- [1]- M. Ambrosi, P. Lo Nostro, L. Fratoni, L. Dei, B.W. Ninham, S. Palma, R.H. Manzo, D. Allemandi, P. Baglioni. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 6 (2004) 1401.
- [2]- S. Palma, R. Manzo, D. Allemandi, L. Fratoni, P. Lo Nostro. *Langmuir*. 18 (2002) 9219.
- [3]- L. Benedini, E. Schulz, P. Messina, S. Palma, D. Allemandi, P. Schulz. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 375 (2011) 178.
- [4]- P. Lo Nostro. *Internet Journal of Science Biological Chemistry*. (1997). <http://www.netsci-journal.com/97v4/index.htm>.
- [5]- P. Martindale. *The Complete Drug Reference*. 36th ed. The Pharmaceutical Press. (2009). London.
- [6]- R. Rowe, P. Sheskey, M. Quinn (Eds.). *Handbook of Pharmaceuticals Excipients*. 6th ed., Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association. (2009) 46. London-Chicago.
- [7]- P. Lo Nostro, B. Ninham, L. Fratoni, S. Palma, R. Manzo, D. Allemandi, P. Baglioni. *Langmuir*. 19 (2003) 3222.
- [8]- S. Palma, A. Jimenez-Kairuz, L. Fratoni, P. Lo Nostro, R. Manzo, D. Allemandi. *Il Farmaco*. 58 (2003) 1271.
- [9]- S. Palma, P. Lo Nostro, R. Manzo, D. Allemandi. *European Journal of Pharmaceutical Science*. 16 (2002) 37.
- [10]- P. Lo Nostro, G. Capuzzi, N. Mulinacci. *Langmuir*. 16 (2000) 1744.
- [11]- P. Lo Nostro, G. Capuzzi, P. Pinelli, N. Mulinacci, A. Romani, F. Vincieri. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 167 (2000) 83.
- [12]- R. Minardi, P. Schulz, B. Vuano. *Colloid and Polymer Science*. 275 (1997) 754.
- [13]- U. Köhler. *Canadian Journal of Spectroscopy*. 33 5 (1988) 122.
- [14]- S. Palma, B. Maletto, P. Lo Nostro, R. Manzo, M. Pistoresi-Palencia, D. Allemandi. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 32 (2006) 1.
- [15]- S. Palma. *PhD Thesis*. Ed. UNC. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. (2003) 49-55.

- [16]- M. Brown. *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*. Elsevier, Amsterdam (1998).
- [17]- J. McNaughton, C. Mortimer. *Calorimetría Diferencial de Barrido*. Perkin Elmer Corporation (1975).
- [18]- P. Schulz, J. Soltero-Martinez, J. Puig., *Thermal Behavior of Dispersed Systems*. Ed. N. Garti. Marcel Dekker, New York, 4 (2001) 121.
- [19]- K. Connors, G. Amidon, I. Stella, *Chemical Stability of Pharmaceuticals*, 2nd ed., Wiley-Interscience, New York, (1986).
- [20]- A. Wade, P. Weller. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 2nd ed. American Pharmaceutical Association, Washington DC. (1994) 15.
- [21]- G. Chernik. *Current Opinions in Colloid and Interface Science*. 4 (2000) 381.
- [22]- P. Schulz, M. Abrameto, J. Puig, F. Soltero-Martinez, A. González-Álvarez. *Langmuir*. 12 (1996) 3082.
- [23]- J.A. Rupley, G. Careri. *Advances in Protein Chemistry*. 41 (1991) 37.
- [24]- P. Schulz, J. Puig, G. Barreiro, L. Torres. *Thermochemical Acta*. 231 (1994) 239.
- [25]- J. Puig, J. Soltero, E. Franses, L. Torres, P. Schulz. *Surfactants in Solution*. Eds. K. Chattopdhyay, A. Mittal. Marcel Dekker, New York. (1996) 147.
- [26]- P. Schulz. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. 2nd ed. Ed. A. Hubbard. Taylor & Francis, New York. (2006) 6562.
- [27]- O. El Seoud, A. Blasko, C. Bunton. *Berichtes Bunsenges Physikalische Chemie*. 99 (1995) 1214.
- [28]- T. de Vringer, J. Joosten, H. Juninger. *Journal of Colloid and Polymer Science*. 264 (1986) 623.
- [29]- B. Bogdanov, M. Mihailov. *Journal of Polymer Science Polymer Physics Edition*. 23 (1985) 2149.
- [30]- J. Breen, D. Huis, J. de Bleijser, J. Leyte. *Journal of Chemical Society Faraday Transactions*. I 84 (1988) 293.
- [31]- N. Graham, M. Zulfiqar, N. Nwachuku, A. Rashid. *Polymer*. 30 (1989) 528.
- [32]- P. Schulz, J. Puig. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 71 (1993) 83.
- [33]- F. Tokiwa, K. Ohki. *Journal of Physical Chemistry*. 71 (1967) 1343.
- [34]- M. Kawai, Y. Ogawa, T. Takenaka. *Langmuir*. 2 (1986) 739.

Capítulo 4

Comportamiento de Fase de Asc_{16} en Monocapas de Langmuir y su Absorción en Monocapas con Fosfolípidos

4.1 Introducción

El estudio de sistemas en monocapas es una buena herramienta fisicoquímica con implicancias considerables en la ciencia y la tecnología. La técnica de monocapas es un método para estudiar las interacciones y afinidades entre diferentes anfífilos y las interfases aire-agua o aire lípido [1-3].

Un completo entendimiento del comportamiento de moléculas en una monocapa se obtiene por aplicación de la técnica de Langmuir, la cual consta básicamente en la formación de una monocapa con la molécula o moléculas de interés, sobre una subfase acuosa. [4].

El estudio de películas monomoleculares (monocapas) sobre superficies líquidas (acuosas) nos provee, además, por ejemplo: información mecánica, estabilidad de la monocapa ante el aumento de presión lateral; información eléctrica, mediante medidas de potenciales superficiales; información óptica, por cálculo de los índices de refracción de las películas e información química de las moléculas, como el grado de disociación; entre otras. Estas propiedades, junto con la posición y orientación en los diferentes arreglos formados, les confieren características particulares a cada monocapa [4,5]. Toda esta información, además, contribuye al entendimiento de las formas y tamaños moleculares.

Una técnica básica y ampliamente difundida para caracterizar monocapas de Langmuir son las isotermas de compresión, en las cuales se grafica el cambio en la presión superficial (π) en función del área molecular promedio (MMA), o sea, el área o sección promedio que ocupa cada molécula en todo el área circunscripta entre las barreras, en Å^2 . Esta medida se realiza generalmente en pseudo equilibrio dado que existe una compresión constante de la monocapa a medida que va registrándose la π en mN/m a una temperatura, T en °C.

Una propiedad de interés de las moléculas que puede ser estudiada formando estas películas es la eléctrica. Ésta puede evaluarse por medio de medidas de potencial superficial (ΔV). La adsorción de una película monomolecular a una subfase, trae como consecuencia un cambio en la función trabajo y por lo tanto, del potencial superficial. Este, ΔV , se produce como la diferencia entre el potencial de la subfase desnuda y el producido cuando se encuentra la película. Este potencial se puede medir mediante la técnica del capacitor vibrante o, como en este trabajo de tesis, con la de ionización [4].

Actualmente se puede obtener mucha información del comportamiento de una sustancia en monocapas insolubles mediante microscopía de ángulo de Brewster (BAM). Con esta técnica se puede observar la organización bidimensional, incluido el tamaño, forma y heterogeneidad de los dominios en este tipo de sistemas. Una ventaja de ésta, con respecto a otra técnica muy empleada en este tipo de estudios, la microscopía de fluorescencia, es que no es necesario el uso de sondas y por lo tanto, es menos probable que la muestra pueda sufrir alguna alteración durante el estudio [4].

Existe gran dificultad para que se produzcan películas insolubles monomoleculares por moléculas que posean menos de 12 átomos de carbono en su

cadena. En estos casos se pierden moléculas debido a la solubilidad de estos compuestos y por lo tanto, se pierde la estabilidad de la monocapa [4].

Según la información bibliográfica, el Asc₁₆ forma monocapas estables a temperatura ambiente [6]. Además, en esta referencia se informa la formación de monocapas mezcladas de este ácido con vitamina E y la inclusión de colesterol para aumentar la estabilidad de las mismas. El uso concomitante de diversos componentes en una monocapa, como en este caso, presta herramientas para desarrollar sistemas transportadores a base de lípidos o surfactantes, entre otros.

En bibliografía se encuentran estrategias para describir actividades farmacológicas de diferentes compuestos usando isotermas de adsorción. En la referencia [7] se describe cómo el cambio de potencial de Volta y la interacción de surfactantes catiónicos con monocapas de lípidos puede predecir la actividad bactericida de estos compuestos.

En la sección 4.4.1 se realizaron estudios de adsorción en monocapas donde se utilizó la *1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-Fosfolina* (DMPC). Además, en el capítulo 6 se realizaron liposomas con este lípido. Por esto, a continuación, se detallan algunas de las características de este compuesto.

4.1.1 Consideraciones del Fosfolípido Utilizado

Los fosfolípidos son moléculas anfifílicas y los principales componentes de las membranas celulares. Estos compuestos se pueden asociar formando una gran variedad de estructuras como las micelas y los liposomas [8,9].

Los fosfolípidos pueden ser aniónicos, catiónicos, neutros o zwitteriónicos, dependiendo de la naturaleza de su porción polar. Por ejemplo, los derivados de fosfatidilcolina (PC) son zwitteriónicos, los derivados de fosfoglicerol (PG) son negativos y existen otros que tienen diferentes porciones polares. Presentan alta solubilidad en compuestos orgánicos. Otras propiedades típicas que muestran estas moléculas, además de las características anfifílicas, es la temperatura crítica de

transición (T_c) que es la temperatura a la cual se comienzan a fundir las cadenas hidrocarbonadas. Por encima de de la T_c , los fosfolípidos pueden pasar de una fase cristalina a una de cristal líquido (mesofase) [10].

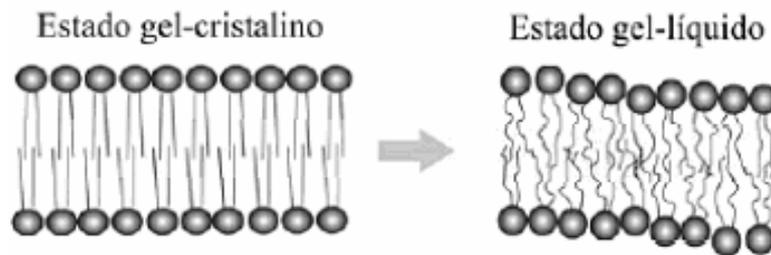


Figura 4.1: Representación esquemática de una membrana de lípido que pasa de un estado rígido (izquierda) a otro fluido (derecha) por encima de la temperatura de transición, T_c .

La *1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina* (DMPC) ($C_{36}H_{72}NO_8P$), es una fosfatidilcolina sintética. La fosfatidilcolina es uno de los lípidos más abundantes en las membranas de las células animales. Además, es muy importante en la región externa de la membrana, donde participa en la permeabilidad celular. La DMPC posee dos cadenas hidrocarbonadas (porción hidrofóbica) saturadas de 14 carbonos cada una. Su cabeza polar es zwitteriónica, por la presencia de un grupo fosfato (carga negativa) y un grupo amino terciario que le confiere la carga positiva. Esta molécula tiene carga negativa a pH neutro. Tiene una masa molar de 677,94 (g/mol) y una temperatura de transición de $\sim 23,5$ °C [10,11].

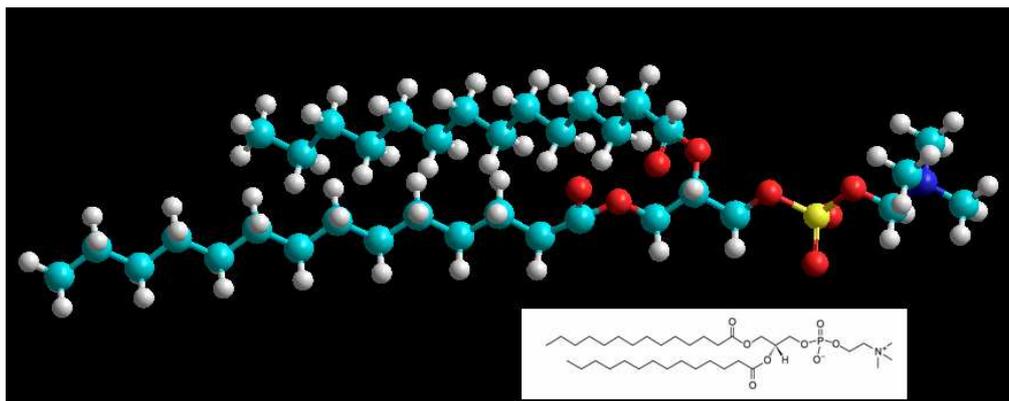


Figura 4.2: Representación de la molécula de *1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina* (DMPC), en 3D realizada con el programa Hiperchem 8 profesional. En Celeste: C, blanco: H, rojo: O, azul: N, Amarillo: P. El inserto muestra otra forma de representación.

Se eligió este lípido porque presenta una temperatura de transición de fase cristalina-gel a líquido cristalina apropiado para medir las perturbaciones de las membranas.

4.2 Objetivo

El objetivo de las investigaciones que se detallan en este capítulo es estudiar el comportamiento superficial del Asc₁₆ en monocapas de Langmuir con y sin diferencia de potencial y microscopia de ángulo de Brewster (BAM). Además, mediante isotermas de adsorción establecer la interacción entre al Asc₁₆ y monocapas con fosfolípidos.

4.3 Experimental

4.3.1 Materiales

Se utilizó el mismo palmitato de ascorbilo (Asc_{16}) que en las experiencias anteriores. La *1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina* (DMPC) fue comprada en Avanti polar Lipids, Inc. (Alabama, USA). El agua fue purificada por un sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MA), para obtener un producto con una resistividad de $\sim 18,5$ M Ω . La ausencia de impurezas con actividad superficial es corroborada como se describe en [12].

4.3.2 Métodos

Las monocapas insolubles o de Langmuir se producen y caracterizan por en un instrumento que se conoce como balanza de Langmuir, la cual consta de una cubeta que contiene la subfase acuosa y cuenta con barreras móviles que son usadas para comprimir la monocapa. Esta cubeta está construida con materiales hidrofóbicos como el Teflón.

En la figura 4.4 se muestra una representación de una balanza la Langmuir como la que se usó en este estudio. Aquí la muestra en estudio se encuentra disuelta en un líquido inmiscible en agua, como el cloroformo o mezcla de este con metanol (1:1).

El estudio se basa en la siembra de una cantidad conocida de las moléculas sobre una subfase acuosa, para luego, comprimir las o comprimir las y expandirlas por las barreras móviles después de que el solvente se haya evaporado.

La formación de la monocapa, cuando se trabaja a temperatura constante, es evidenciada por medio de la isoterma presión superficial (π) en función del área de la monocapa.

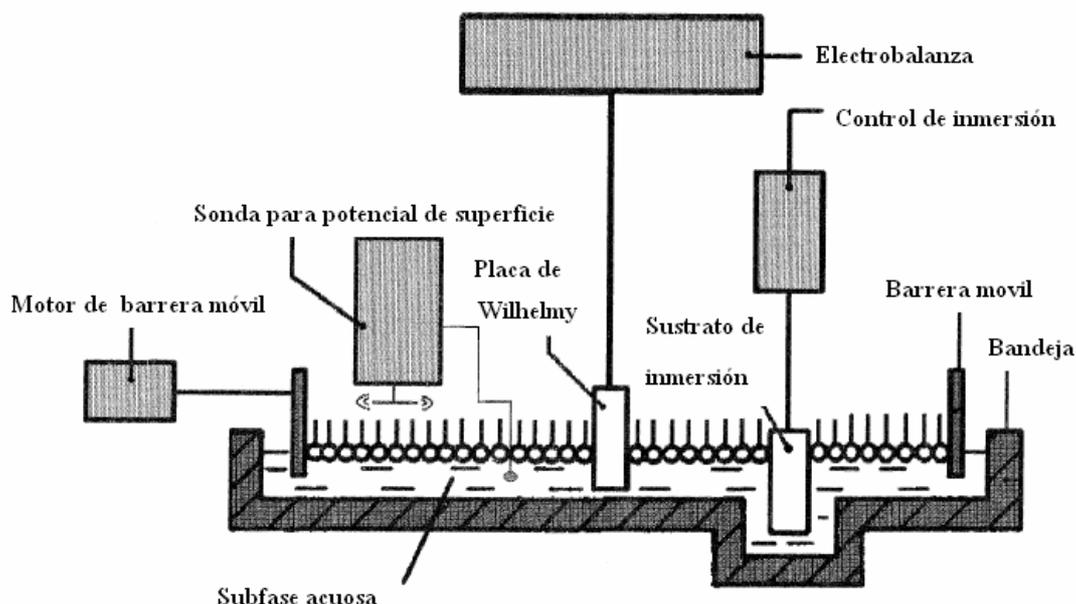


Figura 4.4: Representación esquemática de una Balanza de Langmuir con placa Wilhelmy para medir presión superficial usando una electrobalanza. Posee además, una sonda de potencial superficial. También se muestra el sustrato de inmersión (“*dipper*”) empleado para transferir una monocapa Langmuir-Blodgett a un soporte sólido.

4.3.2.1 Isotermas de Compresión: Presión Superficial-Área Molecular

Se realizaron las isotermas de compresión de soluciones de Asc₁₆ a diferentes temperaturas. Fueron esparcidos 25 µl de una solución de este compuesto en una cubeta de Teflón de 266 cm² llena con 200 ml de subfase. La solución de Asc₁₆ utilizada fue de 1mg/ml en una mezcla (1:1) metanol:cloroformo. Las soluciones acuosas usadas como subfase y sus correspondientes pH (pH_b) fueron: a) agua, $pH_b \sim 6$, b) solución salina $pH_b \sim 6$ (NaCl 145mM), c) solución salina $pH_b \sim 3$ (NaCl 100 mM ajustado a pH 3 con HCl), d) solución salina $pH_b \sim 8$ (NaCl 90 mM ajustado a pH ~ 8 con TrisCH). El tris, tris (hidroximetil) aminometano, (HOCH₂)₃CNH₂, es un regulador (“*buffer*”) orgánico de pH que tiene un $pK_a = 8,06$.

El film permaneció 5 minutos en reposo para que se evapore el solvente y se alcance la relajación de 0 mN/m. Luego se comprimió isotérmicamente (la velocidad de compresión fue de $2 \pm 1 \text{ \AA}^2 \text{ moléc}^{-1} \text{ min}^{-1}$) hasta la presión objetivo. La presión superficial fue determinada con una placa de Pt usando el método de Wilhelmy con un equipo KSV minicubeta (KSV, Helsinki, Finlandia) dentro de una caja acrílica.

Consecuentemente se midió el área total del film. El área molecular promedio (MMA) fue calculada para cada experimento a partir del área total de la monocapa y los datos de concentración de la solución de Asc₁₆. La temperatura de la subfase (± 5 °C) fue controlada mediante un baño Haake con circulación externa y fue mantenida a 25 °C. Un experimento representativo de un conjunto de tres experimentos independientes se muestra en cada una de las figuras que difieren en MMA y las medidas de presión superficial en menos de 2 \AA^2 y $0,2 \text{ mNm}^{-1}$, respectivamente.

Con el fin de analizar el comportamiento elástico de la película de moléculas adsorbidas, se calcula el módulo de compresibilidad, C_s^{-1} , el cual puede ser calculado a partir de la pendiente de la curva π en función de MMA. Por lo tanto, partir de los datos de la isoterma se calcula este módulo, como se muestra en la referencia [5]:

$$C_s^{-1} = -MMA \left(\frac{d\pi}{dMMA} \right)_T$$

(ec. 4.1)

donde MMA, representa al área molecular promedio, en \AA^2 ; π es la presión superficial en mN/m y T la temperatura en ° C. El equipo se encuentra dentro de una cubierta acrílica. Por esto, todas las medidas pudieron ser realizadas en atmósfera de N₂ para evitar la posible oxidación del Asc₁₆ [13].

4.3.2.2 Medidas de BAM

La microscopia de ángulo de Brewster (BAM) muestra la organización bidimensional de una monocapa en una balanza de Langmuir, incluyendo su forma y tamaño de los dominios. En este instrumento la fuente de luz emite luz polarizada, la cual incide sobre la superficie desnuda o límpia de la subfase con un ángulo de $53,1^\circ$. Este es el ángulo de Brewster. La imagen recolectada por el detector en este caso es el fondo, observándose una imagen oscura porque no hay luz reflectada. En estas condiciones, cuando aparece una monocapa sobre la subfase y la luz polarizada incide sobre esta, se genera una modificación de las condiciones del ángulo de Brewster y se detecta una imagen diferente a la del fondo. Así se pueden observar los diferentes estados bidimensionales de las monocapas.

Las monocapas se prepararon como se describe más arriba, usando un equipo de monocapas pequeño Modelo 102M (NIMA Technology Ltd, Coventry, Inglaterra). Esta balanza de Langmuir se montó sobre un Elipsómetro Nanofilm EP3 (Accurion, Goettingen, Alemania) utilizado en la modalidad de microscopía de ángulo de Brewster (BAM). El cero de reflexión se estableció con un láser de $\lambda = 532$ nm polarizado incidiendo sobre la superficie acuosa desnuda (agua sin monocapas) calibrado experimentalmente en el ángulo de Brewster ($\sim 53,1^\circ$). Después de la formación de la monocapa y la compresión, la luz reflejada se recogió mediante un objetivo 10X. El nivel de gris de cada píxel de las imágenes de BAM está directamente relacionado con el cuadrado del espesor de la película [14].

4.3.2.3 Mediciones de Potencial Superficial

El potencial superficial de Volta (ΔV) se registró en compresión de la monocapa esparcida sobre la subfase acuosa a 25°C usando una balanza de Langmuir circular (Monofilmetter) construida en el laboratorio. Se registró la diferencia de potencial mediante un electrodo superficial ionizante de aire de ^{241}Am colocado ≈ 5 mm por encima de la interfaz y un electrodo de $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$ (3M) de referencia sumergido en la subfase [15].

El potencial superficial medido para una superficie cargada debe estar dado por [5]:

$$\Delta V = (4\pi\mu_{\perp}/MMA) + \psi_0 \quad (\text{ec. 4.2})$$

Donde μ_{\perp} es el momento bipolar general resultante del surfactante en dirección perpendicular a la interfase y ψ_0 es la diferencia de potencial debida a la doble capa entre la superficie y el seno de la subfase. El valor de ψ_0 fue calculado de acuerdo a la ecuación de Poisson-Boltzman, como se describe en [16], lo que permite calcular el parámetro μ_{\perp} .

4.3.2.4 Estado de Ionización del Asc_{16} en Función del pH de la Subfase

Una monocapa de moléculas cargadas negativamente dará lugar a una doble capa de iones, que atrae a los protones a la superficie e induce una disminución del pH de la

superficie (pH_s) de la siguiente manera [5]:

$$pH_s = pH_b + F \psi_0 / 2,3RT \quad (\text{ec.4.3})$$

donde F es la constante de Faraday, RT es la energía térmica y pH_b es el pH en el seno de la subfase. El potencial ψ_0 es función de de la fuerza iónica, de la densidad de carga superficial [16] y del pH_s . Por lo tanto, ψ_0 depende también del grado de disociación de las moléculas de Asc₁₆.

Por otro lado, pH_s depende de a su vez de ψ_0 (ec. 4.3) [17]. Esto implica una mayor complejidad de cálculo.

Considerando la ecuación de densidad de carga superficial de Poisson-Boltzman, se establece la siguiente relación entre el grado de disociación (α) y el potencial de doble capa ψ_0 , por la que se puede obtener el pH_b :

$$0 = \sqrt{2RT\epsilon\epsilon_0} \left[\sum_i C_i^b \exp(-Fz\psi_0 / RT) - \sum_i C_i^b \right]^{1/2} +$$

$$F / MMA \left[K_a / K_a + [H^+]_b \exp(-F\psi_0\alpha / RT) \right]$$

(ec.4.4)

donde ϵ es la permitividad del medio (80), ϵ_0 es la permitividad en el vacío, C_i^b es la concentración de iones en el medio, K_a es la constante de disociación, z es la carga del ión y $[H^+]_b$ es la concentración de protones en el medio. Entonces de la ecuación 4.4 pueden ser calculados numéricamente para cada valor de pH_b los valores de ψ_0 y α conociendo todos los otros parámetros.

4.3.2.5 Adsorción de Asc₁₆ a Monocapas de Fosfolípidos

Se registraron cambios en la presión superficial y potencial superficial a área constante y de forma continua, sobre una solución salina (NaCl 145 mM) y agua a pH ~ 6 y a 25 °C, usando una balanza de Langmuir circular (Monofilmeter) construida en el laboratorio.

El potencial y la presión se obtuvieron luego de la inyección de 100µl de una solución de Asc₁₆ 1,23 mg/ml en etanol en el seno de cada subfase (15ml). La

concentración final de Asc₁₆ en la subfase fue de 13,3 μM. Las curvas de adsorción se realizaron sobre una superficie sin fosfolípidos y otra con monocapas de fosfolípidos. Estas monocapas se realizaron con una fosfatidilcolina zwitteriónica (DMPC). Sus características se han presentado en la introducción de este capítulo. En primer lugar se esparció el fosfolípido sobre la subfase en las concentraciones adecuadas hasta llegar a 20 mN/m. Luego se depositó el Asc₁₆ en el seno de la subfase (por debajo de la monocapa de lípidos) y se registraron las variaciones de potencial y presión.

4.4 Resultados y Discusión

4.4.1 Dependencia de la Temperatura en el Comportamiento de Fase de Monocapas de Asc₁₆.

Las isothermas de compresión de monocapas adsorbidas de Asc₁₆ en solución salina a $pH_b \sim 6$ muestran la presencia de un líquido expandido (LE) en fase de baja densidad molecular (alta área molecular promedio, MMA) (ver figura 4.5 a), presentando valores bajos de módulo de compresibilidad ($Cs^{-1} < 50$ mN/m, ver figura 4.5 b). En condiciones iniciales de compresión y a bajas temperaturas, se observa en la figura 4.5a una meseta cercana que es característica de una transición de fase de primer orden. La figura 4.5b muestra una fase comprimida con valores de $Cs^{-1} \sim 200$ mN/m, indicando un carácter de líquido condensado (LC) [18]. Trabajando a temperaturas menores de 20 °C, una mayor compresión (~ 65 mN/m) lleva al colapso de la monocapa.

Como era de esperar, la presión de transición de fase de LE-LC aumenta con la temperatura de forma similar a otros sistemas descritos en bibliografía [19]. Por otro lado, la presión de colapso disminuye sustancialmente por encima de 20° C, favoreciendo el colapso de la fase como se observa en la figura 4.5a. Además, se presenta un comportamiento similar cuando se utiliza el agua como subfase mostrando una mayor estabilidad de la fase condensada a bajas presiones superficiales, reduciendo así las presiones de transición (ver recuadro en la figura 4.5a). Esta diferencia se discutirá a continuación.

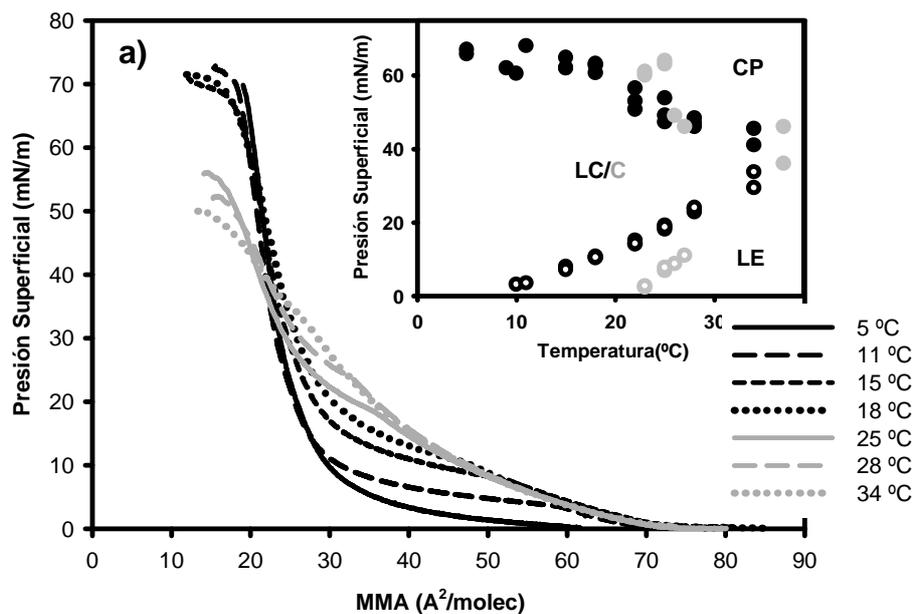


Figura 4.5 a. Comportamiento superficial de monocapas de Asc_{16} en solución salina a $pH_b \sim 6$. Isotherma de compresión. Las figuras muestran curvas representativas de un conjunto de curvas de tres experimentos independientes. El inserto en el gráfico muestra un diagrama de fase de monocapas de Asc_{16} en una subfase de solución salina a $pH_b \sim 6$ (círculos negros) y otra subfase de agua (círculos grises). LE corresponde a la región de líquido expandido, LC a la de líquido condensado y CP a la fase de colapso. Los círculos abiertos indican el comienzo de la transición LE a LC, los círculos cerrados indican la presión de colapso. Cada punto corresponde a un experimento individual.

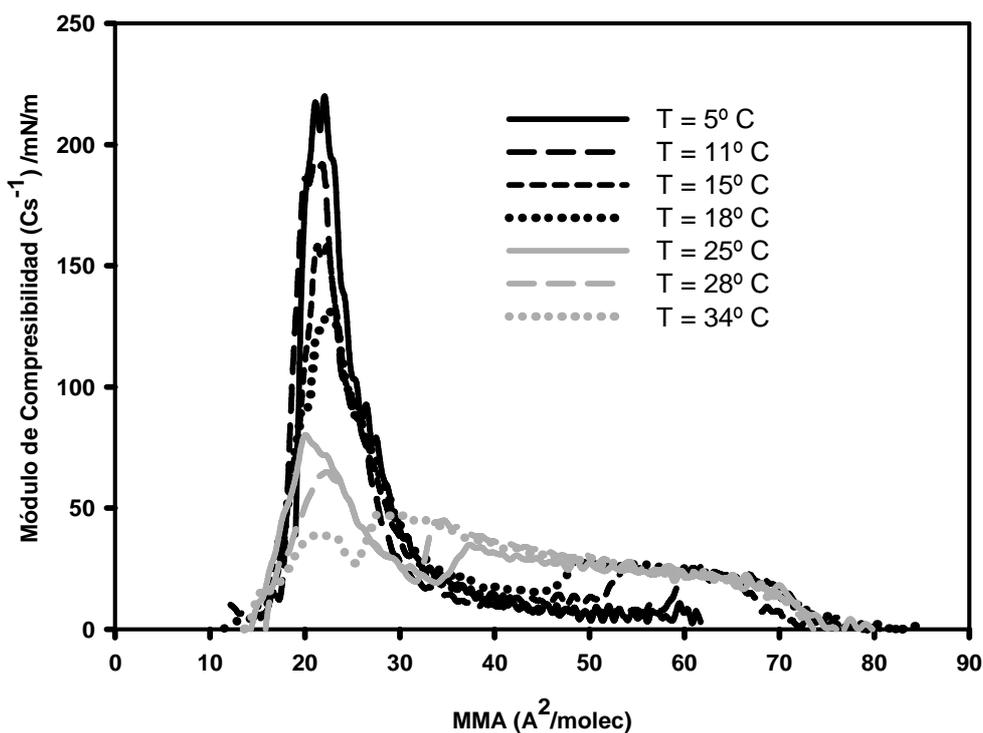


Figura 4.5 b. Comportamiento superficial de monocapas de Asc₁₆ en solución salina a pH_b ~ 6. Módulo de compresión de monocapas de Asc₁₆ en función de la temperatura. Las figuras muestran curvas representativas de un conjunto de curvas de tres experimentos independientes.

El MMA a la presión de colapso muestra valores entre 19 a 22 Å² Molec⁻¹. La comparación de este valor con el área calculada en la referencia [20] a partir de la sección transversal del grupo polar de Asc₁₆ (21 Å² Molec⁻¹) sugiere un fuerte empaque de las moléculas de Asc₁₆ en la superficie en la fase de LC.

4.4.2 Cálculo de la Fracción de Disociación de Monocapas de Asc₁₆ como Función del pH de la Subfase y la Concentración Salina.

Teniendo en cuenta las características ácidas del grupo C₃-OH del anillo de ascórbico se estimó la fracción de ionización de las moléculas en la superficie de monocapa (α) como función del pH de la subfase (pH_b) para una concentración de iones en la subfase de 290 y 1×10^{-3} mM, considerando la ecuación de Poisson-Boltzman para la densidad de carga superficial (véase Sección experimental). Los resultados de estos cálculos son mostrados en la figura 4.6.

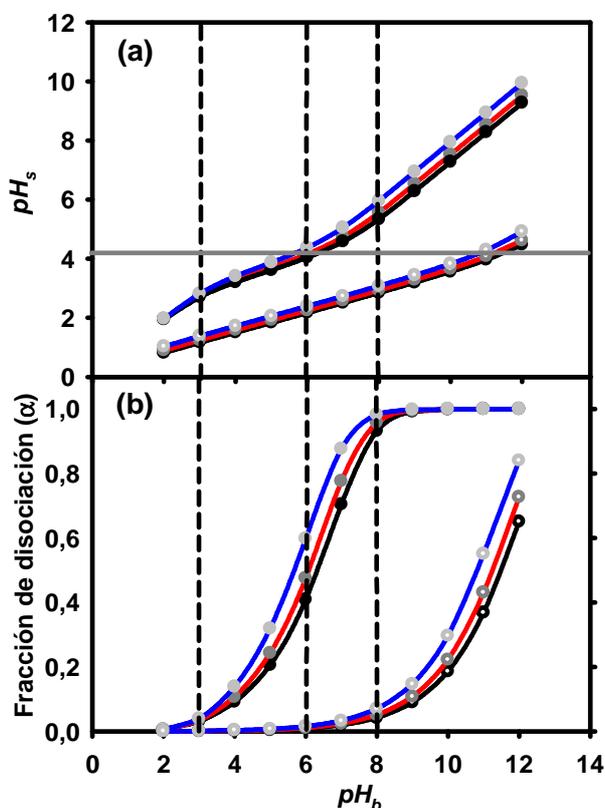


Figura. 4.6. Comportamiento de ionización del Asc₁₆ en la interfaz. a) pH calculado en la superficie y b) cálculo de la fracción de disociación de una molécula de palmitato de ascorbilo ácido de $pK_a = 4,2$ organizada en la interfase. La densidad molecular corresponde a una MMA de 65 (azul), 40 (rojo) o 30 (negro) $\text{Å}^2 \text{Molec}^{-1}$. La concentración de iones de la subfase a diferentes pH del interior de la solución fue 290 mM (círculos cerrados) o 1×10^{-3} mM (círculos abiertos). La línea gris horizontal en a) representa el pK_a del Asc₁₆. Las líneas negras verticales discontinuas indican las condiciones de pH de la subfase usadas en este trabajo.

Puesto que la densidad molecular aumenta con la disminución en MMA, se estableció un incremento negativo de la densidad de carga en compresión para moléculas de Asc₁₆ parcialmente ionizadas, las cuales inducen un potencial negativo de doble capa (ψ_0) [16]. Siguiendo la ecuación 4.3, un valor negativo de ψ_0 (inducido por una superficie cargada negativamente debido a la pérdida del protón del -OH fenólico en posición 3 del anillo ascórbico) lleva a una reducción del pH superficial (pH_s). Esto se muestra en la figura 4.6a. En la figura 4.6b se presenta la fracción de disociación de Asc₁₆ (α), la cual disminuye con la compresión. Este efecto se observa particularmente a $pH_b \sim 6$ y en altas condiciones salinas. Esto indica que durante la compresión isotérmica la densidad de carga superficial no se mantiene constante cuando se trabaja con una subfase de solución salina como la mostrada en la figura 4.5a.

La figura 4.6a también predice que cuando la monocapa se forma en la superficie del agua, con un típico $pH_b \sim 6$, el pH de la superficie, pH_s , es de $\sim 2,2$, por lo que las moléculas de Asc₁₆ estarán presentes como moléculas neutras (fracción de disociación $\alpha \sim 1 \times 10^{-2}$). Este hallazgo puede explicar las diferencias observadas en el diagrama de fases que se muestra en el inserto de la figura 4.5a cuando se usa como subfase una solución salina. Por esto, usando agua como subfase y aumentando la presión, se genera una disminución del pH que hace que el Asc₁₆ se encuentre presente mayormente como molécula neutra. Como consecuencia, las interacciones intermoleculares entre los anillos ascórbicos pueden estar favorecidas y por lo tanto, la fase condensada se puede alcanzar a presiones superficiales bastante menores.

4.4.3 Fase y Topografía de la Monocapa de Asc₁₆ como Función del pH de la Subfase y de la Concentración Salina.

Para investigar la dependencia de las monocapas de Asc₁₆ con las condiciones de la subfase, se realizó la isoterma de compresión a diferentes pH_b y condiciones de salinidad a 25 °C. Esto se representa en las figuras 4.7 a y b. Además, se visualizaron estas monocapas por microscopía de ángulo de Brewster (BAM), en la figura 4.8 a, b, c, d.

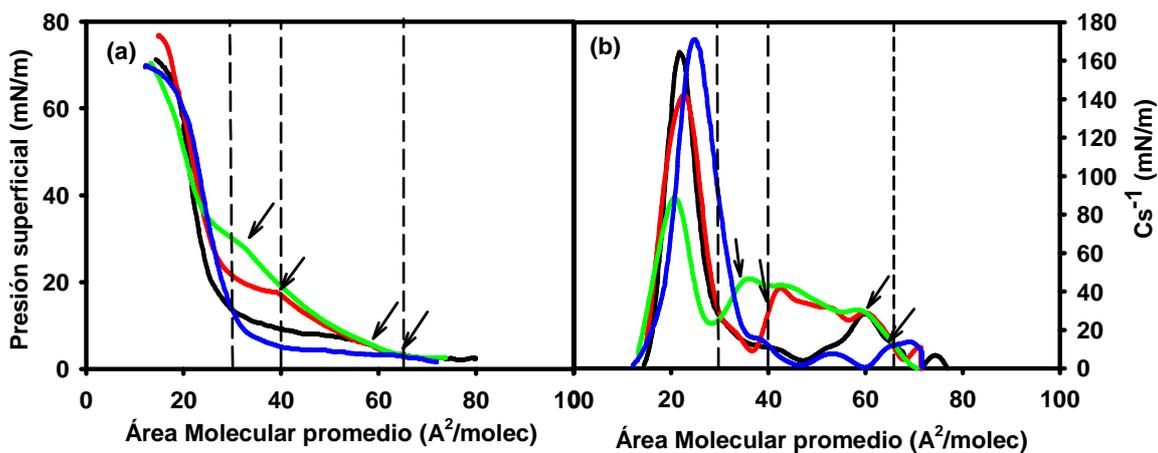


Figura 4.7: a) Isoterma de compresión y b) módulo de compresibilidad de monocapas de Asc_{16} en función de las condiciones de la subfase: solución salina a $pH \sim 3$ (línea azul), agua (negro), solución salina $pH \sim 6$ (rojo), y solución salina a $pH \sim 8$ (verde). Las flechas indican el comienzo de la transición de fase LE-condensada. La figura muestra curvas de representativas de un conjunto de tres experimentos independientes. Las líneas verticales indican la densidad molecular utilizada para el cálculo de la figura 4.6 y la de las imágenes de la figura 4.8 de a-d.

Las figuras 4.7 a y b muestran que las monocapas formadas en una subfase con una solución de alta salinidad a $pH_b \sim 3$, desarrollan características similares a las monocapas formadas utilizando el agua como subfase. En ambas las condiciones de las moléculas de Asc_{16} hacen previsible que se presenten en mayor proporción en la forma neutra (α en el intervalo de 0,01 a 0,03), y por lo tanto con una baja densidad de carga (véase figura 4.6 b).

En la isoterma de compresión de la figura 4.7a, línea color verde, se muestra que para un sistema donde se usa como subfase solución salina a $pH_b \sim 8$, la fase de LE se mantiene estable a alta presión superficial y bajo MMA (~ 30 mN/m y $\sim 30 \text{ \AA}^2 \text{ moléc}^{-1}$ respectivamente). El bajo módulo de compresión de la figura 4.7b a bajas MMA (línea verde) corrobora esta interpretación. Esta estabilidad se corresponde, como era de esperar, con los altos valores de α del Asc_{16} , presentados en la figura 4.6a. Por lo tanto, mayor repulsión molecular implica formación de fases más fluidas.

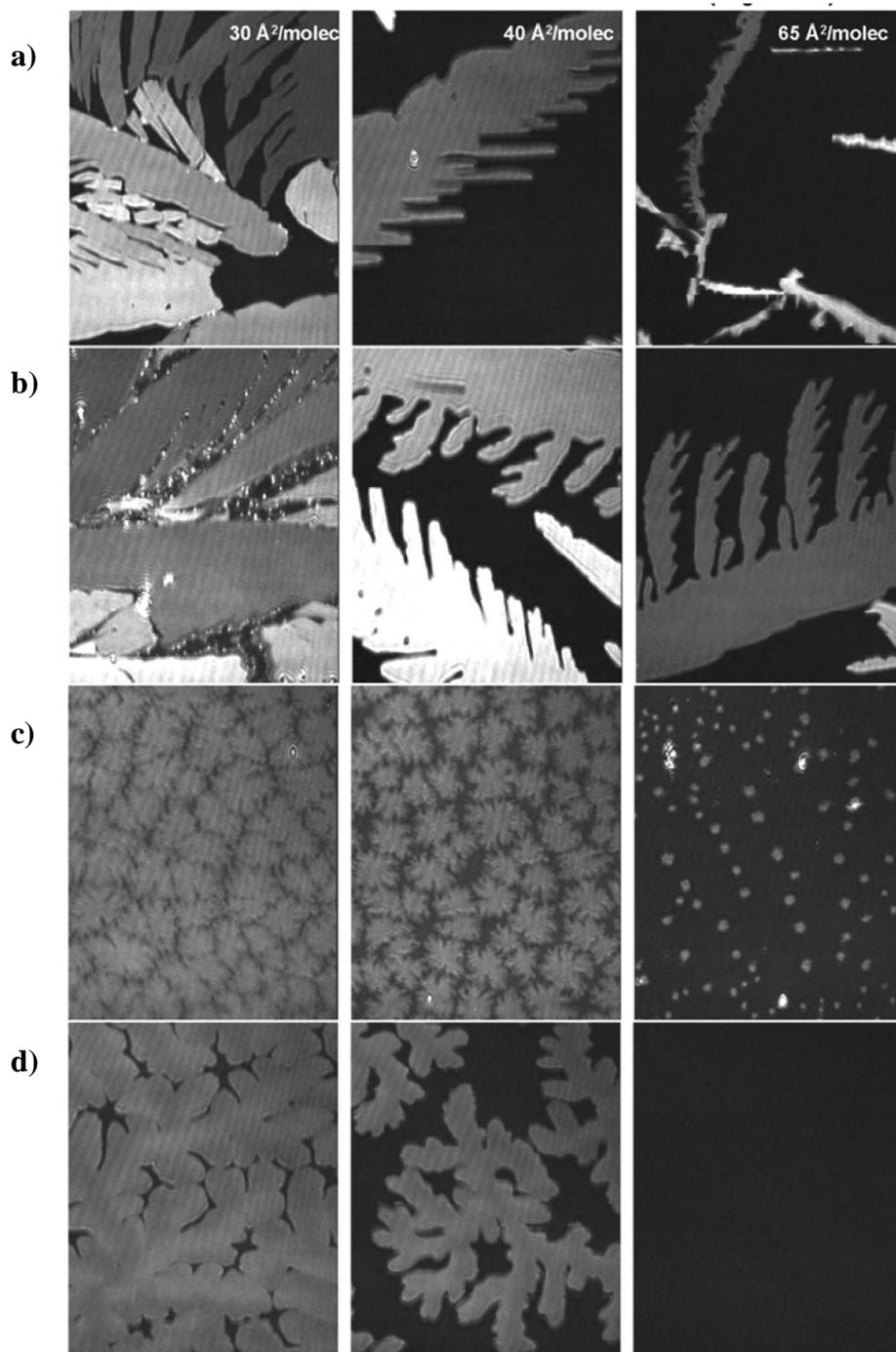


Figura 4.8. Comportamiento superficial y patrón topográfico de monocapas de Asc_{16} en diferentes subfases. Paneles de a-d muestran el patrón topográfico de las monocapas de Asc_{16} por BAM, al MMA indicado, utilizando diferentes superficies: a) agua, b) solución salina a $pH \sim 3$, c) solución salina a $pH \sim 8$ y d) solución salina $pH \sim 6$. Para una mejor visualización de la parte inferior fue seleccionado una variedad de niveles de gris desde 0 hasta 100 (en la escala 0-255 original) con el fin de mantener la relación del nivel gris-espesor de la película. Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes. Tamaño de imagen $370 \times 464 \mu m$.

Las imágenes de BAM de las películas que se ven en las figuras 4.8 a y b, muestran dominios condensados con bordes filosos, sugiriendo una naturaleza cristalina durante la compresión. La cohesión de las moléculas en dominios se ve favorecida en una dirección definida a $39^\circ \pm 2^\circ$ respecto al eje del dominio principal. También se observó en algunos casos el desarrollo de un brazo secundario a $61^\circ \pm 2^\circ$ del eje del dominio principal. Esto indica un crecimiento preferencial hacia un lado de las ramas del cristal. Dominios similares se obtuvieron para las monocapas de amida del ácido N-tetradecil- γ , δ -dihidroxipentanoico (DHBAA) [21] con un ángulo de crecimiento principal en dirección de 30° y uno secundario de $60^\circ \pm 5^\circ$. Vollhardt y colaboradores han demostrado que los ángulos de crecimiento observados en dominios condensados responden a las características de red de la estructura cristalina [22].

Las imágenes de BAM mostradas en la figura 4.8 c y d revelan diferentes reflectividades de los dominios de los alrededores (se observan zonas con diferente brillo). Estos estudios proveen información sobre el ordenamiento molecular de texturas bidimensionales (2D). Cuando la cadena alquílica está orientada paralela al plano incidente de radiación, la luz polarizada es reflectada sin cambio de polarización. Sin embargo, si los dominios se encuentran rotados, el brillo disminuye con el orden de orientación azimutal en una dirección diferente a la del plano incidente [22-24].

Los dominios observados de Asc₁₆ en las figuras 4.8 a y b muestran una reflectividad uniforme, sugiriendo una orientación única de las moléculas que los forman.

Además, se sacaron las microfotografías BAM de este empaquetamiento y se presentan en la figura 4.8c, donde se sigue evidenciando que la fase LC no llega a ser tan cristalina como las que se obtienen cuando se utilizan otras subfases. En esta figura la fase de LC es modelada en forma de dominios más pequeños, con bordes muy ondulados y un nivel uniforme gris, indicando un sistema isotrópico en 2D. Esto indica que la ionización del Asc₁₆ en la superficie implica repulsión intermolecular, que favorece la fase expandida y evita la formación de cristales.

Un comportamiento intermedio se observa en las isothermas y las imágenes de BAM para monocapas de Asc₁₆ en soluciones salinas en $pH_b \sim 6$. Las isothermas de

compresión se presentan en la figura 4.7 a, el módulo de compresión en la 4.7b, (líneas rojas) y las imágenes de BAM en la 4.8d.

Los cálculos predicen una fracción de ionización de $\sim 0,5$ para este sistema y son presentados en la figura 4.6b. Bajo esta condición, la fase LC muestra grandes dominios con bordes menos ondulados (Figura 4.8d).

4.4.4 Cálculo del Potencial Superficial y Momento Dipolar Perpendicular.

Para entender mejor el comportamiento de monocapas Asc₁₆ se realizaron mediciones de potencial superficial (ΔV) en función de la densidad de empaquetamiento.

La figura 4.9a muestra el cambio de ΔV (en mV) con la compresión, medida para monocapas de Asc₁₆ en diferentes condiciones de la subfase. La diferencia de potencial debida a la doble capa eléctrica producida entre la superficie de la película monomolecular y el interior de la subfase (ψ_0) fue calculada para cada condición usando la ecuación 4.4 en función del MMA y representada en la figura 4.9b. Esto permite la estimación del momento dipolar perpendicular (μ_{\perp}) de las moléculas de Asc₁₆ utilizando la ecuación 4.2. Los resultados se grafican en la figura 4.9 c.

El cálculo de ψ_0 presentado en la figura 4.9 b se traduce en valores que aumentan con la secuencia: solución salina $pH_b \sim 3 >$ salina $pH_b \sim 6 >$ salina $pH_b \sim 8 >$ agua.

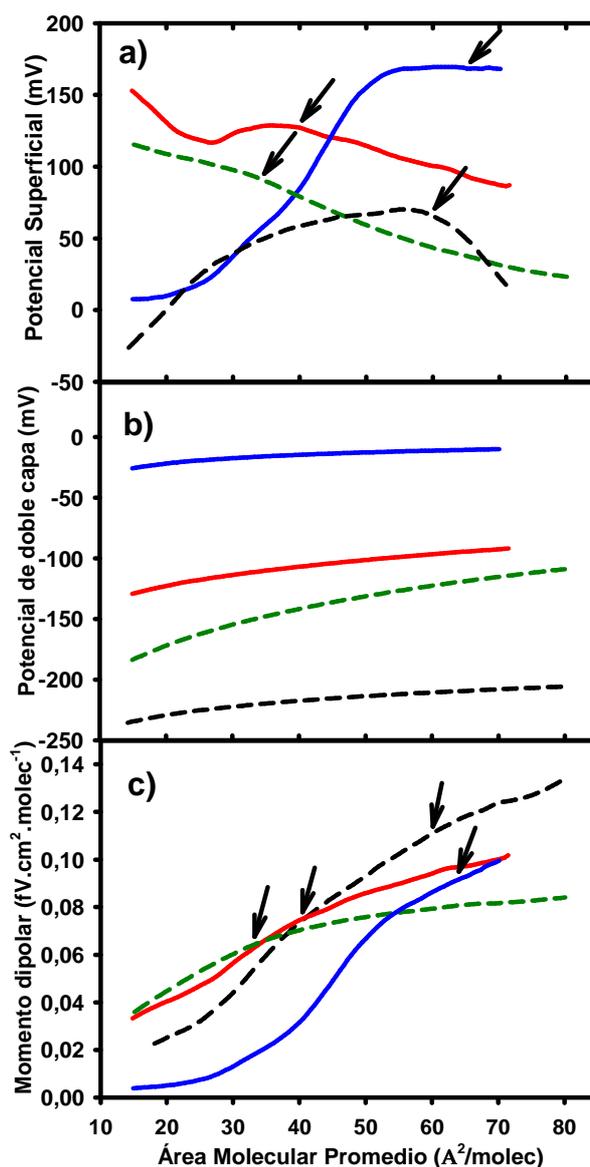


Figura 4.9 Comportamiento del potencial superficial de monocapas de Asc₁₆ en diferentes subfases. a) Potencial superficial, b) potencial calculado de doble capa (ec. 4.4) y c) momento dipolar perpendicular resultante calculado (con la ec. 4.2, véase la sección experimental) de monocapas de Asc₁₆ en función de la composición de la subfase: salina $pH_b = 3$ (línea azul), agua (negro), solución salina $pH_b \sim 6$ (rojo) y la solución salina $pH_b = 8$ (verde). Las flechas indican el comienzo de la transición de fase de LE-LC. El panel (a) muestra el las curvas experimentales representativas de un conjunto de tres experimentos independientes.

Considerando solamente las subfases formadas por soluciones salinas se encontró, como era de esperar y se presenta en la referencia [17], que cuanto mayor sea la fracción de disociación (α) del Asc₁₆ en la superficie, y por lo tanto, cuando existe una más alta densidad de carga negativa, mayor será el valor negativo de ψ_0 . Esto se muestra

en la figura 4.9b, donde se observan mayores potenciales negativos de doble capa (ψ_0) cuanto más ionizada se encuentre la molécula, o sea a mayores pH_b . Esto mismo se puede observar en las figuras 4.6 a y b, donde se grafican pH_s y α en función de pH_b respectivamente, pudiendo arribar a conclusiones similares.

En la figura 4.6a, a menor fuerza iónica de la subfase (1×10^{-3} mM), se produce una disminución de los valores de la curva de pH_s (círculos abiertos) cuando se los grafica en función de pH_b . Por lo tanto, si se introducen los valores respectivos de pH_s y pH_b en la ecuación 4.3 se obtienen menores valores de ψ_0 .

En la figura 4.6b, se observa una menor ionización con menores fuerzas iónicas (círculos abiertos). O sea, para un mismo valor de pH_b el valor de α va a ser menor cuanto menor sea la fuerza iónica y esta diferencia se hace más importante a medida que se aumenta el valor de pH_b .

Cuando consideramos monocapas de Asc_{16} sobre una subfase de agua, la fracción de disociación calculada, es sólo el 0,01 a una MMA de $40 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. En un primer momento, bajo estas condiciones, se consideró a la monocapa como esencialmente "neutra". Sin embargo, si se tiene en cuenta el valor de ψ_0 en los experimentos representados en la figura 4.9b, la monocapa se comportaría como una superficie cargada. Por lo tanto, cuando hay una concentración de iones de 1×10^{-6} M (concentración de protones en agua pura a $pH_b \sim 6$) solamente se contrarrestarían el potencial electrostático inducido por el 1% de las moléculas de Asc_{16} cargadas. Entonces, ψ_0 alcanza valores más negativos que los hallados en otras de las condiciones presentados en la figura 4.9b.

Dado que ΔV depende tanto de la densidad de empaquetamiento como de la orientación de las moléculas en la monocapa, se espera un aumento en los valores ΔV durante la compresión de la fase LE como consecuencia de un progresivo enderezamiento vertical. Este efecto se observa en la figura 4.9a para las monocapas cargadas (en solución salina de $pH_b \sim 6$ y a 8) a baja densidad de empaquetamiento. Cuando las monocapas se encuentran en un estado LC, o sea a una baja MMA, los valores ΔV alcanzan los 100-150 mV. La diferencia en valores de ΔV entre las dos fases de las monocapas cargadas ($\Delta V_{LC} - \Delta V_{LE}$) puede dar cuenta de repulsiones intradominio las cuales los conducen a formar dominios en forma de "flores" [25] como las observadas en las figuras 4.8 c-d tomadas del BAM. El análisis de la figura. 4.9c

muestra un descenso monótono continuo del μ_{\perp} para las monocapas cargadas, lo que puede indicar la compensación de los dipolos moleculares internos y/o cambios en la hidratación/interacción iónica, como consecuencia de la compresión. Las "monocapas neutras", tanto en agua como en solución salina $pH_b \sim 3$ muestran una reorganización más pronunciada del ΔV y del μ_{\perp} , yendo desde valores más altos hacia menores valores que coinciden con la región de transición de fase. Como consecuencia, el μ_{\perp} general resultante cae cerca cero cuando la monocapa se encuentra en estado cristalino. Esto se produce a valores bajos de MMA, sugiriendo la compensación/reorientación de los dipolos fundamentales en la molécula, o cambios de hidratación de la cabeza polar o bien una combinación de ambos efectos.

4.4.5 Adsorción de Asc_{16} en Interfases con y sin Fosfolípidos.

Con el fin de explorar la posible interacción de Asc_{16} cuando es añadido a biomembranas, tanto en medio acuoso como en solución salina, se ha realizado un estudio de la adsorción de Asc_{16} en interfaces desnudas y con monocapas de fosfolípidos.

En las figuras 4.10 y 4.11 se presentan el comportamiento de adsorción del Asc_{16} en subfases desnudas (sin fosfolípidos). En la primera, se observa la variación de presión superficial tanto en agua (línea gris) como en solución salina (línea negra) a área constante. Los valores aquí obtenidos pueden ser comparados con estados LE de las monocapas de Asc_{16} sobre una subfase salina y agua de la figura 4.7.

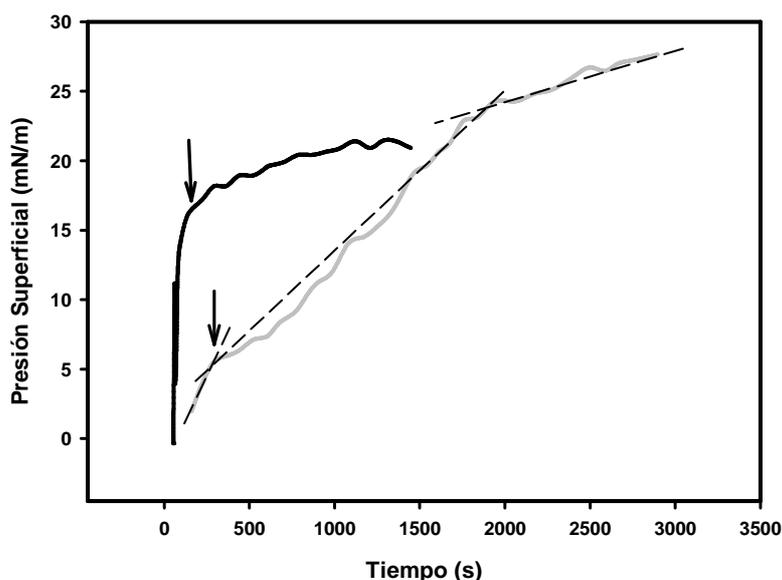


Figura 4.10. Adsorción de Asc₁₆ sobre superficies desnudas (sin fosfolípidos). La línea negra representan variación de la presión superficial en función del tiempo durante la adsorción de Asc₁₆ desde la subfase acuosa con NaCl 145 mM (pH ~ 6) y la línea gris con agua (pH ~ 6) como subfase. Las figuras muestran curvas representativas que fueron realizadas a partir de un conjunto de dos experimentos independientes. Las flechas indican las transiciones de fase de LE a LC (líquido condensado).

La adsorción a la interfase aire /agua (sin fosfolípidos) es un proceso más lento, bifásico, con un tiempo (t) ~ 290 s para la primer meseta y ~1800 s para la segunda; en comparación con la adsorción del tensioactivo a la superficie de una solución salina en las mismas condiciones (t ~ 140 s) (Figura 4.10). Para este último caso, la adsorción del surfactante aumenta la presión superficial hasta ~ 17 mN/m, que es la máxima presión superficial en la que la monocapa Asc₁₆ es estable en estado de fase LE durante la compresión, a la temperatura del experimento (25 °C). Este valor debe ser comparado con el de la figura 4.7a de este capítulo.

Estas curvas de adsorción indican que existe una barrera cinética más alta para que se forme la fase LC cuando se usa agua como subfase.

En ambos medios (agua y solución salina) el pH de la subfase se encuentra alrededor de 6, por lo tanto, la molécula se encuentra ionizada. Cuando el Asc₁₆ comienza a formar la monocapa las cargas se pantallean más efectivamente en la subfase con mayor fuerza iónica (subfase salina) y se llega así a una más alta presión en menor tiempo. Sin embargo, a medida que las moléculas se van acomodando se llega,

en agua, a una presión algo superior, lo que estaría indicando la aparición de un estado más cristalino. Sin embargo, esto se produce en un tiempo mayor.

Cuando el Asc₁₆ se absorbe a una superficie sin fosfolípidos/agua se observa una curva lenta tipo bifásica, esto significa que la forma de la curva tiene un quiebre con dos pendientes diferentes antes de llegar a la fase más cristalina (figura 4.10). La primera meseta se alcanza a ~ 7mN/m y coincide con la presión superficial más alta en la que la monocapa es estable en el estado de fase LE durante la compresión (figura 4.7a). La adición de más moléculas a la interfase debería inducir la nucleación y el crecimiento de la fase cristalina. Este proceso es más lento que con solución salina de subfase y se manifiesta con una menor pendiente de la curva de adsorción.

En la figura 4.11 se observa como se modifica el potencial superficial a medida que aumenta la presencia de moléculas de Asc₁₆ en la interfase. Aquí se ve que para ambos casos (solución salina, línea negra y agua, línea gris), la modificación del potencial es casi inmediata. Esto se debe a la presencia de dipolos y la orientación de las moléculas de agua de la subfase.

El ΔV alcanzado, luego de la estabilización de la monocapa para ambas subfases, de ~ 85 mV para el agua y 130 mV en solución salina, se acerca a los valores observados en la fase LE formada por compresión isotérmica (~ 70 y 130 mV) representado en la figura 4.9 a. Esto está en concordancia con que siempre en estas condiciones las monocapas adsorbidas se encuentran en estado LE.

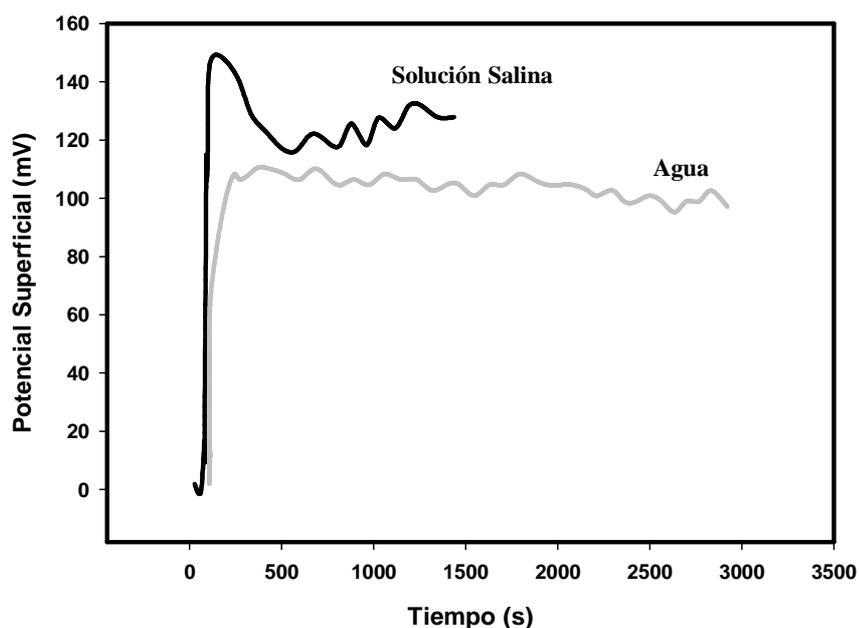


Figura 4.11. Adsorción de Asc₁₆ sobre superficies sin fosfolípidos. La línea negra y la línea gris representan la variación del potencial superficial durante la adsorción de Asc₁₆ en una subfase acuosa con NaCl 145 mM y en agua, respectivamente en función del tiempo. Las figuras muestran curvas representativas que fueron realizadas a partir de un conjunto de dos experimentos independientes.

Se realizaron adsorciones Asc₁₆ en monocapas con fosfolípidos con el fin de describir el comportamiento de esta membrana compuesta. Para esto se utilizó una fosfatidilcolina zwitteriónica (DMPC) [26]. A la temperatura experimental (25 °C), este lípido presenta la propiedad de organizarse en una fase LE con cualquier presión superficial hasta llegar al colapso [27]. Esto quiere decir que por más que se reduzca el área entre las barreras los dominios no llegan a estados cristalinos bidimensionales.

Cuando el Asc₁₆ se inyecta en la subfase debajo de una monocapa de fosfolípidos a 20 mN/m, se produce un aumento de la presión superficial como se muestra en la figura 4.12 (de solución salina). Éste efecto es indicativo de una absorción rápida de moléculas Asc₁₆ a la interfase. El Asc₁₆ se puede adsorber hasta presiones superficiales más altas que las observadas para superficies desnudas presentadas en la figura 4.10.

En condiciones de alta salinidad (NaCl 145 mM) se alcanza rápidamente valores de presión superficial ~ 40 mN/m (figura 4.12).

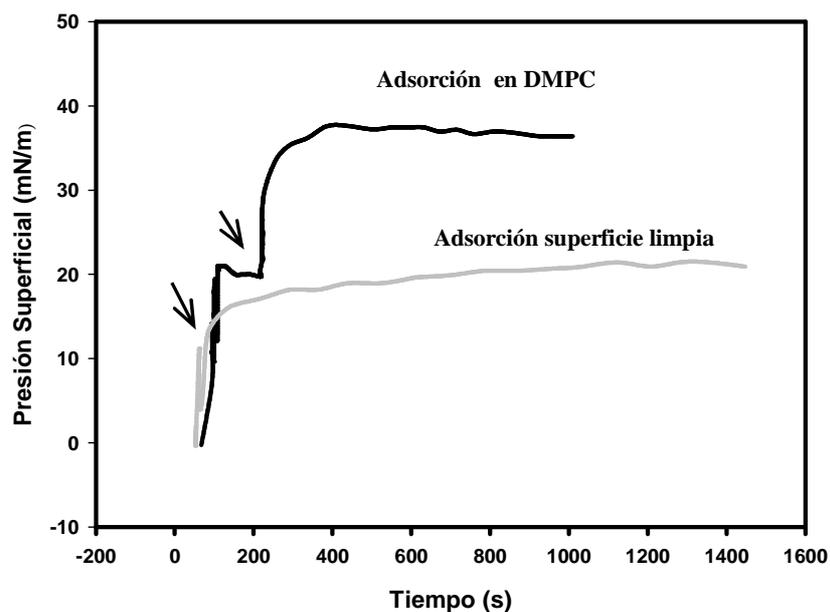


Figura 4.12: Adsorción de Asc₁₆ sobre superficies sin fosfolípidos y con fosfolípidos usando como subfase NaCl 145 mM. La línea negra representa la adsorción en una monocapa de DMPC y la línea gris en una superficie desnuda. Las figuras muestran curvas representativas que fueron realizadas a partir de un conjunto de dos experimentos independientes. Las flechas indican los puntos de inyección del Asc₁₆.

En conjunto, estos fenómenos pueden ser explicados por la capacidad de los fosfolípidos para mantener una fase LE incluso a altas presiones superficiales, permitiendo una incorporación facilitada de moléculas de Asc₁₆ a la monocapa LE.

Luego de la evaluación de la adsorción del surfactante en estudio en monocapas con fosfolípidos, se puede concluir que la presencia de los mismos en estado líquido expandido facilita la formación de una monocapa estable junto con el Asc₁₆ en la subfase ensayada a la temperatura de estudio.

4.5 Conclusiones del capítulo

El Asc₁₆ se auto-organiza en monocapas de Langmuir con propiedades electrostáticas altamente dependientes del pH y de las condiciones de salinidad de la subfase.

Se detectaron teórica y experimentalmente los cambios morfológicos y termodinámicos inducidos por la alteración de la densidad de carga en las monocapas de Asc₁₆ por disociación del H ácido del C₃-OH del anillo ascórbico.

Se encontró un valor de MMA medido que es similar a la sección teórica de una cadena hidrocarbonada ~ 21 Å, con lo que se demuestra un alto empaquetamiento de la película de Asc₁₆.

Se observó un bajo momento dipolar perpendicular a partir de las mediciones de potencial superficial para la fase cristalina, comparado con la fase líquida condensada, lo cual podría explicar las características de los dominios.

Mediante el uso de BAM se pudo observar la formación de los diferentes dominios en función del tipo de subfase.

En condiciones de baja disociación (pH ~ 3) se observó un orden uniforme de las moléculas. Además, se observa dentro de los dominios diferentes tonos de gris dados por diferencias de reflectividad en el BAM respecto a sus vecinos, esto sugiere una diferente inclinación de las moléculas. Estas propiedades y el crecimiento periférico de los dominios en ángulos característicos sugieren una naturaleza cristalina de los dominios condensados en las mismas condiciones de disociación.

Por otra parte, probablemente es inducida la formación de dominios isotrópicos en forma de flores por la alta repulsión interna durante la compresión de la monocapa cargada.

Se realizó un estudio de interacción entre Asc₁₆ en interfases con fosfolípidos. Las monocapas de fosfolípidos proveen una matriz favorable de adsorción-inserción de las moléculas de Asc₁₆. Esto se debe probablemente a que los fosfolípidos pueden conferirle una característica de líquido expandido a la monocapa. Se demostró, que con DMPC se forman monocapas estables cuando se adsorbe el surfactante desde la subfase. Este hallazgo sugiere que existe una penetración favorable del Asc₁₆ en biomembranas expandidas.

Con una clara comprensión del comportamiento del Asc₁₆ en monocapas se desarrollaron estudios de adsorción sobre monocapas de lípidos para poder entender su interacción y así poder llegar a formular posteriormente liposomas que involucren un sistema lipídico y el surfactante en estudio. De esta manera, se puede llegar a formular liposomas con las características antioxidantes del Asc₁₆ como se muestra en el capítulo 6.

4.6 Referencias del capítulo

- [1]- P. Suttiprasit, V. Krisdhasima, J. McGuire. *Journal of Colloid and Interface Science*. 154 (1992) 316.
- [2]- J. Sanchez-Gonzalez, M. Cabrerizo-Vilchez, M. Galvez-Ruiz, *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces*. 21 (1–3) (2001) 19.
- [3]- X. Wang, Y. Zhang, J. Wu, M. Wang, G. Cui, J. Li, G. Brezesinski, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 23 (4) (2002) 339.
- [4]- P. Dynarowicz, A. Dhanabalan, O. N. Oliveira Jr. *Advances in Colloid and Interface Science*. 91 (2001) 221.
- [5]- G. Gaines. *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*. Interscience Publishers. (1966). New York.
- [6]- W. Joung, Y. Han, S. Oh, S. Yi. *Synthetic Metals*. 117 (2001) 181.
- [7]- M. Campanhã, E. Mamizuka, A. Carmona-Ribeiro. *The Journal of Lipid Research*. 40 (1999) 1495.
- [8]- M. Yorek. *Phospholipids Handbook*. Ed. G. Cevc. (1993) 745. New York.
- [9]- J. Seddon, G. Cevc. *Phospholipids Handbook*. Ed. G. Cevc. (1993) 403. New York.
- [10]- R. Rowe, P. Sheskey, M. Quinn (Eds.). *Handbook of Pharmaceuticals Excipients*, 6th edition. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association (2009) 500. London-Chicago.
- [11]- W. Sułkowski, D. Pentak, K. Nowak, A. Sułkowska. *Journal of Molecular Structure* 792 (2006) 257.
- [12]- I. Bianco, B. Maggio. *Colloids Surfaces*. 40 (1989) 249.
- [13]- E. Brown, H. Brockman. *Methods in Molecular Biology*. 398 (2007) 41.
- [14]- M. Fanani, B. Maggio. *Journal of Physical Chemistry* 115 (2011) 41.
- [15]- N. Wilke, B. Maggio. *Journal of Physical Chemistry B*. 113 (2009) 12844.
- [16]- F. Vega Mercado, B. Maggio, N. Wilke, *Chemistry and Physics of Lipids*. 164 (2011) 386.
- [17]- J. Tocanne, J. Teissie. *Biochemistry and Biophysics Acta*. 1031 (1990) 111.
- [18]- T. Davies, E. Rideal. *Interfacial Phenomena*. Academic Press. (1963). New York.
- [19]- L. Fanani, B. Maggio. *Chemistry and Physics of Lipids*. 163 (2010) 594.
- [20]- S. Palma, R. Manzo, P. Lo Nostro, D. Allemandi. *International Journal of Pharmaceutics*. 345 (2007) 26.

- [21]- D. Vollhardt, V. Melzer. *Journal of Physical Chemistry B*. 101 (1997) 3370.
- [22]- D Vollhardt, V. Fainerman. *Advances in Colloid Interface Science*. 154 (2010) 1.
- [23]- G. Overbeck, D. Honig, L. Wolthaus, M. Gnade, D. Mobius. *Thin Solid Films*. 242 (2011) 26.
- [24]- A. Angelova, D. Vollhardt, R. Ionov. *Journal of Physical Chemistry*. 100 (1996) 10710.
- [25]- H. McConnell. *Annual Review of Physical Chemistry*. 42 (1991) 171.
- [26]- J. Tocanne, J. Teissie. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1031 (1990) 111.
- [27]- P. Ke, C. Naumann. *Langmuir*. 17 (2001) 3727.

Capítulo 5

Comportamiento de Fase de Moléculas Terapéuticamente Activas con Propiedades de Agregación.

5.1 Introducción

En el capítulo 1 se introdujo a las formulaciones farmacéuticas. Allí se mencionó que para llevarlas a cabo son necesarios, además de el o los principios activos y la tecnología, los excipientes. Estos compuestos eran considerados inertes en el pasado pero ahora se sabe que no lo son. Uno de los principales problemas que tiene la administración de medicamentos son los efectos no deseados producidos por los principios activos. Sin embargo, existen algunos excipientes que también los producen y en muchos casos, son muy difíciles de reemplazar, como sucede con el Cremophor. Este compuesto es muy utilizado para vehiculizar principios activos muy poco solubles en agua, como el antitumoral paclitaxel, generando innumerables problemas que van desde la agregación de eritrocitos hasta reacciones anafilácticas [1,2].

Otros efectos adversos también importantes se presentan, en formulaciones farmacéuticas que utilizan, como cosolventes a dimetilsulfóxido y etanol, como surfactantes al tween 20 y al tween 80 y como medio oleoso a emulphor [3].

El tween 80 es el surfactante utilizado en las formulaciones de Amiodarona. Este compuesto genera efectos adversos de consideración como la hipotensión, entre otros [4,5] que se detallaran más adelante en este capítulo.

La amiodarona (AMI) en su formulación inyectable sigue siendo muy utilizada en el tratamiento de enfermedades cardíacas severas. Como se ha dicho, para su vehiculización son necesarios excipientes que producen efectos adversos, por lo que una formulación sin estos sería deseable. También se podrían plantear formulaciones con mínima cantidad de estos o incluso con otros menos nocivos. Por esto, se hace importante el estudio de soluciones acuosas de AMI en soluciones diluidas (de uso⁴).

Existen datos confusos en la bibliografía [6,8] donde se presenta que las soluciones, incluso concentradas de AMI, permanecen estables cuando se las enfría luego de que se las haya calentado por encima de la temperatura de agregación. Como se mencionó en el capítulo 2, esta es una temperatura que es propia de cada surfactante.

Las concentraciones de uso de la AMI son mucho más bajas que las de almacenamiento. Una evaluación del comportamiento de esta droga en solución diluida esclarecería cuál es el mecanismo de agregación de esta droga e incluso por qué es necesario en soluciones diluidas el uso de surfactantes si en la bibliografía se informa de la presencia de soluciones límpidas y de una *cmc* a temperatura ambiente [8].

En este capítulo se presenta el estudio de las fases de AMI en solución acuosa sin la adición de surfactantes u otro tipo de especies a fin de dilucidar entre las informaciones contradictorias de literatura.

5.1.1 Consideraciones Generales de la Amiodarona (AMI)

La Amiodarona (AMI) (2-butilbenzofuran-3-yl 4-(2-dietilaminoetoxi)-(3,5-diiodofenil cetona), figura 5.1, (M.M: 645,3) es una droga antiarrítmica de clase III. Es

⁴ Las dosis de uso pueden ir desde una dosis de carga, 150 mg de AMI en 100 ml de solución (1,5 mg/ml) en 10 minutos; hasta una dosis de mantenimiento de 300 mg a 1200 mg de AMI en 500 ml de solución (0,6 a 2,4 mg/ml) en 24 hs.

usada en el control de las arritmias ventriculares y supraventriculares, incluyendo las arritmias asociadas al síndrome de Wolff–Parkinson–White. También es indicada para la prevención de arritmias en pacientes con infarto de miocardio o falla cardiaca. Esta droga habitualmente es administrada mediante infusión intravenosa y es necesario el monitoreo de la función cardiaca así como la disponibilidad de equipo de reanimación.

La AMI es una molécula que se comporta como tensioactivo catiónico cuando se encuentra a pH ácido o neutro. Presenta una porción hidrofóbica representada por anillos aromáticos y una porción hidrofílica formada por el grupo amina terciaria [6]. Tiene un pK_a de $8,73 \pm 0,07$ [6].

Se ha informado en la bibliografía [7] que la solubilidad acuosa de la AMI se encuentra entre 0,2 y 0,5 mg/ml y pertenece a la clasificación biofarmacéutica tipo II, o sea, una droga en la cual la absorción en el tracto gastrointestinal está limitada por su solubilidad.

Los efectos adversos de la AMI son frecuentes y dosis dependientes [9]. Estos efectos pueden clasificarse de la siguiente forma: efectos que son propios de la AMI y los que dependen del tipo de formulación, como los que aparecen cuando se aplican formulaciones inyectables. Dentro de los primeros, podemos citar a las fibrosis pulmonares, pancreáticas y hepáticas, disfunción tiroidea y fotosensibilidad. Los otros efectos, como la hipotensión, están relacionados, por ejemplo, con los cosolventes y surfactantes que se utilizan en las formulaciones inyectables. Entre estos se encuentran: como surfactante al Tween 80 y como cosolvente al alcohol bencílico.

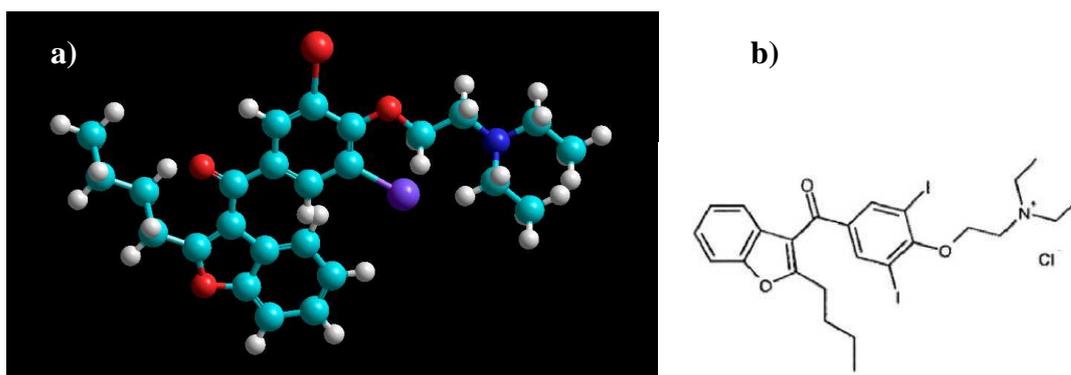


Figura 5.1: a) Representación de la molécula de AMI en 3D realizada con el programa Hiperchem 8 professional. En Celeste: C, blanco: H, rojo: O, azul: N, violeta: I. b) Representación de la molécula de AMI en 2D.

Existen en el mercado, según nuestra farmacopea (FNA: Farmacopea Nacional Argentina) [10] y la inglesa (BP: British Pharmacopea) [11], formulaciones de AMI para uso por vía oral, comprimidos y para uso inyectable intravenoso, ampollas.

Debido a la baja solubilidad acuosa de AMI, las formulaciones inyectables requieren la adición de surfactantes y co-solventes. Estos excipientes, que hacen posible la solubilización de la AMI en soluciones acuosas, pueden además contribuir a la aparición de otro tipo de efectos adversos tales como inotropía negativa e hipotensión [4,5], además de los problemas relacionados con la dosificación en infusión parenteral [9,12-13].

Las formulaciones comerciales de clorhidrato de AMI en general presentan una forma de solubilización de la droga en base a la utilización de cosolventes. Esta técnica es muy utilizada en tecnología farmacéutica y puede ser consultada de la bibliografía de referencia de farmacia [14]. Esta formulación está compuestas por AMI (50 mg/ml), polisorbato 80 (Tween 80, 100 mg/ml) y alcohol bencílico (20 mg/ml), para cada ampolla de 3 ml. Otras estrategias de solubilización informadas en la literatura proponen la formulación de una sal tipo clorhidrato de AMI en medio acuoso a través de la dispersión de 0,1 M (mol/L) en solución reguladora (“buffer”) acetato de pH = 3,8 [5, 15-17].

Otras estrategias para vehicular esta droga no tienen que ver con hacerla más soluble sino con que pueda formar parte de una nanopartícula, no necesariamente hidrofílica, y de esta manera pueda ser suspendida en la solución de uso. En este sentido, se pueden encontrar además en bibliografía otras nuevas formas de vehicular esta droga. Un ejemplo en este sentido, es la formación de nanopartículas lipídicas [18]. Aquí el desarrollo de la formulación es mucho más complejo, con gran número de excipientes, por lo que no se estarían evitando algunos efectos adversos derivados del uso de estos últimos.

En las formulaciones comerciales, el uso de surfactantes no solo trae consigo efectos no deseados para el paciente sino que también su presencia disminuye el tamaño de gota (“*drop size*”).

Los materiales biomédicos que se utilizan en la administración parenteral comúnmente poseen un regulador que permite calcular la dosis de la droga administrada en función a la cantidad de gotas que pasan por el por segundo, y según el fabricante se especifican cuantas gotas van por cada mililitro de solución. Por esto una disminución del tamaño de la gota genera un flujo más lento y esto se acentúa con el aumento de la concentración de AMI. Esto puede llevar a un error de hasta el 30% de la concentración profundida en 24 horas en las soluciones más concentradas. En consecuencia, no se estaría llevando a cabo el tratamiento correcto, con la necesidad de reajuste del goteo en forma continua [19,20].

Como se mencionó anteriormente, las ampollas contienen 50 mg/ml de principio activo, sin embargo, esta no es la concentración de uso. Para su aplicación, la AMI se diluye en 500 ml de solución de dextrosa al 5% [9]. Dado que una solución de uso diario estándar para mantenimiento en infusión continua va desde 300 hasta 1200 mg AMI en 500 ml de solución de dextrosa al 5% durante 24 horas [9], esto daría concentraciones entre 0,6 a 2,4 mg/ml. **La utilización de estas concentraciones de trabajo es la razón por la cual se ve justificado el estudio a bajas concentraciones.**

5.2 Objetivo

El objetivo de las investigaciones que se detallan en este capítulo es determinar las propiedades coloidales del Clorhidrato de Amiodarona en agua en concentraciones cercanas a las de uso en forma parenteral. El sistema aquí estudiado no contiene surfactantes ni cosolventes.

5.3 Experimental

5.3.1. Materiales

Se empleó clorhidrato de amiodarona de grado farmacéutico marca Parafarm (Argentina) sin posterior purificación y el agua tridestilada en todos los experimentos fue marca Allchemistry (Argentina).

5.3.2 Métodos

5.3.2.1 Determinación de cmc por Conductividad

Para la realización de las medidas de la conductividad específica se utilizó una celda de inmersión y un conductímetro automático, OAKTON serie 510 (Singapur). El conductímetro fue calibrado con las soluciones de KCl 0,1 M.

La conductividad específica (κ) se representa como una función de la concentración. El cambio en la pendiente de la curva (punto de quiebre) fue indicativo de un cambio notable en la agregación del sistema.

Para determinar las concentraciones críticas en las cuales tienen lugar ciertas transiciones estructurales, se estudió una mezcla de amiodarona sólida y agua concentraciones entre 2,5 y 3 mg/ml. Para la solubilización del surfactante la mezcla fue calentada por encima de 80 °C, dejando que la solución así obtenida alcance las temperaturas de experimentación. La solución concentrada se tituló con agua a cada una de estas temperaturas, mientras se producía la medición de la conductividad específica. Las mediciones se repitieron 2 veces de forma independiente.

5.3.2.2 Determinación de la Solubilidad por Conductividad

Para la realización de las medidas de la conductividad específica se utilizó una celda de inmersión y un conductímetro automático, OAKTON serie 510 (Singapur). El conductímetro fue calibrado con las soluciones de KCl 0,1 M.

Para determinar la solubilidad de la AMI a diferentes temperaturas, se suspendieron en agua cantidades de la droga en forma creciente (0,05; 0,1; 0,2; 1 y 1,8 mg/ml). Dicha suspensión fue calentada lentamente con agitación continua en un baño

de agua termostatzado. Cuando se alcanzó la temperatura seleccionada, se realizó la medición después de diez minutos de espera para garantizar que el sistema se encontrara en equilibrio. La conductividad específica fue medida y graficada en función de la temperatura y el punto de quiebre (cambio en la pendiente de la curva) se asumió como la temperatura en la cual la amiodarona presentaba la máxima solubilidad. Corroborado esta hipótesis, se observó una solución transparente y homogénea en este punto. Las mediciones se repitieron dos veces.

5.3.2.3 Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

Las fotografías TEM se realizaron según la técnica de tinción negativa con acetato de uranilo utilizando un microscopio electrónico Jeol 100 CX II 100 kV (Tokio, Japón).

La microscopía de transmisión electrónica se basa en un haz de electrones que manejado a través de lentes electromagnéticas se proyecta sobre una muestra muy delgada situada en una columna de alto vacío. Debido a que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas.

Generalmente las muestras orgánicas carecen de contraste suficiente para poder ser visualizadas, y son atravesadas por los electrones con facilidad. Por este motivo es necesario realizar una serie de tinciones con soluciones de metales pesados. Las muestras en suspensión (micropartículas, nanopartículas, virus, etc.) pueden estudiarse fácilmente aumentando el contraste mediante tinción negativa. Mediante esta tinción se recubre el entorno de la muestra donde se impide el paso de los electrones. Como resultado se obtienen imágenes con un fondo oscuro adecuado sobre el que queda contrastada la estructura. Las soluciones de contraste más utilizadas son acetato de uranilo (1 %) o ácido fosfotúngstico al 1-2 % [22,23].

Aquí a soluciones de concentraciones apropiadas se las trató con acetato de uranilo según la técnica de tinción negativa para agregados dada en literatura [24,25].

5.3.2.4 Determinación del Número de Agregación

Los experimentos de Fluorescencia en estado estacionario fueron llevados a cabo con un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301 PC (Kyoto, Japan), a 10 nm en una celda rectangular de sílice puesta en una cubeta bajo agitación mantenida a 30 °C. Las ranuras de las bandas excitación y de emisión fueron fijadas en 5 y 1,5 nm, respectivamente y el tipo seleccionado de exploración fijado a 240 nm /min.

Se utilizó pireno como sonda fluorescente. Fue elegido cloruro de hexadecilpiridinio ($C_{16}PyCl$) como extinguidor o apagador (“*quencher*”) (Q) estático. La longitud de onda (λ) de excitación se seleccionó a 335 nm, mientras que los espectros de emisión se analizaron desde una λ de 350 a 450 nm. El primer y tercer pico vibracional del pireno aparecen a 373 nm y 385 nm, respectivamente. El par pireno/ $C_{16}PyCl$ asegura que el tiempo de residencia del Q en la micela sea mucho mayor que la vida media de fluorescencia de la sonda. Las soluciones fueron preparadas siguiendo el procedimiento de Infelta y Grätzel [26]. Se prepararon dos soluciones: una de pireno y AMI y otra con Q y AMI. Agitando se fue titulando una con la otra y se registraron las medidas. Así, de la curva de intensidad de emisión en función de la λ se obtienen los máximos del pico 1. Luego se grafican el logaritmo natural (\ln) de la intensidad máxima de pico 1 en función de la concentración de Q ($[Q]$), y de la pendiente se obtiene el número de agregación (n).

Soluciones de AMI fueron calentadas a 80 °C y enfriadas. Luego, se mezclaron con $C_{16}PyCl$ y con pireno. La concentración de pireno se mantuvo constante en alrededor de 1×10^{-6} M y la concentración del extinguidor ($C_{16}PyCl$) fue variada, dependiendo de la fracción molar del sistema mixto, desde 0 a 20×10^{-5} M. Estos valores dan relaciones de $[pireno] / [micelas\ mixtas]$ y $[Q] / [micelas\ mixtas]$ menores de 0,01 y 0,9; respectivamente, asegurando así una distribución de Poisson [23,27]. Estas relaciones están enmarcadas en la siguiente ecuación:

$$\ln I = \ln I_0 - [Q]/[micelas] = \ln I_0 - N[Q]/(C_T - CMC)$$

donde I es la intensidad de fluorescencia y C_T la concentración total de AMI. Entonces graficando $\ln I$ vs $[Q]$ se puede obtener el número de agregación de la pendiente de la relación lineal entre estas dos variables. Utilizamos el pico vibracional del pireno ($I_{\max(I)}$, $\lambda = 373$ nm). Los experimentos se realizaron a dos veces la concentración crítica para todas las muestras a 30 °C.

5.3.2.5 Medidas de pH

Las determinaciones de pH se realizaron con un milivoltímetro y el pH-metro CCT-CONICET-BB con un electrodo de vidrio Broade y James. Se utilizaron tampones comerciales con pH = 7,0 y 4,0 para la calibración.

5.3.2.6 *Electrodo Selectivo de Ión Cloruro.*

La actividad de los iones cloruro libres o no incluidos en los agregados fue determinada a diferentes temperaturas (60, 70, 75, 80 y 85 °C) con un electrodo Orion selectivo de Cl⁻ contra uno de calomel saturado, usando un milivoltímetro CCT-CONICET-BB (Bahía Blanca, Argentina). Durante la titulación de una solución concentrada de AMI en agua se fue midiendo potencial (65 mg de AMI en 25ml de agua, previamente calentados por encima de 80 °C para disolver el surfactante, para luego ser mantenida esta solución a la temperatura de trabajo mediante un baño termostatzado).

Para obtener la concentración de iones Cl⁻ libres (no agregados) se trataron los datos por técnicas convencionales [28] por encima de la concentración de agregación. El grado de ionización (o más estrictamente, la fracción de iones de cloruro no agregados) se obtuvo mediante la fórmula:

$$\alpha = 1 - [\text{Cl}^-]_{\text{agg}}/[\text{surfactante}]_{\text{agg}}$$

donde $[\text{Cl}^-]_{\text{agg}} = C_T - [\text{Cl}^-]_{\text{libre}}$, es la concentración de iones Cl⁻ unidos a los agregados y $[\text{surfactante}]_{\text{agg}} = C_T - cmc$, la de los iones del surfactante agregados (en el caso que $T < T_k$, la *cmc* es la concentración de la transición y no de la formación de micelas).

5.3.2.7 *Viscosidad*

La AMI se disolvió en agua a 80 °C con el objetivo de obtener una solución madre (6,22 mg/ml), la cual fue diluida para obtener soluciones de diferentes concentraciones. Estas diluciones fueron mantenidas a 40, 60 o 80 °C y la viscosidad se midió con un viscosímetro de Ostwald capilar calibrado con agua. En este instrumento se puede determinar la viscosidad de las soluciones midiendo el tiempo necesario para el cual un volumen fijo de fluido atraviesa un tubo capilar aforado [29]. Las mediciones se repitieron dos veces en corridas independientes.

5.3.2.8 *Microscopía Óptica de Luz Polarizada con Platina Calefaccionada (MOP)*

La microscopia óptica se realizó con un microscopio Nikon Eclipse E-200 POL polarizante (Tokio, Japón). A través de esta técnica, se puede determinar la presencia de las diferentes mesofases en función de los cambios de temperatura. Cada una de las

muestras preparadas en los tubos fue puesta sobre porta y cubreobjetos dentro de una cavidad que posee la platina calefaccionada.

5.4 Resultados y Discusión

A continuación se presentan, en primer lugar, los datos obtenidos de bibliografía y luego, a partir de la sección 5.4.1, los obtenidos por el autor y colaboradores con el fin de demostrar que la *cmc* debería ser menor que la reportada en literatura.

Las propiedades coloidales de la AMI se han informado parcialmente en la bibliografía. Sin embargo, algunas son contradictorias y no se ajustan a los datos presentados por el autor.

En principio, la solubilidad de la AMI a 25 °C se informó que es de 0,7 mg/ml y la concentración micelar crítica (*cmc*) se informó de hasta 0,5 mg/ml a 25 °C, medida por técnicas de conductimétricas [20,8]. En la referencia [21] por dispersión de luz, se detalla que a concentraciones cercanas a 0,5 mg/ml aparece una dispersión opalescente. A concentraciones menores esta opalescencia se hace mayor lo que está indicando que la solubilidad real sería posiblemente inferior a 0,125 mg/ml. Valores por debajo de este último se acercan a los encontrados en este trabajo de tesis.

Por otro lado, si una suspensión de alta concentración (50 mg/ml o concentraciones incluso mayores) de AMI en agua se calienta entre 60 y 80 °C, se obtienen dispersiones líquidas transparentes que pueden permanecer aparentemente estables a 20 °C [8]. Esto en realidad no sucede.

Una suspensión de AMI de 50 mg/ml se considera de alta concentración, debido a que en su forma comercial es necesario adicionar Tween 80 para su total solubilización. La elección de esta concentración (50 mg/ml) con la cual se comenzó a estudiar el comportamiento de agregación se ve justificada porque es la que posee cada ampolla comercial.

Para Ravin y colaboradores las soluciones o pseudo-soluciones acuosas (sin cosolventes), como son llamadas en [8], con alta concentración AMI muestran perfiles complejos de sedimentación durante ultracentrifugación, lo que les sugiere la presencia de micelas. Las micelas no sedimentan fácilmente por lo que esta interpretación puede ser incorrecta. Estudios previos de Warren y colaboradores [30] por RMN indican que

existe una ruptura reversible de las micelas a 60 °C. Sin embargo, se ha demostrado, en este trabajo de tesis, que lo que se está rompiendo no son las micelas sino agregados a medida se va acercando a la temperatura de Krafft.

Entre 2 y 8 mg/ml la pseudo-solución de AMI se mantuvo estable con un radio hidrodinámico de las partículas de entre 100 y 500 nm y una baja polidispersidad (100 ± 50 nm). Entre 0,125 y 2 mg/ml la solución muestra un amplio espectro de dimensiones de partículas, desde menos de 1 μm hasta más 10 μm . En este intervalo de concentraciones es donde se presenta la opalescencia [21].

La fase clara se ha definido como una pseudo-solución [21]. Sin embargo, deja de ser transparente y muestra una opalescencia tipo lechosa a temperatura ambiente cuando es diluida a concentraciones cercanas a la *cmc*. Este comportamiento no es típico de tensioactivos en los puntos cercanos a la *cmc*. Lo que indica que algunos de los datos informados en literatura pueden estar mal interpretados. Esta opalescencia lechosa, por dilución de la muestra, aparece inicialmente sin aumento marcado de pH. Sin embargo, un fuerte incremento del pH aparece por debajo de 0,5 mg/ml [21], lo que concuerda con los datos obtenidos en este trabajo de tesis.

Se informa en literatura [21] que a altas concentraciones aparece una mesofase laminar birrefringente y una fase gel. Esto concuerda con los resultados presentados en la sección 5.4.6 de este capítulo.

5.4.1 Determinación de cmc y Solubilidad por Conductividad

Por encima de 70 °C, la transición detectada diluyendo el sistema y midiendo la conductividad se produjo sin modificaciones del aspecto de la solución y siempre se mantuvo límpida. A temperaturas por debajo de 70 °C, la solución tomó un aspecto lechoso cuando fue diluida por debajo del punto de transición. Este punto es encontrado por conductividad. Llegamos a la conclusión de que las transiciones por encima de 70 °C correspondieron al inicio del proceso de agregación micelar de AMI, es decir, la concentración micelar crítica (*cmc*). En otras palabras, el punto de Krafft es $T_k \sim 70$ °C. Por debajo de esta temperatura, la transición tiene una naturaleza diferente y fue

llamada con carácter provisorio, transición 2. Los resultados se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1: transiciones encontradas por conductividad en soluciones acuosas de AMI.

T (° C)	T (K)	cmc (mg/ml)	Xcmc
Concentración Micelar Crítica			
89,8	363	2,22 ± 0,04	5,86 x10 ⁻⁵
84,8	358	1,96 ± 0,03	5,17 x10 ⁻⁵
79,8	353	1,74 ± 0,04	4,59 x10 ⁻⁵
74,8	348	1,69 ± 0,03	4,46 x10 ⁻⁵
T (° C)	T (K)	c (mg/ml)	x
Transición 2			
69,8	343	1,50 ± 0,03	3,96 x10 ⁻⁵
59,8	333	1,43 ± 0,03	3,78 x10 ⁻⁵
49,8	323	1,2 ± 0,1	3,17 x10 ⁻⁵
39,8	313	1,01 ± 0,03	2,67 x10 ⁻⁵
29,8	303	0,74 ± 0,03	1,95 x10 ⁻⁵

Los datos de solubilidad se tabulan en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2: solubilidad de AMI en agua a diferentes temperaturas.

T (° C)	T (K)	S (mg/mL)	S (fracción molar)
59,6	332,8	0,0436	1,37 x10 ⁻⁶
62,4	335,5	0,102	3,19 x10 ⁻⁶
63,1	336,3	0,204	6,37 x10 ⁻⁶
70,2	343,4	1,00	3,14 x10 ⁻⁶
70,6	343,7	1,80	5,64 x10 ⁻⁶

La temperatura de Krafft (T_k) se determinó como 70,6 °C = 343,7 K, mediante la intersección entre las curvas de temperatura crítica vs. concentración, determinada por dilución isotérmica, y la de solubilidad vs. concentración. En este punto se observó un incremento muy marcado de la solubilidad.

Ravin y colaboradores encontraron un valor de T_k de 35 °C [8], aunque el procedimiento no era del todo preciso y probablemente, la pureza del tensioactivo utilizado en ese caso no era tan alta como la AMI usada aquí.

El punto de Krafft y la micelización suelen estar influenciados por la presencia de impurezas, las cuales disminuyen este punto, induciendo la micelización.

A temperaturas inferiores a 70,6 °C, la transición observada no se corresponde con simples agregaciones micelares. Estas transiciones producen un cambio en el aspecto de las soluciones, las cuales también se informaron en la literatura [31]. Por otra parte, las soluciones que se encuentran a una concentración por encima de la de transición, pero por debajo de T_k no pueden ser soluciones micelares, a pesar de que son claras (isotrópicas o traslúcidas). Estas soluciones no mostraron ninguna birrefringencia cuando fueron analizadas por el microscopio de luz polarizada, tanto de forma estática como en flujo.

5.4.2 *Microfotografías TEM*

Las imágenes TEM mostraron agregados relativamente grandes y casi esféricos (diámetro de $17,5 \pm 0,3$ nm) compuesto por otros agregados más pequeños esféricos (diámetro $2,53 \pm 0,05$ nm). Los grandes agregados aparecen rodeados por pequeñas esferas dispersas. Estos se observan claramente en la figura 5.2.

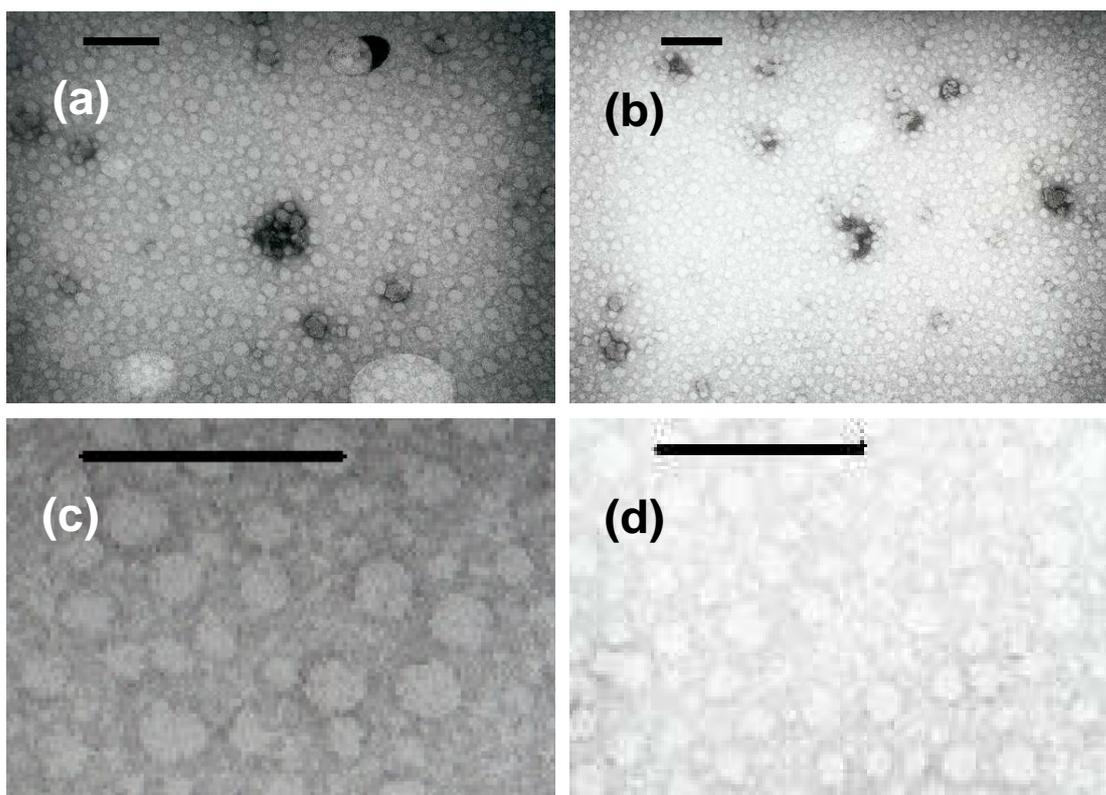


Figura 5.2: microfotografías TEM del sistema Amiodarona – Agua. Para todas las fotos la concentración de AMI es de 2,5 mg/ml En las figuras a y c las barras representa 85 nm y en las fotografías b y d 107 nm. Nótese la aglomeración de esferas pequeñas por otras esferas también pequeñas no organizadas.

5.4.3 Determinación del Número de Agregación por Fluorescencia.

Los experimentos de fluorescencia con pireno generaron los datos representados en figura 5.3, lo que nos permitió determinar el número de agregación $N = 3,89 \pm 0,09$. Por lo tanto, los agregados pequeños con un diámetro $2,53 \pm 0,05$ nm pueden estar formados por alrededor de cuatro moléculas de amiodarona, agregadas en agrupaciones esféricas polidispersas. Se debe tener en cuenta que este no es el número de agregación micelar, ya que la temperatura del experimento estuvo por debajo del punto de Krafft. La única importancia de la información anterior es dar una idea sobre estructura del coacervato y una posible explicación del origen de la alta polidispersidad de los agregados encontrados en literatura [8]. Dado que todos los agregados eran esféricos, el sistema no es birrefringente. El sistema podría formar un cristal líquido cúbico, pero

estas mesofases muestran con frecuencia birrefringencia de flujo o birrefringencia frente a las tensiones, mientras que el sistema estudiado no lo hace. Además, el sistema no tiene la alta viscosidad que con frecuencia, se encuentra asociada a las mesofases cúbicas.

Ravin y colaboradores [8] encontraron un número de agregación micelar cercano a 150 monómeros a 60° C por ultracentrifugación. Sin embargo, esta temperatura es inferior a la T_k informada en este trabajo de tesis y además los mismos autores hallaron que estas soluciones eran heterogéneas; por lo que se puede suponer que no fueron micelas lo que encontraron, sino las agrupaciones de agregados polidispersos que se han descrito aquí.

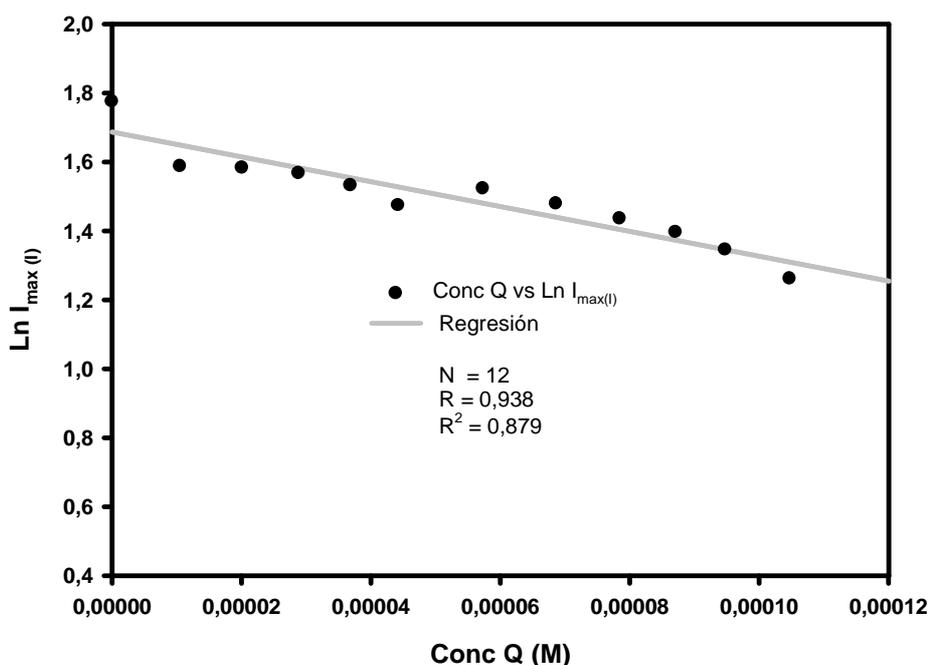


Figura 5.3: $\text{Ln} I_{\text{max}(I)}$ del pireno en función de la concentración de extintor (Q). La pendiente de la recta de regresión es de 3595 ± 93 con un $R^2 = 0.879$.

5.4.4 Medidas de pH y con Electrodo Selectivo de Iones Cloruro.

La figura 5.4 muestra el grado de ionización de los agregados de la AMI a 75 °C y 60 °C determinados con la ecuación $\alpha = 1 - [\text{Cl}^-]_{\text{agg}}/[\text{AMI}]_{\text{agg}}$. Los valores a 75 °C (por

encima de T_k) muestran una dependencia con la concentración total siguiendo la relación:

$$\alpha = - (2,6 \pm 2,2) \times 10^{-5} C^2 (M) + (1,9 \pm 1.5) \times 10^3 C (M) - 2,7 \pm 2,4$$

Con $R^2 = 0,922$ y un nivel de confianza de 0,90. Estos valores son típicos de las micelas.

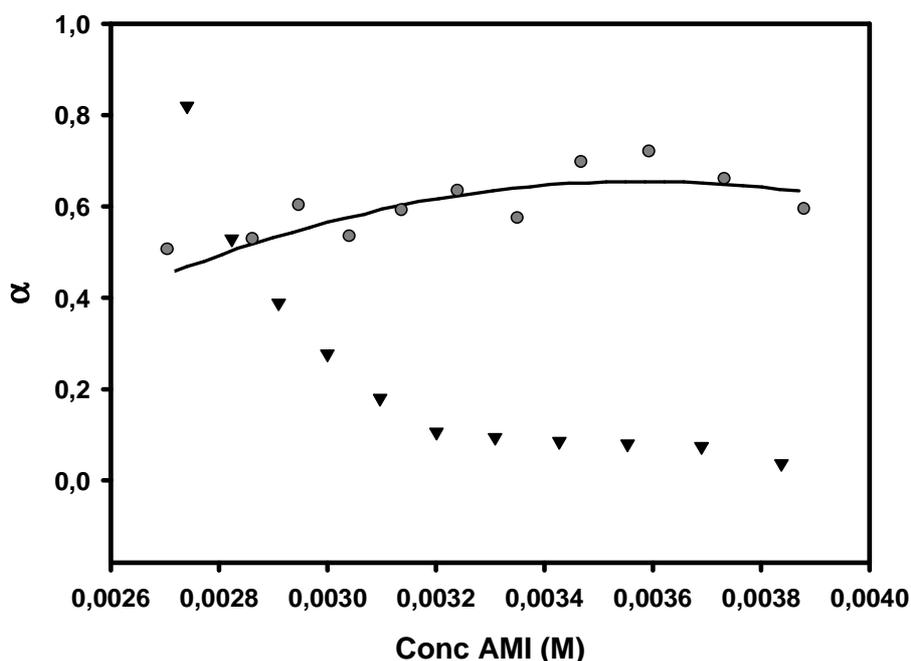


Figura 5.4: Grado de ionización de los agregados a (●) a 75° C y a (▼) 60° C en función de la concentración total de AMI determinado por electrodo selectivo.

A 60 °C (por debajo de la T_k) α es muy baja (porque hay pocos iones Cl^- libres) y casi constante por encima de $C = 0,0032$ M ($\alpha = 0,079 \pm 0,005$). Por debajo de $C = 0,0032$ M (2 mg/ml) y hacia zonas de menor concentración, este valor se eleva alrededor de 0,8. Esto indica que los agregados por encima de 0,0032 M capturan una alta proporción de los iones Cl^- , y por lo tanto, los agregados tienen una carga muy baja. Esto explicaría porque la AMI a pH entre 0 y 6,4 se encuentra presente el 100% en forma de la especie cargada positivamente. En la figura 5.5 se observa el gráfico de microespecies de AMI en función del pH realizado por el programa ChemAxon [32].

Al capturar altas proporciones iones Cl^- , la molécula se neutraliza, disminuyendo así la repulsión electrostática y favoreciendo la agregación. Esto último se debe a que la repulsión electrostática no puede contrarrestar la atracción de Van der Waals entre los agregados. Dado que la precipitación que se produce no es cristalina, se podrían suponer algunas otras limitaciones como las fuerzas hidratación o simplemente razones estructurales. El valor casi constante de α por encima de $C = 0,0032 \text{ M}$ presentado en la figura 5.4 para una temperatura menor a la *cmc*, es indicativa de una especie de separación de micro-fases.

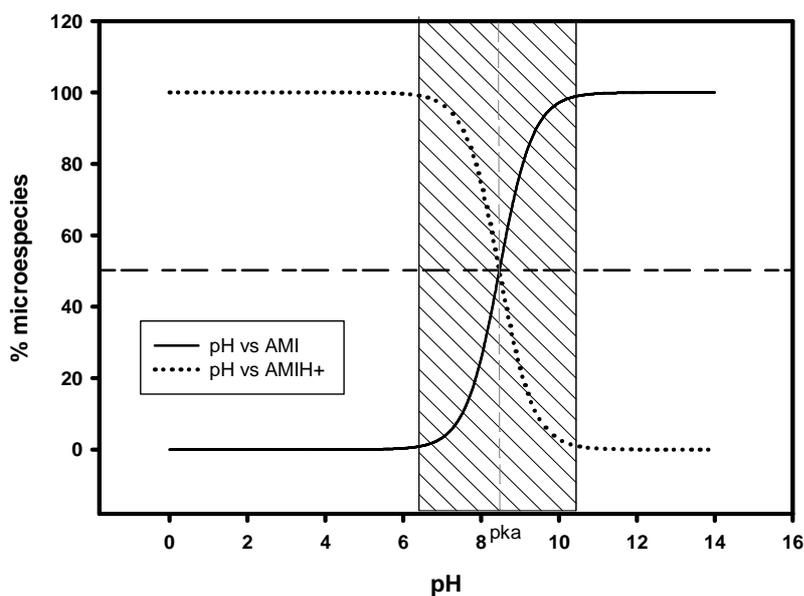


Figura 5.5: pH vs. % de micro especies de AMI cargada (AMI H^+) y no cargada (AMI). El pKa encontrado aquí es de 8,47.

La figura 5.6 muestra la dependencia del pH con la concentración a diferentes temperaturas. Obsérvese que para todas las temperaturas de trabajo el pH siempre estuvo en el intervalo 4,5 – 2; lo que demuestra que la molécula se encuentra cargada.

Esto demuestra que la hidrólisis de la AMI a $T > T_k$ se comporta como la de los tensioactivos comunes que son sales de ácidos o bases débiles.

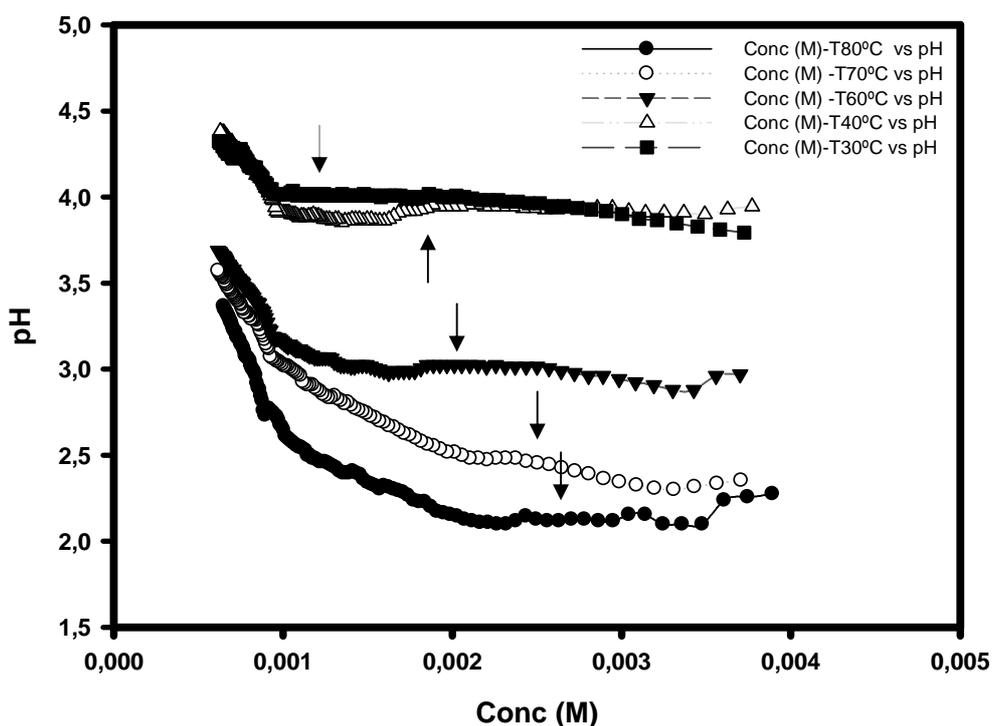
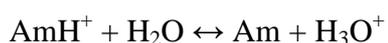


Figura 5.6: pH en función de la concentración total de AMI a diferentes temperaturas. Las flechas indican la concentración crítica.

Por extrapolación del valor pK_a (obtenido de las mediciones de pH) a 70 °C y a $\sqrt{C} = 0$, obtenemos $pK_a = 7,95 \pm 0,13$, es decir, $K_a = (1,13 \pm 0,29) \times 10^{-8}$. Un valor muy cercano se predijo usando el programa ChemAxon, hallándose un pK_a de 8,47 a 25° C. Estos valores están de acuerdo con los encontrados en literatura: $8,50 \pm 0,03$ [33]; $8,73 \pm 0,07$ [6].

Por encima de la *cmc* la hidrólisis continúa debido a la alta solubilidad de la forma neutra en las micelas producida por la reacción:



Sin embargo, cuando $T < T_k$, hay una hidrólisis casi independiente de la concentración, lo que es indicativo de una separación de fases.

5.4.5 Medidas de Viscosidad

Las mediciones de viscosidad a 60 y 40 °C mostradas en la figura 5.7 determinaron que por encima de la concentración crítica, esta es similar a la del disolvente (agua) y aumenta ligeramente cuando la concentración se reduce, lo que demuestra un comportamiento opuesto al esperable en soluciones micelares. Por otra parte, a 80 °C (por encima de T_k) la viscosidad debajo de la *cmc* se redujo de la misma manera que sucede en soluciones de surfactante comunes, pero por debajo de T_k (60 y 40 °C) hay un ligero aumento de la viscosidad. Esto indicaría la formación de agregados y no la destrucción de ellos. Esta determinación muestra que por debajo de la T_k y por debajo de la concentración crítica se ve un aumento de la viscosidad lo cual indica la formación de agregados, los que han sido puestos en evidencia cuando se realizó la determinación del número de agregación en la sección 5.3.3 de este capítulo.

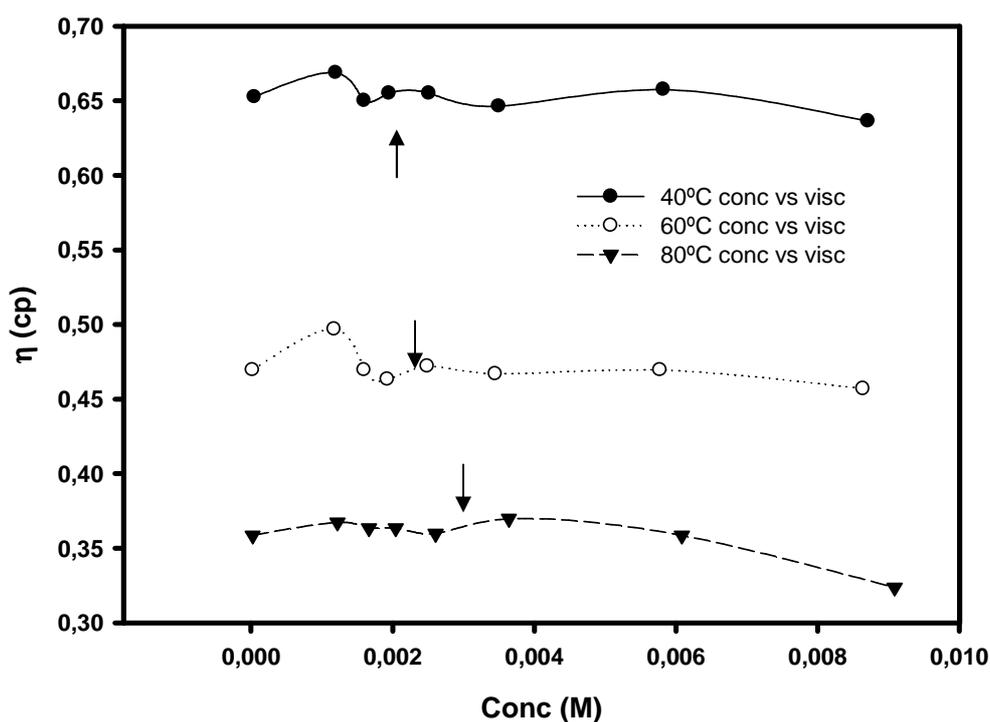


Figura 5.7: curvas de viscosidad (cp) a 40, 60 y 80 °C en función de la concentración (M) de suspensiones de AMI. Las flechas indican la concentración crítica a cada temperatura.

5.4.6 Microscopia Óptica de Luz Polarizada (MOP) con Platina Calefaccionada

Las figuras 5.8 a y b muestran una suspensión de cristales de AMI en el agua, antes de calentar el sistema. El sistema está formado por pequeños cristales aciculares con baja birrefringencia. Después de calentar a 80 °C y enfriar a 30 °C, el sistema presenta la formación de una emulsión lechosa la cual es observada entre polaroides cruzados en las figuras 5.8 g y h mostrando texturas típicas de las estructuras laminares (mesofases laminares y gel). Este material se convierte con el tiempo en una mezcla de cristales globulares y gel. Este tipo de estructuras es lo que en el capítulo 1 se denomina coagel y puede verse en las figuras 5.8 e y f. Aquí se ve el coagel de AMI en una matriz de gel en una solución de líquido isotrópico con pequeños cristales creciendo en su interior.

Luego de un envejecimiento durante 6 meses (al resguardo de la luz y aire), el sistema mostró estar formado sólo por cristales globulares muy birrefringentes y cristales aciculares de baja birrefringencia como los que se aprecian en la figura 5.8 c y d. Se observaron estructuras globulares muy birrefringentes que coexisten con algunos cristales aciculares de baja birrefringencia, los cuales se notan isotrópicos dado que se ven perpendicularmente a su eje óptico, pudiéndose observar solo con aplicación de la placa de retardación.

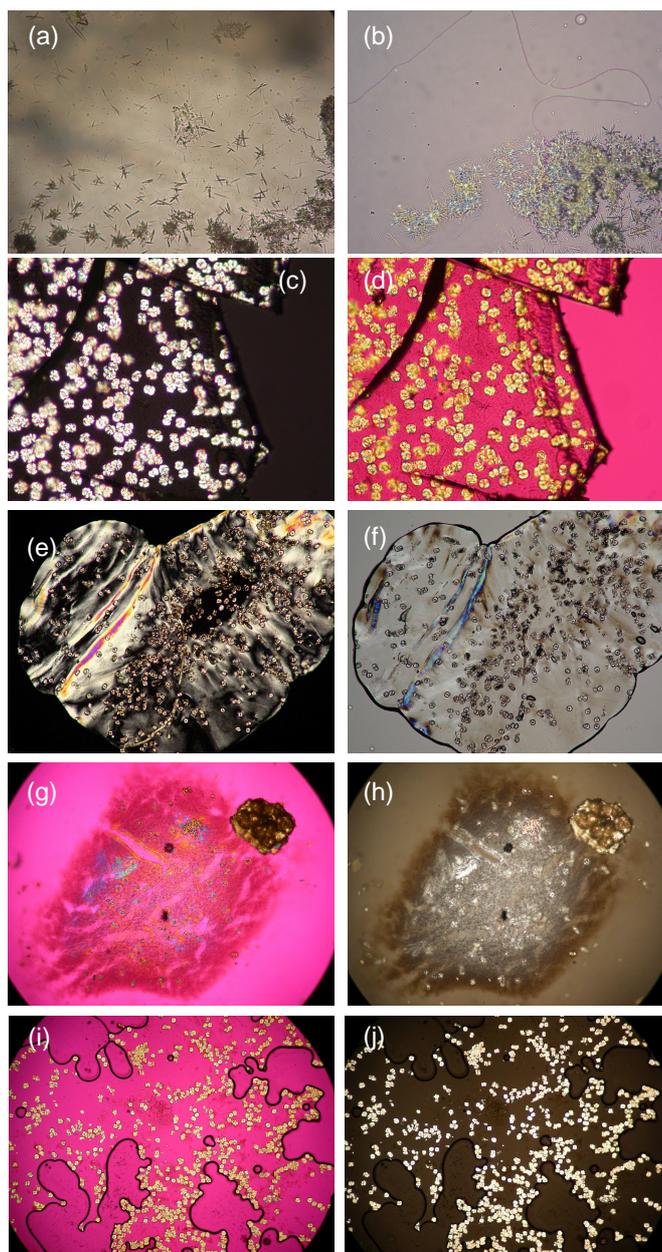


Figura 5.8: microfotografías con luz polarizada. En a y b se observa una suspensión acuosa de cristales aciculares de AMI antes del calentamiento. La a) se sacó sin luz polarizada y la b) entre polaroides cruzados. En las c y d) se observan cristales de AMI de 6 meses de almacenado, entre polaroides cruzados sin y con placa de retardación de 1λ respectivamente. En e y f) se muestra coagel de AMI con y sin polaroides cruzados respectivamente. En g y h) aquí se ve con y sin placa de retardación un gel de AMI por debajo de la T_k . Estas microfotografías fueron sacadas con una magnificación de 40x. En i y j) se observan con y sin placa con una magnificación de 10x una imagen igual a las anteriores con mayor cantidad de estructuras periféricas, donde el detalle de e y f se observa en el centro de i y j.

5.4.7 Diagrama de fases

A partir de los datos recogidos en todos los ensayos anteriores, se construyó el diagrama de fases que se muestra en la figura 5.9

La temperatura de Krafft es $T_k = 70,6^\circ \text{C}$. Para lograr una solución de concentración de más de 2 mg/mL de AMI en agua, es necesario aumentar la temperatura por encima de este valor. Además, existe una concentración crítica que es la que se nombra aquí como *cmc*.

Cuando la solución micelar es enfriada por debajo de la T_k , se obtiene una solución de un líquido límpido (que fue llamado "pseudo-solución " por Ravin y colaboradores [8]).

Este sistema es realmente un coacervato, es decir, una suspensión de un líquido en equilibrio con otro líquido, ambos con los mismos componentes [34]. La fase de alta concentración del coacervato está formada por aglomerados de pequeñas agregados esféricos que tienen cerca de cuatro moléculas de AMI. A pesar de que la ionización de los agregados es baja, siguen estando en solución y sin compactarse, probablemente por el efecto de las restricciones que le impone la hidratación.

Cuando el coacervato se diluye, se torna inestable. A esta concentración se produce una transición de coacervato a gel. Este comportamiento también se observó en un coacervato formado por una mezcla acuosa de 10-undecanoato de sodio y bromuro de dodeciltrimetilammonio [35]. El gel es una estructura laminar y observado en el microscopio de polarización muestra texturas similares a la de las mesofases laminares; esta textura puede ser la causa de la confusión entre la estructura formada y una mesofase laminar. Sin embargo, hay algunas pequeñas diferencias entre ambas. A modo de ejemplo, las texturas en fase de gel son más gruesas que la de los cristales líquidos laminares. Por el envejecimiento del gel, este se convierte en coagel (una mezcla de gel y cristales) y luego en cristales. La transformación lleva varios meses porque se trata cambios estructurales en sistemas muy viscosos (la suspensión de coagel en el agua no es muy viscosa debido a la baja concentración del sistema, pero la viscosidad dentro de las partículas coagel es muy alta).

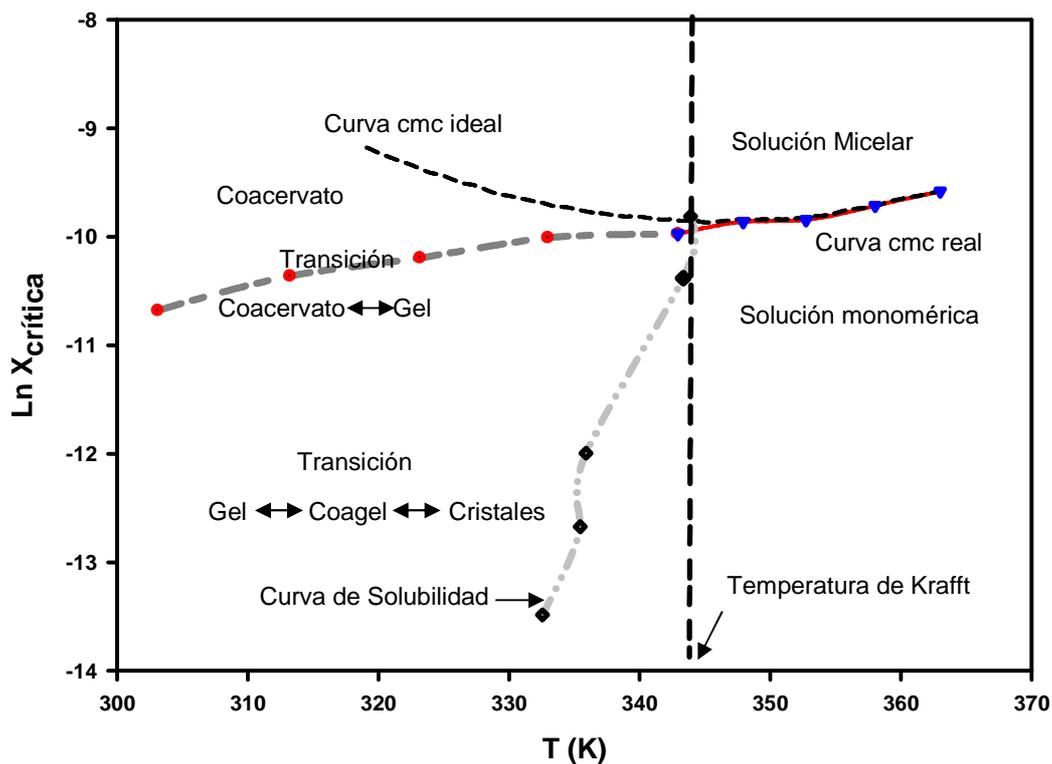


Figura 5.9: Diagrama de fase del sistema AMI-Agua. La línea punteada de concavidad superior representa la *cmc* ideal para un sistema de surfactantes con comportamiento típico. La línea punteada vertical indica en el mínimo de la curva anterior cortando al eje x en la temperatura de Krafft. La línea punteada con círculos rojos representa las transiciones de fase por debajo de la *T_{mc}*. La línea punteada gris clara con rombos es la curva de solubilidad que al llegar a la *cmc* a la correspondiente temperatura de Krafft corta la curva de *cmc* ideal de un surfactante típico en el mínimo de esta. La curva roja representa la *cmc* real.

5.4.8 Termodinámica de la micelización

Los datos de la *cmc* en la figura. 5.9 fueron ajustados con una curva cuadrática encontrándose el mínimo en $T^* = 72,6 \text{ }^\circ\text{C}$ (345,7 K) con $x_{CMC}^* = 5,32 \times 10^{-5}$ (1,69 mg/mL; 0,00248 M). **Los gráficos de *cmc* vs. Temperatura para soluciones acuosas de surfactantes tienen en general forma de U con el mínimo a una temperatura característica T^* [36].**

El grado de ionización de los agregados a la concentración de transición fue obtenida de $\alpha = (\partial k/\partial C)_M / (\partial k/\partial C)_m$, donde $(\partial k/\partial C)_M$ y $1/(\partial k/\partial C)_m$ son las pendientes de las curvas de conductividad específica por encima y debajo de la *cmc*, respectivamente y se muestra en la figura. 5.10. Hay una diferencia entre los valores de α de esta figura y el de la figura. 5.4 debido a que en las determinaciones se emplearon diferentes técnicas.

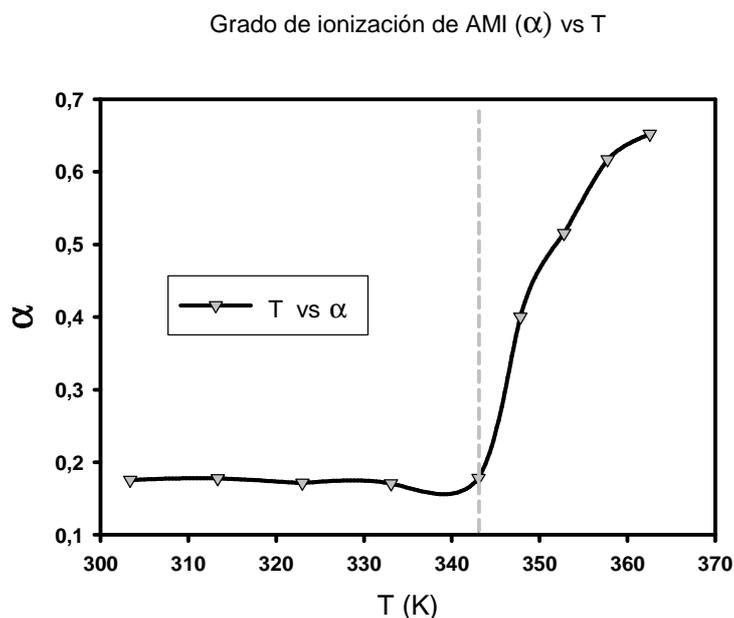


Figura 5.10: grado de ionización de los agregados de AMI en función de la temperatura determinados por conductividad. La línea vertical indica la temperatura de Krafft.

A $60 \text{ }^\circ\text{C}$ y a la concentración crítica, el valor obtenido de α partir de la figura 5.4 es 0,11 y el obtenido de la figura 5.10 es $0,169 \pm 0,026$. A $75 \text{ }^\circ\text{C}$, $\alpha = 0,60$ en la figura. 5.4 y $0,53 \pm 0,01$ de la figura 5.10. Teniendo en cuenta que los datos de la figura. 5.10

fueron obtenidos a partir de los valores de conductividad y los de la figura 5.4 del electrodo selectivo de iones cloruro, la diferencia en valores entre los dos gráficos es esperable. Sin embargo, ambos gráficos muestran la misma tendencia. Se puede ver que en la zona micelar se eleva α con el aumento de la temperatura como es de esperar. Sin embargo, por debajo de T_k α es muy baja y se convierte en casi independiente de T, lo cual es indicativo de un fuerte cambio en la estructura de los agregados, pasando de micelas a una pseudomicrofase.

La termodinámica de la micelización fue calculada con las siguientes ecuaciones:

$$\Delta G_M^\circ = (1 + \alpha) RT \ln X_{cmc}$$

$$\Delta H_M^\circ = T^2 \partial (\Delta G_M^\circ / T) / \partial T$$

$$\Delta S_M^\circ = (\Delta H_M^\circ - \Delta G_M^\circ) / T$$

Los resultados se graficaron en función de la temperatura en la figura 5.11. Los errores promedio de ΔG_M° fue de alrededor el 18% y los de ΔH_M° y ΔS_M° del 26%.

Se ve que la micelización de la AMI está claramente dirigida entrópicamente. Un gran incremento de la entropía compensa la entalpía positiva de forma que el proceso es espontáneo. Otros surfactantes no convencionales poseen este tipo de micelización dirigida de la misma forma [37,38]. En tales casos, el efecto principal que afecta el proceso de micelización es la liberación de moléculas de agua causada por la deshidratación de moléculas del surfactante en la micelización. Esto significa que el esqueleto de la AMI, que tiene tres anillos aromáticos y tres átomos de oxígeno (ver figura 5.1 a y b), tiene muchas moléculas de agua de hidratación que se liberan cuando esta estructura pasa de un medio acuoso en monómeros a un entorno más hidrofóbico en las micelas. La interacción fuerte entre los protones del agua y los electrones π está bien establecida [39-42] y puede explicar esta hidratación.

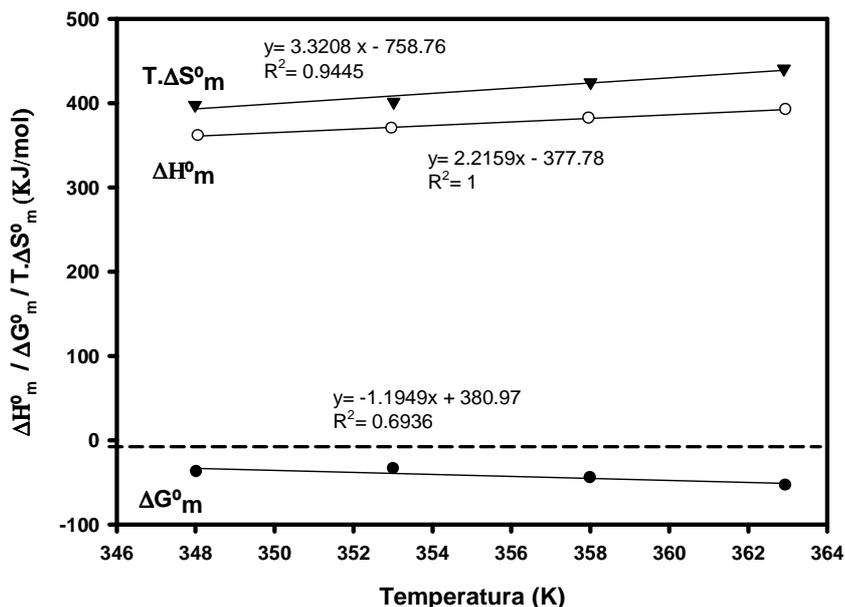


Figura 5.11: Propiedades termodinámicas de la micelización de la AMI en función de la temperatura.

Para comprobar la posibilidad de que las moléculas de AMI puedan deshidratarse durante la agregación, se realizó una simulación computacional de la hidratación de esta molécula [43] observándose moléculas de agua hasta 3 Å y 5 Å de la superficie de la molécula. Mediante esta metodología se verifica que la capa primaria de hidratación de la molécula está formada por alrededor de 19 a 20 moléculas de agua, 14 de las cuales pertenecen al esqueleto de hidratación hidrocarbonado y son probablemente liberadas durante la micelización. Para más datos sobre esta simulación se pueden dirigir a la referencia [43].

Puesto que la hidratación de la porción polar es probable que se conserve en la agregación, la magnitud de la hidratación del esqueleto hidrocarbonado es un dato importante.

Dado que ΔH_M^0 es función lineal de T, se deduce que el cambio de capacidad calorífica a presión constante durante la micelización ΔC_{pM}^0 es constante. Su valor fue $\Delta C_{pM}^0 = (\partial \Delta H_M^0 / \partial T)_p$ [36] = 2,13 J/K mol. Este valor positivo también es compatible con un aumento de grados de libertad cuando se produce la micelización, por lo que puede ser causada por la liberación de las moléculas del disolvente.

5.5 Conclusiones del Capítulo

A partir del estudio realizado y los datos recogidos se pudo establecer un panorama completo sobre las propiedades coloidales de la amiodarona, el cual en bibliografía, era notablemente escaso y confuso.

Se encontró que la temperatura de Krafft de clorhidrato de amiodarona es $T_k = 70,6$ °C. Por encima T_k , se encontró que la *cmc* se produce por un proceso impulsado entrópicamente, probablemente causado por una fuerte deshidratación del esqueleto de la molécula de AMI durante la micelización.

Cuando las suspensiones de AMI de una concentración superior a la *cmc* se calientan por encima de T_k y luego se enfría por debajo del punto de Krafft, aparece un coacervato, que está formado por aglomeraciones de pequeñas partículas esféricas que tienen $2,53 \pm 0,05$ nm de diámetro, que a su vez se aglomeran en grandes grupos. Diluyendo el coacervato, éste se vuelve inestable y se forma una suspensión de gel, que poco a poco se convierte en un coagel (es decir, una mezcla de gel y cristales) y finalmente termina cristalizando.

5.6 Referencias del Capítulo

- [1]- H. Gelderblom, J. Verweij, K. Nooter, A. Sparreboom. *European Journal of Cancer* 37 (2001) 1590.
- [2]- K. Iwase, Y. Oyama, T. Tatsuishi, J. Yamaguchi, Y. Nishimura, A. Kanada, M. Kobayashi, Y. Maemura, S. Ishida, Y. Okano. *Toxicology Letters*. 154 (2004) 143.
- [3]- A. Castro, J. Hogan, K. Benson, C. Shehata, M. Landauer. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 50 (1995) 521.
- [4]- W. Gough, R. Zeiler, P. Barreca, N. El-Sherif. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 4 (1982) 375.
- [5]- W. Yasaka, F. Eichbaum, S. Oga. *Cardiovascular Research*. 13 (1979) 717.
- [6]- F. Boury, J. Gautier, Y. Bouligand, J. Proust. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 20 (2001) 219.
- [7]- M. Riekes, M. Tagliari, A. Granada, G. Kuminek, M. Segatto Silva, H. Stulzer. *Materials Science and Engineering*. 30 (2010) 1008.
- [8] - L. Ravin, E. Shami, E. Rattie. *Journal of Pharmaceutical Science*. 64 (1975) 830.
- [9]- P. Martindale. *The Complete Drug Reference*. 36th ed. The Pharmaceutical Press. (2009) 1211. London.
- [10]- *Farmacopea Nacional Argentina (FNA)*. Decreto 202/2003. 1 (2003) 7^{ma} Ed. Argentina.
- [11]- *British Pharmacopoeia (BP)*. Department of Health. (2009). Great Britain.
- [12]- S. Elhasi. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 65 (2007) 406.
- [13]- G. Ward. *Journal of Parenteral Science and Technology*. 47 (1993) 161.
- [14]- L. Vila Jato. *Tecnología farmacéutica*. Ed. Síntesis. 1 (1997) 50. Madrid.
- [15]- J. Somberg, W. Cao, I. Cvetanovic, V. Ranade, J. Molnar. *American Journal of Therapeutics*. 12 (2005) 9.
- [16]- N. Montvale, P. Thomson. *Cordarone intravenous drug label, Physicians' Desk Reference*. Oradell Medical Economics Inc. 57th ed. (2003) 3387. New York.
- [17]- C. Gruber. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 9 (1923) 92.

- [18]- A. Lamprechta, Y. Bouligand, J. Benoit. *Journal of Controlled Release*. 84 (2002) 59.
- [19]- P. Capps, A. Robertson. *The Pharmaceutical Journal*. 234 (1985) 14.
- [20]- U. Chouhan, E. Lynch. *The Pharmaceutical Journal*. 235 (1985) 466.
- [21]- Y. Bouligand, F. Boury, J. Devoiselle, R. Fortune, J. Gautier, D. Girard, H. Maillol, J. Proust. *Langmuir*. 14 (1998) 542.
- [22]- R. New: *Liposome: A Practical Approach*. IRL Press. (1990). New York.
- [23]- N. Turro, A. Yekta. *Journal of American Chemical Society*. 100 (1978) 5951.
- [24]- Kunitake, T.; Okahata, Y. *Journal of American Chemical Society*. 102 (1980) 549.
- [25]- P. Matteini, M. Brustolon, N. Turro, S. Jocusch, D. Tomalia. *Journal of Physical Chemistry B*. 102 (1998) 6029.
- [26]- J. Rodríguez, M. Sierra, P. Messina, P. Schulz, P. Del Burgo, E. Junquera, A. Rodríguez, E. Aicart. *Journal of Colloid Interface Science*. 314 (2007) 699.
- [27]- R. Zana. *Surfactant Solutions: New Methods of Investigation*, Marcel Dekker Inc. (1987). New York.
- [28]- P. Schulz, M. Morini, R. Minardi, J. Puig. *Journal of Colloid and Polymer Science*. 273 (1995) 959.
- [29]- P. Messina. *PhD Thesis*. Universidad Nacional del Sur. Ed. UNS. (2003). Argentina.
- [30]- R. Warren, R. Stedman, E. Shami, E. Rattie, L. Ravin. *Journal of Pharmaceutical Science*. 59 (1970) 1357.
- [31]- .Y. Bouligand, F. Boury, B. Pech, J. Benoît, J. Gautier, J. Proust. *Liquid Crystals*. 26 (9) (1999) 1281.
- [32]- <http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php> (2010).
- [33]- G. Garrido, V. de Nogales, C. Ráfols, E. Bosch. *Talanta* 73 (2007) 115.
- [34]- M. Sierra, M. Morini, P. Schulz. *Journal of Colloid and Polymer Science*. 282 (2004) 633.
- [35]- M. Sierra, P. Messina, M. Morini, J. Ruso, G. Prieto, P. Schulz, F. Sarmiento, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 277 (2006) 75.
- [36]- J. Rodríguez, A. González-Pérez, J. Del Castillo, J. Czapkiewicz, *Journal of Colloid and Interface Science*. 250 (2002) 438.
- [37]- P. Gardiel, A. Hildebrand, R. Neubert, A. Blume. *Langmuir*. 16 (2000) 5267.

- [38]- S. Paula, W. Sus, J. Tuchtenhagen, A. Blume. *Journal of Physical Chemistry*. 99 (1995) 11742.
- [39]- S. Furutaka, S. Ikawa. *The Journal of Chemical Physics*. 108 (1998) 5159.
- [40]- S. Furutaka, S. Ikawa. *The Journal of Chemical Physics*. 108 (1998) 1347.
- [41]- G. Graziano, B. Lee. *Journal of Physical Chemistry B*. 105 (2002) 10367.
- [42]- G. Graziano. *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 429 (2006) 114.
- [43]- L. Benedini, P.V. Messina, R. Manzo, D. Allemandi, S. Palma, E. Schulz, M. Frechero, P. Schulz. *Journal of Colloid and Interface Science*. 342 (2010) 407.

Capítulo 6

Liposomas de DMPC con Asc₁₆ y AMI

6.1 Introducción

En el capítulo anterior, se indicó que la amiodarona (AMI) es una droga de escasa solubilidad acuosa y que por esto es necesario disolverla en agua utilizando surfactantes y cosolventes. También se ha mencionado que estos cosolventes producen numerosos efectos adversos como hipotensión e inotropía negativa (disminución de la fuerza de latido del corazón) [1,2].

Esto lleva a pensar en nuevos sistemas de administración menos dañinos para el organismo. Un sistema que se ajusta a este principio son los liposomas, los que están formados por fosfolípidos y otros componentes biocompatibles que, habitualmente, no producen efectos adversos. Las características generales de estos surfactantes se encuentran detalladas en el capítulo 2 sección 2.4.

Por otro lado, los efectos adversos producidos por la propia AMI se relacionan a nivel cardiovascular con bradicardia y problemas de conducción cardiaca. Produce

además, fibrosis pulmonar, cirrosis hepática y nefrotoxicidad. También, puede afectar la función tiroidea e inducir hipo o hipertiroidismo contribuyendo a la tirotoxicosis debido a la presencia de I (yodo) en la molécula (como se muestra en la figura 5.1 del capítulo anterior). Otro efecto adverso muy común es la fotosensibilidad. [5]. Se ha sugerido que parte de los efectos no deseados de la AMI se deben a que produce fosfolipidosis (FLD) [5]. La FLD es una inflamación de un tejido producida por la acumulación en el mismo de algún tipo de lípido o colesterol.

Para Sarma y colaboradores en la referencia [6] informan que los potenciales mecanismos de toxicidad de la AMI incluyen: i) citotoxicidad directa por el desarrollo de fosfolipidosis lisosomal (FLD) y ii) citotoxicidad indirecta mediada inmunológicamente. El mecanismo de la FLD no es del todo claro. Sin embargo, existen algunas hipótesis: una es que las drogas que se comportan como surfactantes catiónicos (como AMI) pueden formar complejos con los lípidos, los cuales se tornan imposibles de romper por las fosfolipasas lisosomales y quedan acumulados. La otra hipótesis posible es que directamente estos tensioactivos inhiban la acción de estas enzimas [7].

Sin embargo, para otros autores [8] el estrés oxidativo es el que participa en la patogénesis que produce la AMI. Esto se debe a que han demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que esta droga genera radicales libres.

Si bien estos procesos se pueden desarrollar sin la influencia de factores externos, como la luz, la presencia de ésta puede agravar más aún la patología. La AMI produce fotosensibilidad, que es un daño en la piel producido por acumulación esta droga y la acción de la luz, que termina generando especies de oxígeno reactivas y como consecuencia, se desarrolla la peroxidación de las cadenas lipídicas de las membranas celulares y otras estructuras intracelulares [9]. Estas reacciones pueden, además, ser producidas por otras drogas como las tetraciclinas y la clorpromazina [10, 11].

Ha sido informado en bibliografía [9] que los agentes fotoprotectores como los β -carotenos y la vitamina E pueden disminuir las especies de oxígeno reactivo y de esta manera disminuir la fototoxicidad de la AMI.

Tanto estas reacciones de fotosensibilidad como las de fosfolipidosis producidas por la AMI presentan formas teóricas de ser reparadas y/o minimizadas por el uso de antioxidantes. Kachel y colaboradores [12] encontraron que mediante el uso de Vitamina E se reduce la citotoxicidad pulmonar producida por AMI. En la misma

dirección Agoston y colaboradores [13] encontraron también que la vitamina E y un tipo de flavonoide, la silimarina, disminuye la FLD producida por AMI.

Por otro lado, Ray y colaboradores han encontrado que las proantocianidinas provenientes de las semillas de las uvas son antioxidantes con potencial uso para esta y otras patologías provocadas por la AMI. [14].

La vehiculización de AMI en liposomas ha sido ya informada en literatura [3,4]. Se evidencia por difracción de rayos X de bajo ángulo que la molécula se encuentra formando parte de la bicapa lipídica [3].

En la referencia [15] se presenta un estudio de liposomas con DMPC y colesterol a los cuales se les adiciona Asc₁₆ y con esto conferirle poder antioxidante a la membrana del liposoma.

No se ha encontrado en bibliografía referencias sobre la combinación de la AMI con el Asc₁₆ para minimizar sus efectos adversos. El Asc₁₆, como ya hemos visto, presenta una fuerte actividad antioxidante comparable con la de la Vitamina E y los carotenos [5,16].

En este trabajo se desarrolló un sistema con posibilidades de ser un transportador coloidal, basado en liposomas, con potencialidad de ser cargado con AMI libre de cosolventes y con esto evitar los efectos adversos que estos producen. Además, se observó que la bicapa formada por los fosfolípidos y AMI podía transportar además, el poder antioxidante del Asc₁₆ para contrarrestar los efectos adversos propios de la AMI sea cual fuere el mecanismo real por el cual se producen las alteraciones de los tejidos.

Para la selección del fosfolípido a utilizar se realizó, en primer lugar, un estudio de adsorción en monocapas con Asc₁₆ y dos lípidos diferentes (DMPC y DMPG). Se demostró que se alcanzan presiones superficiales similares en la adsorción del surfactante con uno u otro fosfolípido, se empleó el DMPC para formar liposomas junto con el Asc₁₆, dado que es uno de los componentes principales de las membranas celulares. Por tal motivo se piensa que se podría llegar a una buena compatibilidad entre las membranas del liposoma y las células. Además, este lípido, al no tener una carga predominante, en función al pH y la fuerza iónica, puede “acomodarse” más

favorablemente con moléculas que puedan presentar carga bajo alguna condición experimental.

6.2 Objetivo

El objetivo de las investigaciones que se detallan en este capítulo es obtener y caracterizar liposomas formados con DMPC, Asc₁₆ y AMI pensando en una posible aplicación farmacéutica del sistema.

6.3 Experimental

6.3.1 *Materiales*

El palmitato de ascorbilo (Asc_{16}), clorhidrato de Amiodarona (AMI) y la dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) fueron los mismos que en las experiencias anteriores. La sonda laurdan fue de Molecular Probes (Eugene, OR). Los solventes usados (cloroformo, etanol y metanol) fueron de la máxima pureza comercial disponible. El agua fue purificada por un sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, MA), para obtener un producto con una resistividad de $\sim 18,5 \text{ M}\Omega$.

6.3.2 *Métodos*

6.3.2.1 *Preparación de Liposomas*

En tubos de vidrio se colocan las cantidades indicadas de DMPC, Asc_{16} y Laurdan (todos disueltos en cloroformo-metanol, 1:1). Se parte de soluciones madre de DMPC de 1,47 mg/ml y de Asc_{16} de 0,74 mg/ml. Las cantidades usadas de estas soluciones se detallan en la tabla 2 de la sección 4.4 de este capítulo. Al trabajar con la sonda fluorescente Laurdan (el uso de este compuesto se describe en la sección 6.3.2.2 de este capítulo) se protegen los tubos con papel de aluminio para que la luz no dañe esta molécula. Se lleva a sequedad bajo N_2 , de manera adecuada para lograr una película uniforme. Luego de una hora bajo N_2 para asegurarse la correcta eliminación de los restos de solvente orgánico, se agrega a cada tubo 300 μl de solución reguladora (buffer) (10 mM Hepes, NaCl y $MgCl_2$ a pH 7,4) para obtener una relación 1:2 (lípidos: buffer en $\mu\text{g}:\mu\text{l}$). Se calienta durante 5 minutos en baño a una temperatura superior a la de transición del lípido (más de $23 \text{ }^\circ\text{C}$) y se trata en un vortex 1 minuto cada tubo, obteniéndose una preparación de liposomas multilamelares (MLV). Para lograr una población de MLV de tamaño uniforme, los tubos se colocan en un baño sonicador durante 30 minutos. A cada tubo luego se le agregan 700 μl de buffer para llevar a las concentraciones deseadas (volumen final de 1 ml). Finalmente, para transformar los

MLV en liposomas unilamelares, se los filtra utilizando una jeringa de extrusión (15 pasadas).

6.3.2.2 Polarización Generalizada

Para el cálculo de polarización generalizada (GP), se utilizó *6-lauroil 1-2 dimetilamino naftaleno*, “*Laurdan*”. (Ver Figura 6.1). Esta molécula es una sonda fluorescente anfifílica sintetizada en 1979 para estudiar los procesos de relajación dipolar [17]. En solventes de alta polaridad como al agua, esta sonda muestra alta sensibilidad espectral a los cambios de fase de los fosfolípidos, es decir, produce cambios considerables de su espectro de emisión hacia mayores longitudes de onda debido a los procesos de relajación dipolar [18]. Los cambios de fase de los fosfolípidos corresponden a diferentes formas de empaquetamiento de sus cadenas lipídicas. [19]. Los espectros de excitación y emisión en estado estático del Laurdan pueden ser resueltos en dos componentes espectrales que corresponden a dos diferentes fases de los lípidos, [18] una antes y otra después de su temperatura de transición. Como muestra la figura 6.2, esta molécula se dispone en la interfase hidrofílica-hidrofóbica de la bicapa lipídica con la cola de ácido láurico (dodecanoico) anclada a la capa hidrocarbonada de los fosfolípidos (ver Figura 6.2).

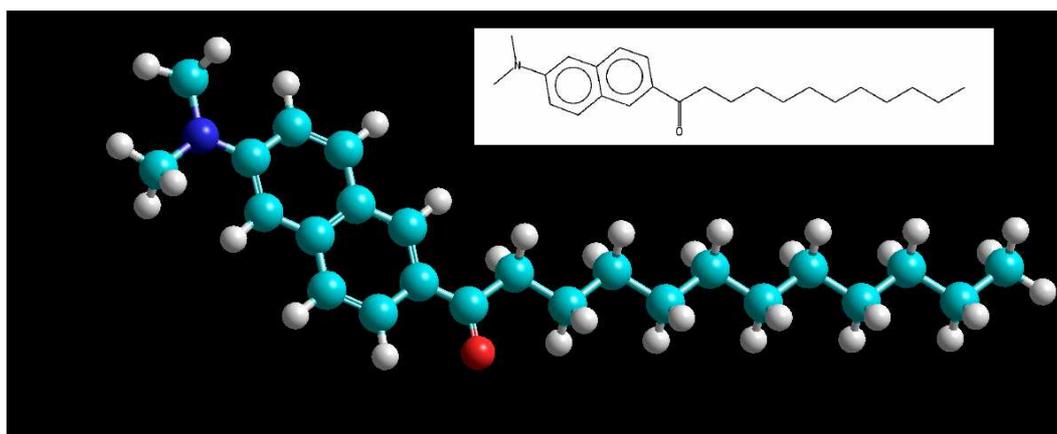


Figura 6.1: Representación de la molécula de Laurdan en 3D realizada con el programa Hiperchem 8 professional. En Celeste: C, blanco: H, rojo: O, azul: N. El inserto muestra otra forma de representación.

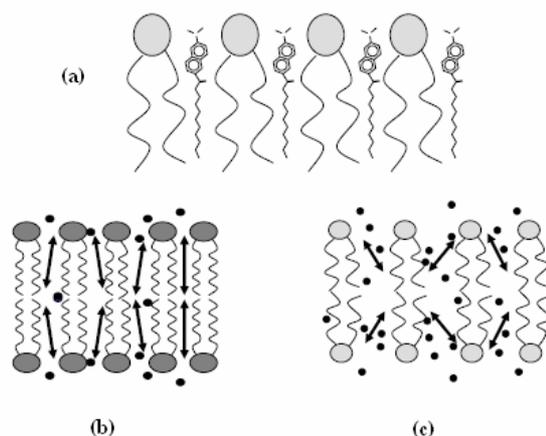


Figura 6.2: a) Representación esquemática de la disposición de las moléculas de laurdan en una bicapa lipídica; b) bicapa ordenada, cristalina líquida; c) bicapa desordenada, gel [20]. Las flechas dobles representan a las moléculas de Laurdan y los puntos negros las de agua.

El parámetro de fluorescencia de estado estático conocido como GP relaciona cuantitativamente estos cambios espectrales teniendo en cuenta las intensidades de fluorescencia relativas de regiones del azul y rojo de los espectros de emisión y excitación, respectivamente [18]. En fase líquido cristalina el espectro de emisión del Laurdan está desplazado hacia el rojo con un máximo en 490 nm y en la fase gel su espectro de emisión se encuentra desplazado hacia el azul con un máximo cercano a 440 nm.

Los valores de GP obtenidos para fosfolípidos que sufren cambios de fase están relacionados con el número y libertad de movimiento de las moléculas de agua en el entorno del grupo fluorescente de la sonda [18]. Estos valores se calcularon con la ecuación 6.1.

En resumen, la sonda Laurdan es sensible a la polaridad y la dinámica molecular del ambiente lipídico, debido a un proceso de relajación molecular que experimenta en presencia de dipolos [18]. Dado que los principales dipolos que detecta la sonda son las moléculas de agua de su entorno, los cambios en los espectros de emisión de Laurdan dependen principalmente del grado de penetración de las moléculas de agua a su interior, hecho directamente relacionado con el empaquetamiento lipídico. Figura 6.2. Esta característica que posee la sonda la convierte en una herramienta útil para estudiar cambios en el orden de los fosfolípidos.

Las mediciones de espectroscopía de fluorescencia en estado estático se realizaron utilizando un espectrofluorímetro SLM 4800 (SLM Instruments, Urbana, IL) y cubetas de cuarzo de 5 x 5 mm. La temperatura se controló con un baño circulante de agua termostatazada (Haake, Darmstadt, Germany). Las muestras se excitaron a una λ de 360 nm, recogiendo espectros en el intervalo de 390 a 500 nm. A partir de los espectros de excitación se calculó el valor de polarización generalizada (GP), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$GP = (I_{434} - I_{490}) / (I_{434} + I_{490}) \quad (\text{ec. 6.1})$$

donde I_{434} y I_{490} corresponden a los valores de intensidad de fluorescencia de la sonda Laurdan a las longitudes de onda de emisión, 434 nm y 490 nm, respectivamente. Estas longitudes de onda son las características de fase gel y líquido-cristalina, respectivamente. [18].

Las temperaturas de transición se obtuvieron por cálculo de la segunda derivada de los valores experimentales (curvas de GP en función de la temperatura). Se consideró que la temperatura de transición (T_t) corresponde al valor cero de la segunda derivada (punto de inflexión) de la curva.

6.3.2.3 Medición del Tamaño de Partícula y Potencial Zeta

Una partícula coloidal aislada inmersa en un líquido estará rodeada por una doble capa eléctrica. La primera capa corresponde a la carga en la superficie de la partícula. La segunda capa es la formada por el exceso de iones de igual signo y de signo contrario que la partícula en la solución. Estos iones son llamados iones comunes o coiones y contraiones respectivamente. El espesor de esta capa puede ser del orden del tamaño de las partículas coloidales, dependiendo de la concentración de electrolito.

La electroforesis consiste en la medida del movimiento de partículas coloidales bajo un campo eléctrico. Esta medida puede ser usada para determinar el signo de la carga de las partículas o su movilidad electroforética, que está relacionada con la carga superficial de las partículas y el potencial zeta (ζ).

Las técnicas electroforéticas son de gran utilidad para caracterizar sistemas micro y nanoparticulados. Dentro de estos se incluyen, por supuesto, los liposomas. En

1965 Bangham [21] ya había usado el potencial ζ para determinar la difusión de iones en membranas biológicas.

Dado que la carga de una partícula no puede ser medida directamente se realizaron modelos para determinarla. Para la aplicación de estos modelos había que definir primero cual era la superficie de deslizamiento de la partícula respecto al medio. Toda la superficie de una sustancia forma una unidad cinética, de manera que la partícula se mueve con una cierta cantidad de líquido y su carga correspondiente. La *superficie de deslizamiento*, se puede considerar como un plano paralelo a la superficie de la partícula, situado a una distancia Δ de ella. A través de la movilidad electroforética (velocidad por unidad de campo eléctrico) se obtiene la carga neta sobre la partícula. El análisis de las fuerzas también puede llevarse a cabo en términos de carga o potencial electrostático, el cual se calcula en la superficie de deslizamiento y es llamado potencial electrocinético o potencial zeta (ζ).

Helmholtz fue el primero en proponer un modelo de estructura de doble capa eléctrica. Este modelo consiste en una doble capa rígida que esta formada por las cargas originales de la superficie (capa 1) y la de contraiones (de carga opuesta a los de la superficie) adsorbidos, (capa 2), situados a una distancia δr , la cual que depende del radio del ión.

El siguiente modelo fue el propuesto por Gouy y Chapman. Estos autores supusieron una doble capa difusa, postulando que las fuerzas eléctricas tienden a acercar los iones a la superficie de la partícula y la agitación térmica a desordenarlos. Estos iones están situados a una distancia δ_d . Un esquema de este modelo se presenta en la figura 6.3.

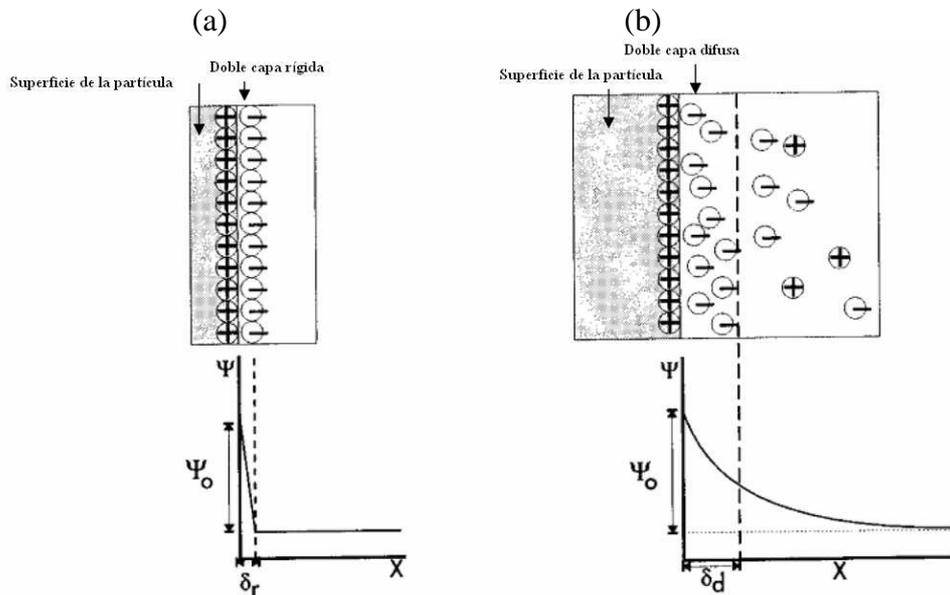


Figura 6.3: Representación esquemática de la doble capa eléctrica. A la izquierda (a) el modelo de Helmholtz, capa rígida y a la derecha (b) el modelo Gouy-Chapman, capa difusa. Ψ_0 es el potencial de doble capa. δ_r y δ_d son la distancia en nm de la capa de contraiones de la capa rígida y difusa respectivamente [22].

En base a la teoría de la capa difusa de Gouy-Chapman, Stern desarrolló un modelo de doble capa eléctrica dividiéndola en dos zonas:

1. Una zona compacta o interna, formada por una capa de iones adsorbidos sobre la pared. Se representa en teoría por una carga superficial concentrada en un plano a una distancia Δ de la superficie (Capa de Stern).
 2. Una zona difusa o de Gouy-Chapman que se extiende desde la superficie de deslizamiento hasta el infinito. Está formada por la carga difusa en el medio y el potencial se representa bien por la ecuación de Poisson-Boltzmann.
- Estas 2 capas se encuentran separadas por el plano de Stern. En la figura 6.4 se presenta un esquema de este modelo.

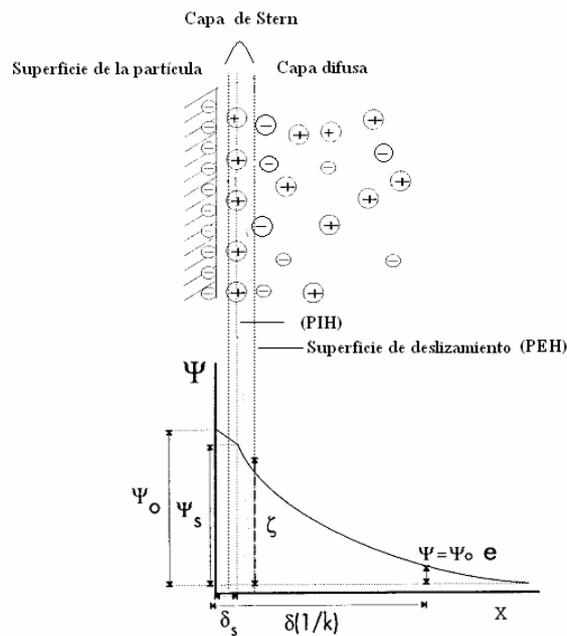


Figura 6.4: Esquema de la doble capa difusa del modelo de Stern. Gráfico modificado a partir de figura de referencia [23].

A su vez la capa de Stern está subdividida en dos planos: el primer plano, denominado plano interior de Helmholtz (PIH) es el de los centros de los iones adsorbidos. Estos iones están parcialmente o no hidratados, e interactúan con la superficie mediante enlaces covalentes o por puentes de hidrógeno. Las distribuciones de carga y potencial están determinadas básicamente por los tamaños de iones y por las interacciones de corto alcance entre iones y dipolos con la pared. Se denomina plano exterior de Helmholtz (PEH) al plano de los centros de los aniones hidratados en contacto con la superficie.

Diversos estudios postulan que el potencial ζ en la superficie de desplazamiento coincide con el potencial de la capa difusa (ψ_d) en el denominado plano exterior de Helmholtz (PEH). Esto es de gran utilidad ya que el potencial ψ_d está implicado en la determinación del potencial electrostático utilizado en la teoría DLVO [24].

El tamaño de partícula, el índice de polidispersidad (PDI) y el potencial zeta (ζ) de los liposomas fueron determinados con un equipo Zeta sizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom) [25]. El PDI es un parámetro que define la distribución de tamaño de partícula, más estrictamente: es la medida adimensional en la

amplitud en el tamaño de la partícula [26]. Este valor va de 0 a 1 y es calculado de acuerdo a normas ISO 13321 (International Organization of Standardization) [27]. Valores de PDI entre 0,1 y 0,2 indican que las muestras son monodispersas [28]. En la referencia [29] se afirma que valores de PDI hasta 0,3 para un sistema nanoparticulado de Ketoconazol son aceptables.

6.3.2.4 Predicción de la Estabilidad por DLVO

Prácticamente ningún sistema disperso heterogéneo es completamente estable. Las partículas de un sistema coloidal siguen un movimiento browniano continuo y por lo tanto, colisionan continuamente entre sí. En estas colisiones las partículas pueden repelerse. Sin embargo, tras el choque, se pueden generar asociaciones permanentes por fuerzas de atracción que inestabilizan al coloide llegando a la separación de las fases.

La carga superficial de las partículas, además de mantenerlas en suspensión, modifica la distribución de los iones de una solución acuosa. Los iones del medio de igual carga son repelidos por la superficie de la partícula y los de carga opuesta son atraídos, formando una doble capa.

Las dispersiones de liposomas tienen una elevada energía superficial asociada a la gran superficie específica que presentan. Desde el punto de vista termodinámico son inestables y tienden de forma natural a agregarse o fusionarse, para así disminuir su área y su energía libre superficial.

En la mayoría de los sistemas coloidales, liposomas en este caso, las fuerzas de interacción son modelizadas a partir de la teoría DLVO.

Esta teoría fue desarrollada en los años 40 por Derjaguin y Landau, y Verwey y Overbeek [30,31] y supone que el potencial total de interacción entre dos partículas es la suma del potencial repulsivo electrostático y el potencial atractivo de London - Van der Waals.

Los potenciales DLVO pueden representarse en función de la distancia entre las partículas, en este caso liposomas, a partir de los valores experimentales de ζ , tamaño inicial de los liposomas y las características del medio, usando la ecuación 6.2.

Esta teoría se basa principalmente en el hecho de que la estabilidad coloidal está dominada esencialmente por la suma del potencial atractivo de Van der Waals (V_A) y el

potencial repulsivo electrostático (V_R) producido por la doble capa eléctrica que rodea a cada partícula. La combinación de ambos potenciales origina un potencial total de interacción (V_{DLVO}) en función de la distancia entre dos partículas que se aproximan:

$$V_{DLVO} = V_R + V_A \quad (\text{ec. 6.2})$$

6.4 Resultados y Discusión

6.4.1 Liposomas de DMPC con Asc₁₆ y de DMPC con Asc₁₆ y AMI.

Se desarrollaron liposomas: de DMPC y el Asc₁₆ por un lado y luego con DMPC el Asc₁₆ + AMI por otro. Las concentraciones y proporciones de las sustancias utilizadas se presentan en la tabla 6.1. A la izquierda y en forma descendente, se presentan todos los liposomas preparados. Todos los liposomas fueron preparados con DMPC, por lo que el sistema “blanco o control” fue de DMPC puro. En el resto de las tablas, 6.2, 6.3 y 6.4 se nombra como “control”. Para la determinación GP se prepararon los liposomas con lauridan en las proporciones mostradas en la tabla y para potencial zeta y tamaño de partícula se prepararon sin la sonda. Cabe destacar que la concentración de AMI en el liposoma está por debajo de la terapéutica (3 mg/100 ml) y fue establecida de esta manera para que las mediciones sean más exactas y precisas. Sin embargo, bajo estas condiciones los liposomas pueden prepararse a una concentración de 40 mg/100 ml, más cercana a la terapéutica, con una relación 1:1 de lípido: solución reguladora (buffer).

Tabla 6.1: para cada sistema ensayado se muestran las concentraciones y proporciones de los diferentes componentes.

Liposomas	DMPC (μmol)	DMPC (μg)	Asc ₁₆ (μmol)	Asc ₁₆ (μg)	AMI (μmol)	Laurdan (μmol)
DMPC (control)	0,22	150	----	----	----	----
DMPC + Asc ₁₆ 10%	0,22	150	0,022	9,12	----	----
DMPC + Asc ₁₆ 20%	0,22	150	0,044	18,24	----	----
DMPC + Asc ₁₆ 30%	0,22	150	0,066	27,36	----	----
DMPC + Laurdan (0,6 μM)	0,22	150	----	----	----	$0,6 \times 10^{-3}$
DMPC + Asc ₁₆ 10% + Laurdan (0,6 μM)	0,22	150	0,022	9,12	----	$0,6 \times 10^{-3}$
DMPC + Asc ₁₆ 20% + Laurdan (0,6 μM)	0,22	150	0,044	18,24	----	$0,6 \times 10^{-3}$
DMPC + Asc ₁₆ 30% + Laurdan (0,6 μM)	0,22	150	0,066	27,36	----	$0,6 \times 10^{-3}$
DMPC + Asc ₁₆ 10% + AMI 10%	0,22	150	0,022	9,12	0,022	$0,6 \times 10^{-3}$
DMPC + Asc ₁₆ 10% + AMI 10% + Laurdan (0,6 μM)	0,22	150	0,022	9,12	0,022	$0,6 \times 10^{-3}$
DMPC + Asc ₁₆ 10% + AMI 20%	0,22	150	0,022	9,12	0,044	$0,6 \times 10^{-3}$
DMPC + Asc ₁₆ 10% + AMI 20% + Laurdan (0,6 μM)	0,22	150	0,022	9,12	0,044	$0,6 \times 10^{-3}$

6.4.2 Estado Biofísico de las Membranas de los Liposomas de DMPC con Asc₁₆ por Polarización Generalizada

Para estudiar la perturbación del estado biofísico de la bicapa pura de DMPC por la presencia del Asc₁₆, se calcularon los valores de GP a partir de los espectros de fluorescencia de la sonda Laurdan obtenidos a distintas temperaturas y se representaron en las Figuras 6.5. Dicho valor es dependiente de la cantidad de agua en la membrana, lo cual está relacionado directamente con la polaridad de la membrana e indirectamente con el orden de la misma.

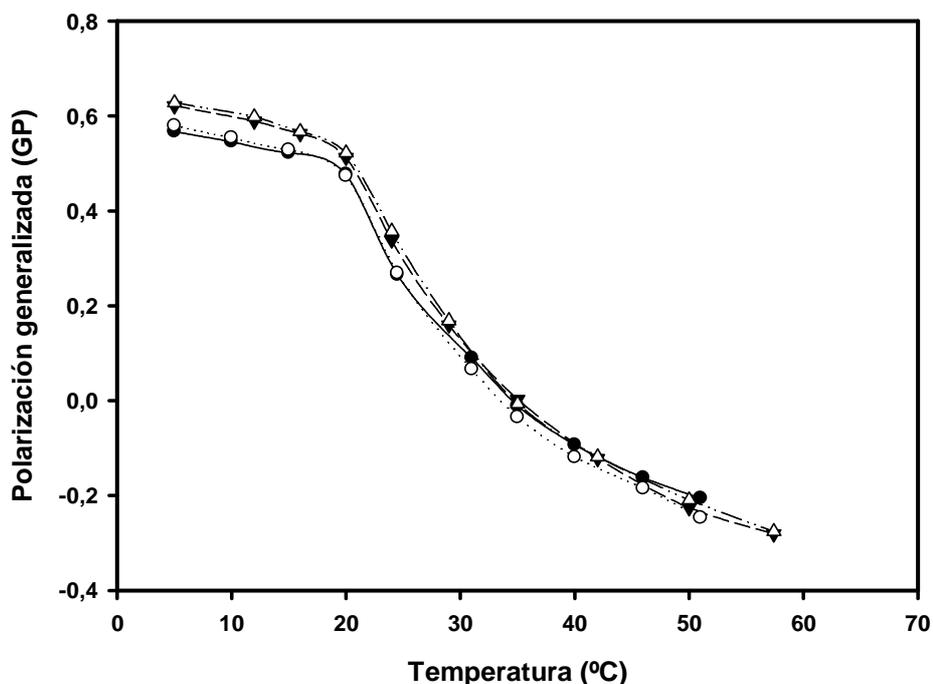


Figura 6.5: Gráfico de polarización generalizada de la sonda fluorescente de Laurdan en función de la temperatura para una muestra de liposomas unilamelares de DMPC puro (●), DMPC + 10% de Asc₁₆ (○), DMPC + 20% de Asc₁₆ (▼) y DMPC + 30% de Asc₁₆ (△). Gráfico representativo de tres corridas independientes.

Analizando la transición de fase de la Figura 6.5, se evidencia que la presencia de Asc₁₆ no perturba significativamente las fases gel o líquido-cristalina del DMPC ya que no se produce una disminución en los valores de GP a bajas temperaturas o un

aumento de dichos valores a altas temperaturas. De ocurrir estas variaciones, como consecuencia se observaría un ensanchamiento de la transición, indicativo de un sistema con componentes que presentan comportamientos biofísicos diferentes (por ejemplo, esto ocurre cuando a un sistema puro de DMPC se le incorpora colesterol).

A partir de las curvas de GP en función de la temperatura, se obtuvieron las T_t para el sistema de DMPC puro y con concentraciones crecientes de Asc₁₆. Estos valores se informan en la siguiente tabla.

Tabla 6.2: Temperaturas de transición de los diferentes liposomas preparados. T_t corresponde a los valores de temperaturas de transición que se desprenden de la figura 6.5.

Liposomas de DMPC	T_t (°C)
Control	25,1 ± 0,8
Con 10% Asc ₁₆	26,1 ± 1,7
Con 20% Asc ₁₆	27,4 ± 1,9
Con 30% Asc ₁₆	25,9 ± 1,3

Como era de esperar, las T_t calculadas para los liposomas formados por DMPC y tres proporciones diferentes de Asc₁₆ (10, 20 y 30 %), no difieren de la T_t de la bicapa lipídica pura de DMPC que fue usada como control. Es decir, que en las proporciones de Asc₁₆ estudiadas, no se observan perturbaciones significativas de la bicapa lipídica usada como modelo.

6.4.3 Estado Biofísico de las Membranas de los Liposomas de DMPC con Asc₁₆ y AMI por Polarización Generalizada

En primer lugar, se observa en la figura 6.6 que para los sistemas de DMPC con Asc₁₆ y AMI en las dos proporciones ensayadas, no hay un corrimiento significativo en la temperatura de transición de fase respecto a la que presenta el DMPC puro (~ 23 °C). Los valores de T_t se informan en la tabla 6.3. Sin embargo, se puede apreciar un

ensanchamiento, o separación de las curvas, a partir de la zona de transición de fase, que se va haciendo más evidente hacia la fase desordenada (indicado con la flecha). Como se indicó anteriormente, luego de la temperatura de transición existe la fase gel o fluida. Por lo tanto, una separación de las curvas hacia mayores GP indica que hay un sistema no homogéneo, no cooperativo y que la presencia de la AMI causa una pequeña “estructuración” de la fase desordenada. Algo muy similar sucede en la referencia [32], donde se evalúa por polarización por fluorescencia el efecto de la AMI en membranas biológicas. Tanto en la referencia [32] como en este trabajo de tesis, se puede ver que el incremento del contenido de AMI en el liposoma afecta solamente a la fase fluida de la bicapa y no a la fase cristalina.

Es probable que la fase líquida sea más sensible a las perturbaciones estructurales creadas por la AMI que la sólida. Podría ser que en la fase de baja temperatura la AMI se segregue en islotes y afecte poco la estructura general del liposoma, mientras que en la de alta temperatura, se disuelva en la bicapa y altere su estructura en general.

En la referencia [32] los liposomas fueron preparados con DMPC y AMI y en este trabajo de tesis además se les agregó Asc₁₆. Resultados similares refuerzan el hecho que el antioxidante utilizado no genera una perturbación biofísica significativa de la membrana del liposoma.

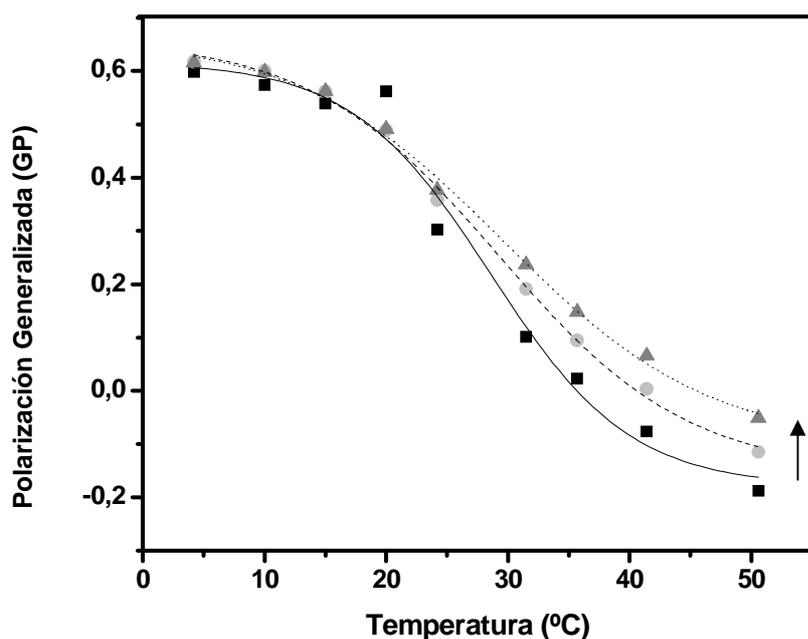


Figure 6.6: Polarización generalizada de la sonda fluorescente Laurdan en función de la temperatura de liposomas unilamelares de DMPC solo (■), con 10% Asc₁₆ más 10% AMI y 20% de AMI (● y ▲, respectivamente). En líneas llenas se representan los ajustes de las curvas con los colores respectivos. La flecha indica el aumento de estructuración de la membrana por adición de cantidades crecientes de AMI. Gráfico representativo de tres corridas independientes.

Tabla 6.3: T_t representa a las temperaturas de transición de los sistemas DMPC puro, DMPC + 10% Asc₁₆ + 10% AMI y DMPC + 10% Asc₁₆ + 20% AMI correspondientes a la figura 6.6.

Liposomas de DMPC:	T _t (°C)
Control	25,1 ± 0,8
Con 10% Asc ₁₆ + 10% AMI	27,1 ± 1,1
Con 10% Asc ₁₆ + 20% AMI	24,7 ± 2

6.4.4 Medidas de Potencial Zeta y Tamaño de Partícula para Liposomas de DMPC con Asc₁₆ y de DMPC con Asc₁₆ y AMI

Se han utilizado medidas de potencial zeta y tamaño de partícula para caracterizar el sistema DMPC-Asc₁₆ con y sin AMI. En la siguiente tabla se presentan los potenciales zeta y los tamaños (diámetro) de partícula promedio con sus respectivas desviaciones. La determinación de los valores de tamaño y potencial zeta de liposomas de DMPC puro se realizó por triplicado.

Tabla 6.4: Se muestran el potencial zeta y el tamaño de partícula de los 4 sistemas ensayados. PDI: índice de polidispersidad. Los experimentos se realizaron por duplicado en corridas independientes excepto los de DMPC puro que fueron por triplicado.

Liposomas de DMPC	ξ (mV)	Tamaño de partícula promedio (nm)	PDI
Control	$-6,3 \pm 0,2$	$156,4 \pm 5$	$0,08 \pm 0,009$
Con Asc ₁₆ 10%	$-9,4 \pm 0,3$	$156,3 \pm 12$	$0,1 \pm 0,04$
Con Asc ₁₆ 20%	$-14,8 \pm 0,3$	$159,1 \pm 15$	$0,1 \pm 0,02$
Con Asc ₁₆ 30%	$-16,5 \pm 0,5$	$182,5 \pm 39$	$0,13 \pm 0,03$

La presencia de un solo pico en la distribución de tamaño de partícula indica una distribución monomodal.

Puede observarse que cantidades crecientes de Asc₁₆ en los liposomas no ocasiona una significativa modificación del tamaño de los mismos. Además, es de hacer notar que a medida que se aumentan las proporciones del antioxidante, aumenta el potencial zeta negativamente. Esto era esperable, dado que en las condiciones de pH (~7,4) ensayadas, el Asc₁₆ se encuentra cargado negativamente, por lo que al aumentar su proporción en el sistema este se cargaría de moléculas negativas.

En la mayoría de las soluciones electrolíticas el potencial zeta de fosfocolina (PC) tiende a ser negativo debido a la presencia de una capa de aniones adsorbida a los

dipolos situados en las cabezas polares zwitteriónicas [33]. Esto concuerda con los resultados aquí obtenidos.

El potencial zeta en soluciones de liposomas de DMPC [34] puro se encuentra entre -5 y -25 mV, dependiendo de la fuerza iónica del medio. Los valores obtenidos por el autor se encuentran dentro de este intervalo.

Asc₁₆ presenta un parámetro crítico de empaquetamiento cercano a 1 [35]. Este concepto se trató en el capítulo 2. Como se ha visto en el capítulo 3, a bajas concentraciones, el Asc₁₆ forma estructuras laminares, ya sean gel o cristal líquido. En consecuencia, su parámetro de empaquetamiento también es cercano a la unidad, y era de esperar que su inclusión en los liposomas no alterara la estructura básica de los mismos, a diferencia, por ejemplo, de la adición de colesterol a membranas lipídicas, que perturba su estructura [16]. Como se observa en la tabla 6.4 los tamaños de los liposomas se mantienen casi invariables al añadir Asc₁₆.

En la siguiente tabla (ver tabla 6.5) se presentan los potenciales zeta y los tamaños de los liposomas con el agregado de cantidades crecientes de AMI. Es de hacer notar que a medida que aumenta la proporción de AMI el potencial zeta se hace cada vez más positivo. Esto es debido a que en las condiciones experimentales de pH (~ 7,4), la AMI se encuentra ionizada positivamente (ver figura 6.5 del capítulo 5, microespecies de AMI en función del pH). Por lo tanto es esperable que si aumenta la proporción de AMI cargada positivamente el potencial zeta se haga menos negativo y como consecuencia se pueda inestabilizar el sistema.

Tabla 6.5: Se muestran el potencial zeta y el tamaño de partícula de los tres sistemas ensayados. Los experimentos se realizaron por duplicado en corridas independientes excepto los de DMPC puro que fueron por triplicado.

Liposomas de DMPC	ξ (mV)	Tamaño de partícula promedio (nm)	PDI
Puro	-6,23 ± 0,2	156,4 ± 5	0,08 ± 0,009
con Asc ₁₆ 10% + AMIO 10%	-8,88 ± 0,3	160,2 ± 15	0,12 ± 0,04
con Asc ₁₆ 10% + AMIO 20%	-6,21 ± 0,3	163,1 ± 20	0,16 ± 0,04

Como puede observarse los tamaños promedio de los liposomas se mantuvieron relativamente estables con PDI menores a 0,2. Esto indica que son monodispersos [28].

6.4.5 Estudio de la Estabilidad de Liposomas por DLVO

Como se mencionó en el apartado 6.3.2.4, esta teoría se basa en que la estabilidad coloidal está dominada esencialmente por la suma del potencial atractivo de Van der Waals (V_A) y el potencial repulsivo electrostático (V_R) producido por la doble capa eléctrica que rodea a cada partícula. La combinación de ambos potenciales origina un potencial total de interacción (V_{DLVO}) en función de la distancia entre dos partículas que se aproximan:

$$V_{DLVO} = V_R + V_A \quad (\text{ec. 6.2})$$

Para la aplicación de la teoría DLVO se consideran a los liposomas como esferas huecas de igual tamaño, por lo que el potencial atractivo de Van der Waals (V_A) se puede expresar de la siguiente manera:

$$V_A = \left(-\frac{Aa}{12} \right) \left[\frac{1}{(d+2x)} - \frac{2}{(d+x)} - \frac{1}{d} - 2A \ln \left(\frac{d(2x+d)}{(d+x)^2} \right) \right] \quad (\text{ec. 6.3})$$

donde a es el radio del liposoma, A es la constante de Hamaker, x es la distancia de separación entre la superficie de dos partículas y d es el espesor de la bicapa del liposoma. En la siguiente figura se presenta un esquema de cómo se determinan estos parámetros:

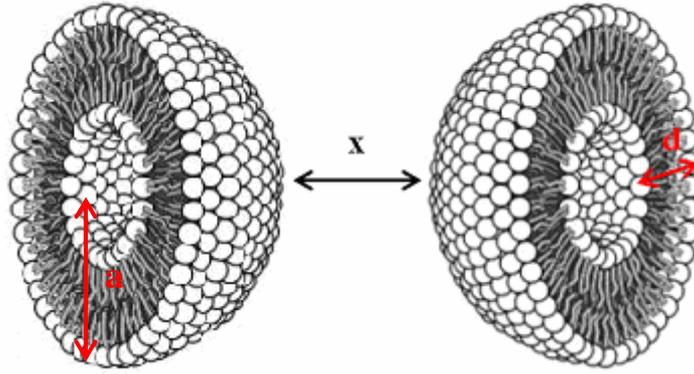


Figura 6.7: representación de parámetros usados para aplicar la teoría DLVO.

Para calcular el potencial de repulsión electrostática (V_R) se usó la siguiente ecuación:

$$V_R = -2\pi a \epsilon_0 \epsilon_r \left(\frac{4\kappa_B T}{ze} \gamma \right)^2 e^{-\kappa x} \quad (\text{ec. 6.4})$$

donde a es el radio del liposoma, ϵ_0 es la permitividad en el vacío, ϵ_r la permitividad relativa del medio (agua), κ_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura, x la distancia entre las partículas, z es la valencia de los iones y e es la carga del electrón.

$$\gamma \approx \tanh \frac{ze\zeta}{4\kappa_B T} \quad (\text{ec. 6.5})$$

El único parámetro que falta definir es ζ que representa el potencial zeta.

Para los cálculos de V_R y posteriormente de V_{DLVO} se utilizó en primer lugar la ecuación 6.4 (sin corrección por hidratación del contraión) obteniéndose los resultados presentados en la figura 6.8. Aquí se representan los sistemas DMPC puro y con concentraciones crecientes de Asc₁₆, 10, 20 y 30%. Puede verse que el potencial electrostático de repulsión es menor que $k_B T$, donde k_B es la constante de Boltzmann por lo que los liposomas deberían estar sufriendo una rápida agregación. Sin embargo, esto

no sucede, por lo que la aplicación de la teoría clásica DLVO no estaría prediciendo el comportamiento coloidal de estos liposomas y es necesaria una corrección.

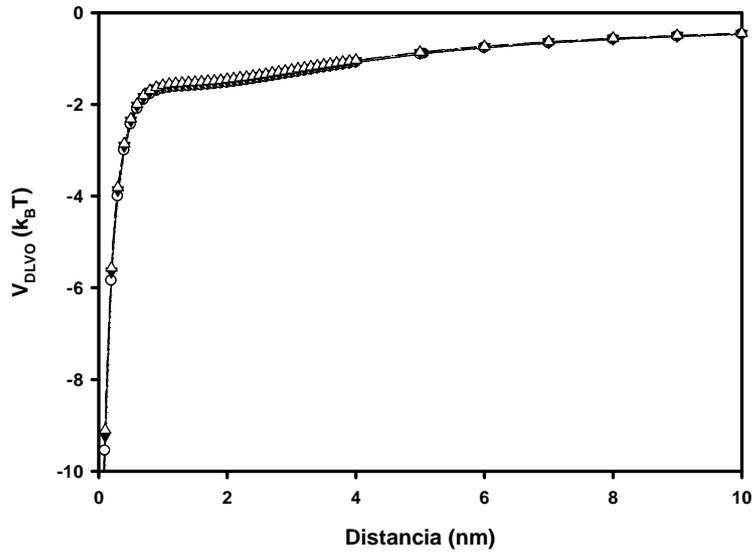


Figura 6.8: Liposomas de DMPC con Asc₁₆. Potenciales DLVO (V_{DLVO}) en $k_B T$ en función de la distancia en nm sin considerar la hidratación de los contraiones. (Δ) DMPC + Asc₁₆ 30%, (\blacktriangledown) DMPC + Asc₁₆ 20%, (\circ) DMPC + Asc₁₆ 10%, (\bullet) DMPC puro.

Si los liposomas se mantienen estables incluso con potenciales electrostáticos tan bajos, debería haber otras fuerzas involucradas en su estabilización que probablemente sean las de hidratación. Debido a esto, se incluye un término en la ecuación 6.4 que representa a estas fuerzas repulsivas de hidratación obteniéndose la ecuación 6.6. Para este modelo, se ha considerado que existe una capa de agua alrededor de la superficie de los liposomas, la cual corresponde aproximadamente al radio de hidratación del ión adsorbido. Por lo tanto, la corrección del potencial de repulsión electrostático V_R toma la forma de [36]:

$$V_R = -2\pi(a + \Delta)\epsilon_0\epsilon_r \left(\frac{4k_B T}{ze} \gamma \right)^2 e^{-\kappa(x+2\Delta)} \quad (\text{ec. 6.6})$$

aquí Δ corresponde al radio hidratado del ión adsorbido.

Entonces, para el caso de liposomas de fosfatidilcolina (PC), que poseen en general baja carga superficial (< 50 mV), el potencial DLVO (V_{DLVO}) según [37], toma la forma de:

$$V_{DLVO} = -2\pi(a+\Delta)\epsilon_0\epsilon_r\left(\frac{4\kappa_B T}{ze}\gamma\right)^2 e^{-\kappa_B(x+2\Delta)} + \left(-\frac{Aa}{12}\right)\left[\frac{1}{(d+2x)} - \frac{2}{(d+x)} - \frac{1}{d} - 2A\ln\left(\frac{d(2x+d)}{(d+x)^2}\right)\right]$$

(ec. 6.7)

Usando esta ecuación se obtuvieron los gráficos de las figuras 6.9 y 6.10

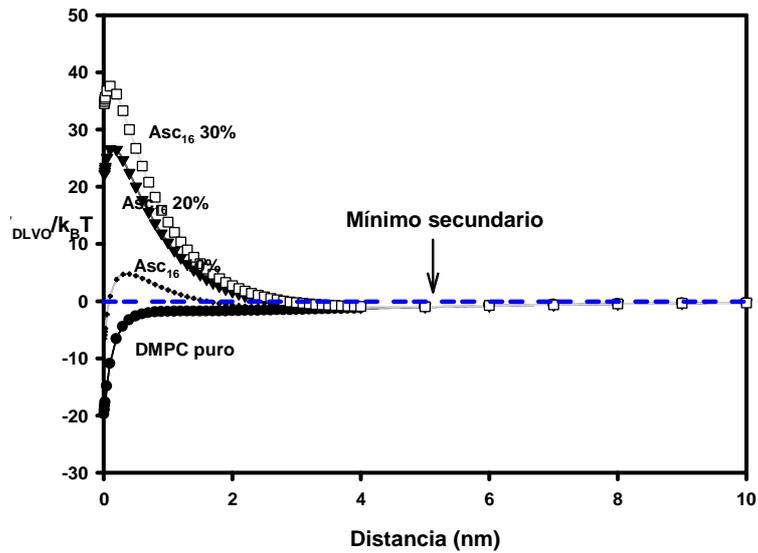


Figura 6.9: Liposomas de DMPC con Asc_{16} . Potenciales DLVO (V_{DLVO}) en $k_B T$ en función de la distancia en nm. La flecha indica el mínimo secundario. (\square) DMPC + Asc_{16} 30%, (\blacktriangledown) DMPC + Asc_{16} 20%, (\bullet) DMPC + Asc_{16} 10%, (\bullet) DMPC puro.

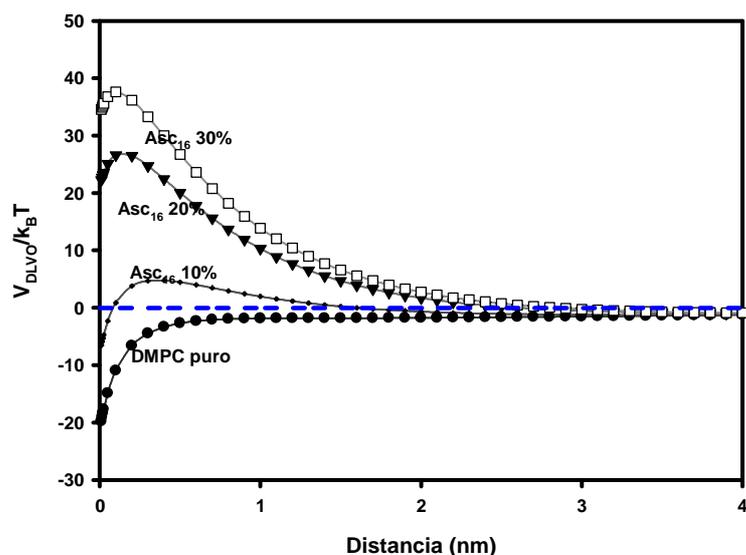


Figura 6.10: Liposomas de DMPC con Asc₁₆. Potenciales DLVO (V_{DLVO}) en $k_B T$ en función de la distancia en nm. (\square) DMPC + Asc₁₆ 30%, (\blacktriangledown) DMPC + Asc₁₆ 20%, (\bullet) DMPC + Asc₁₆ 10%, (\bullet) DMPC puro.

En estos gráficos se puede apreciar que a mayor valor (negativo) de potencial zeta, o sea, cuanto mayor porcentaje de Asc₁₆ (que se encuentra cargado negativamente) esté presente en el liposoma, más estable será el mismo.

Además de las modificaciones que se han adoptado de la teoría DLVO clásica, se han realizado algunas consideraciones con respecto a la constante de Hamaker utilizada para llevar a cabo los cálculos del potencial DLVO. Esta constante se encuentra en el intervalo rango de 1×10^{-21} – 1×10^{-20} J. Ohshima y colaboradores, en su estudio del sistema dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) en agua, estimaron la constante de Hamaker en $(3,6 \pm 0,8) \times 10^{-21}$ J [38].

Se pueden adoptar los valores de la constante como los de hidrocarburos lineales superiores, o sea, de 16 o más carbonos. Esto se debe a que se está trabajando con Asc₁₆ (16C) y DMPC (14C). Además, se tiene en cuenta aquí que la componente de frecuencia nula de la constante de Hamaker ($A_{v=0}$) es pantalleada por la presencia de electrolitos, mientras que la componente a frecuencias no nulas ($A_{v>0}$) no es afectada por la presencia de electrolitos y sin embargo, si es afectada por la retardación al alejar los

cuerpos interactuantes. Por ello, estas componentes podrían ser tomadas como $A_{v=0} = -0,8 \times 10^{-21}$ J y $A_{v>0} \approx 6 \times 10^{-21}$ J como se muestra en la referencia [39].

Cuando hay ausencia de electrólito, $A \approx 5,2 \times 10^{-21}$ J. Este valor es similar al del hexadecano interactuando con hexadecano a través de agua, el cual fue hallado experimentalmente, $A_{121} = (3-6) \times 10^{-21}$ J e informado en la bibliografía [40].

Por lo expuesto, el efecto de pantalleo electrolítico se pudo calcular con la siguiente ecuación:

$$A = A_{v=0}(2\kappa x) e^{-2\kappa x} + A_{v>v1} \quad (\text{ec. 6.5})$$

No se consideró corrección por retardación para $A_{v>0}$, puesto que ésta se hace significativa a distancias del orden de 5 nm, pudiendo reducirse hasta la mitad a 10 nm [41], como se muestra en la figura 6.11 donde se grafica A en función de la distancia entre las partículas. Como puede verse en las figuras 6.9 y 6.10 los resultados significativos de V_{DLVO} caen a distancias menores de 4 nm. Por lo tanto no es necesaria una corrección por retardación.

Para comparación en la dependencia de A con la distancia (x), se supuso que entre 5 y 10 nm, A decae linealmente hasta la mitad, de 6×10^{-21} J a 5 nm hasta 3×10^{-21} a 10 nm. Sin embargo, la influencia de este decaimiento no afectó los resultados generales. Esto puede verse en las figuras 6.9 y 6.10 del efecto de los cambios de concentración de los aditivos sobre las curvas de V_{DLVO} .

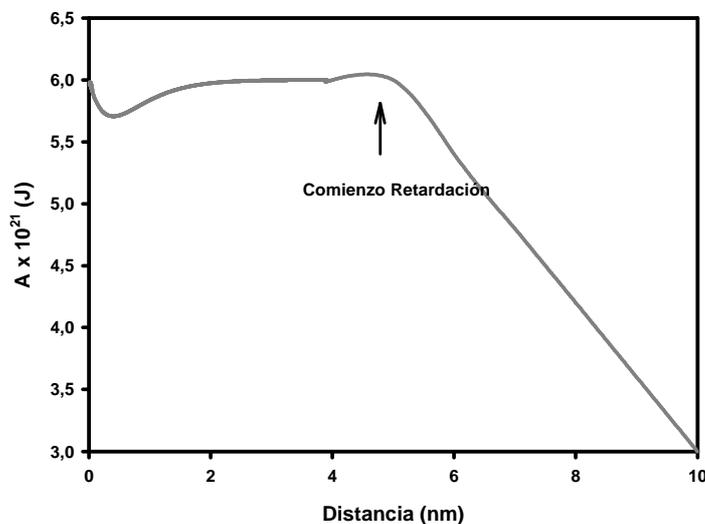


Figura 6.11: Dependencia de la constante de Hamaker con la distancia.

Debe tenerse en cuenta que en realidad la retardación tiene una dependencia con la distancia más compleja que la supuesta aquí y hay formas de calcularla numéricamente por resolución de la ecuación de Lifshitz [41], pero como la ocurrencia de la barrera de potencial es a valores de x demasiado bajos ($x \leq 4$ nm) como para que se hagan importantes los efectos de retardación, no se consideró necesario un mayor refinamiento.

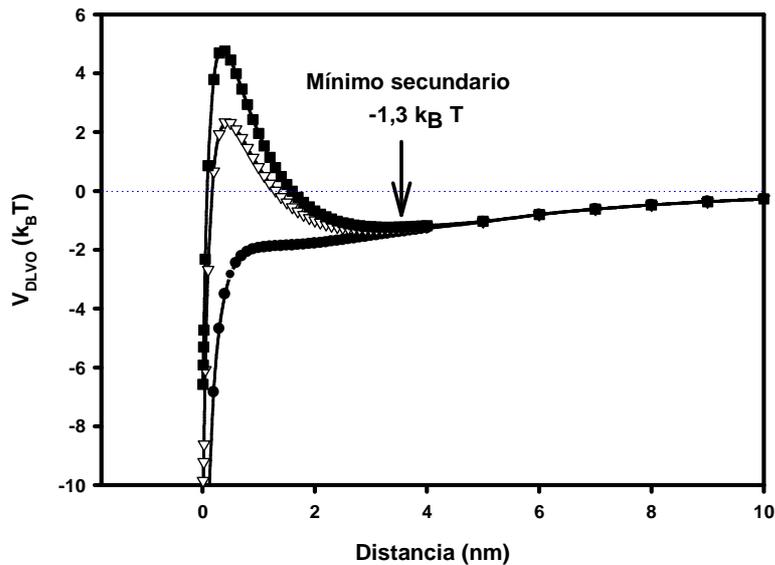


Figura 6.12: Potenciales DLVO (V_{DLVO}) en $k_B T$ en función de la distancia (nm) entre las partículas. Se representa en (■) al sistema DMPC + Asc₁₆ 10 %, en (▽) al sistema DMPC + Asc₁₆ 10 % + AMI 10% y en (●) al sistema DMPC + Asc₁₆ 10 % + AMI 20%. La flecha indica el mínimo secundario

Puede verse que el agregado de Asc₁₆ aumenta el potencial y la estabilidad de las vesículas, debido a la carga negativa del Asc₁₆. Esta carga es neutralizada por el agregado de AMI. En la figura 6.12 se representa la disminución del V_{DLVO} a medida que aumenta la proporción de AMI en los liposomas. De esta manera cuando mayor es la concentración de AMI, más tiende a cero el potencial ζ y por más que se consideran las fuerzas repulsivas de hidratación en el cálculo del V_{DLVO} , éste para concentraciones mayores de 10 % de AMI es menor que $k_B T$ por lo que los liposomas con alta proporción de AMI se deberían agregar.

Se ha determinado el valor de ζ en el cual un liposoma de los ensayados llega a un valor del máximo de la barrera de potencial de $1 k_B T$, y por lo tanto por debajo de este

valor el sistema se inestabilizaría. El resultado se presenta en la figura 6.13. El potencial es $\zeta \approx -8,29$ mV.

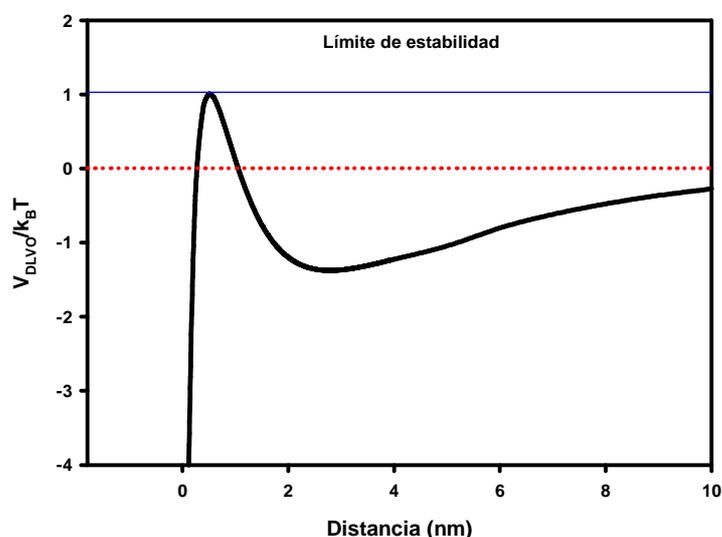


Figura 6.13: Potencial de inestabilidad. Potenciales DLVO (V_{DLVO}) en $k_B T$ en función de la distancia en nm. La línea azul indica el potencial en $k_B T$ que debe ser sobrepasado para que los liposomas sean estables por la teoría DLVO.

Para ver cuanta AMI hace falta para que la altura máxima de la curva V_{DLVO} sea igual a $k_B T$ y por lo tanto, el sistema comience a flocular, se trazó la figura 6.16. La agregación ocurre con 12,7 % de AMI, si se mantiene el contenido de Asc_{16} en 10 %. El valor de $k_B T$ cercano a $5 k_B T$ se obtiene cuando no hay AMI en el liposoma y corresponde al sistema DMPC + 10% Asc_{16} .

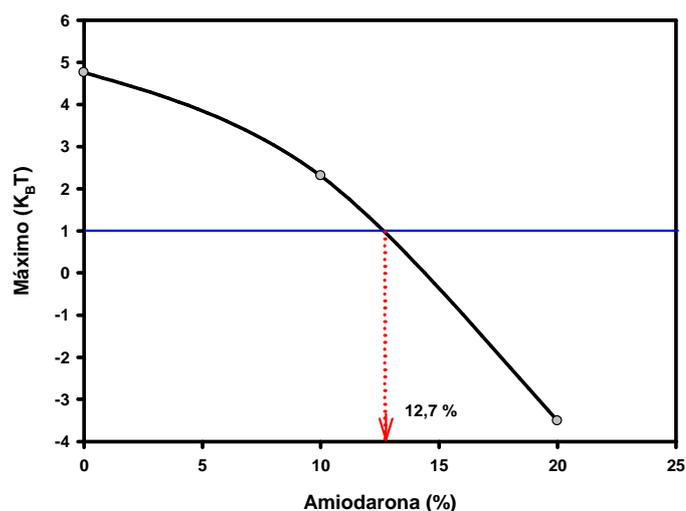


Figura 6.16: Potenciales DLVO (V_{DLVO}) en $k_B T$ en función del % de AMI en el liposoma. La flecha indica la concentración de AMI que debería tener un liposoma de DMPC + 10 % de Asc₁₆ para que se inestabilice.

Los sistemas vesiculares estudiados fueron estables en todos los casos. En consecuencia, además de las fuerzas DLVO, debe existir un proceso adicional de estabilización, el cual está dado por el carácter hidrofílico de la superficie de las vesículas. Estas fuerzas repulsivas de hidratación [41] pueden ser mucho más fuertes que la barrera de potencial DLVO, especialmente a muy corta distancia entre las superficies que se aproximan (distancias por debajo de 5-10 diámetros moleculares del solvente, unos 1-2 nm en agua). Estas fuerzas surgen de la necesidad de deshidratar las superficies si se las quiere acercar lo suficiente como para que caigan en el mínimo primario. Como esto es energéticamente muy costoso, el sistema permanece estable.

6.5 Conclusiones

Las determinaciones por GP muestran que la adición de Asc₁₆ en las tres proporciones ensayadas, a una bicapa formada por DMPC no genera perturbación de la misma. Además, se ha demostrado su estabilidad usando modificaciones de la teoría DLVO y la corrección de la constante de Hamaker.

El agregado de AMI a los liposomas formados por DMPC y Asc₁₆ no modificó el tamaño de los liposomas. No se ha informado en literatura este tipo de sistemas, el cual es atractivo para ser usado como base en sistemas transportadores de fármacos que necesiten la actividad de un antioxidante.

Para todos los sistemas ensayados (DMPC con Asc₁₆ con y sin AMI) los valores de GP a temperaturas por debajo de la T_t fueron muy similares en todas las condiciones estudiadas. Sin embargo, por encima de la T_t, los liposomas con AMI mostraron un incremento en los valores de GP, dependiente de su concentración. Esto indica una estructuración del sistema en la fase líquida.

Los tamaños para los liposomas con AMI fueron cercanos a 160 nm. Se demostró que hasta un 12,7 % de AMI se puede introducir en la membrana del liposoma cuando hay un 10 % de Asc₁₆, antes de que la barrera de potencial caiga por debajo de $1k_B T$.

Se obtuvieron liposomas monodispersos de DMPC con Asc₁₆ y de DMPC con Asc₁₆ y AMI.

6.6 Referencias del capítulo

- [1]- W. Gough, R. Zeiler, P. Barreca, N. El-Sherif. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 4 (1982) 375.
- [2]- W. Yasaka, F. Eichbaum, S. Oga. *Cardiovascular Research*. 13 (1979) 717.
- [3]- M. Trumbore, D. Chester, J. Moring, D. Rhodes, L. Herbetre. *Biophysical Journal*. 54 (1988) 535.
- [4]- T. Theodossiou, M. Galanou, C. Paleos. *Journal of Medical Chemistry*. 51 (2008), 6067.
- [5]- P. Martindale. *The Complete Drug Reference*. 36th ed. The Pharmaceutical Press. (2009). London.
- [6]- J. Sarma, H. Pei, K. Venkataraman. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2 (1997) 53.
- [7]- L. Zhou, G. Geraci, S. Hess, L. Yang, J. Wang, U. Argikar. *Analytical Chemistry*. 83 (2011) 6980.
- [8]- A. Vereckei, A. Blazovics, I. György, E. Fehér, M. Tóth, G. Szénási, J. Zsinka, G. Földiák, J. Fehér. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 4 (1993) 161.
- [9]- S. Stratton, D. Liebler. *Biochemistry*. 36 (1997) 12911.
- [10]- B. Johnson, J. Ferguson *Seminars in Dermatology*. 9 (1990) 39.
- [11]- T. Kennedy, D. Liebler, *Chemica. Research in Toxicology*. 4 (1991) 290.
- [12]- L. Kachel, T. Moyer, W. Martin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 254 (1990) 1107.
- [13]- M. Agoston, F. Örsi, E. Fehér, K. Hagymási, Z. Orosz, A. Blázovics, J. Fehér, A. Vereckei. *Toxicology* 190 (2003) 231.
- [14]- S. Ray, D. Patel, V. Wong, D. Bagchi. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*. 107 (2000) 137.
- [15]- M. Olsher, P. Chong. *Analytical. Biochemistry*. 382 (2008) 1.
- [16]- R. Rowe, P. Sheskey, M. Quinn (Eds.). *Handbook of Pharmaceuticals Excipients*. 6th edition. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association. (2009). London-Chicago.
- [17]- G. Weber, F. Farris. *Biochemistry*. 18 (1979) 3075.

- [18]- T.Parasassi, , G. De Stasio, G. Ravagnan, R. Rusch, E. Gratton. *Biophysical Journal*. 60 (1991) 179.
- [19]- L. Bagatolli, E. Gratton, G. Fidelio. *Biophysical Journal*. 75 (1998) 331.
- [20]- S. Sanchez, M. Tricerri, G. Gunther, E. Gratton. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*. (2007) 1007.
- [21]- A. Bangham, M. Standish, G. Weissman, *Journal of Molecular Biology*. 13 (1965) 238.
- [22]- L. Vila Jato. *Tecnología farmacéutica*. Ed. Síntesis. Madrid. 1 (1997) 235.
- [23]- L. Vila Jato. *Tecnología farmacéutica*. Ed. Síntesis. 1 (1997) 238. Madrid.
- [24]- J. Sabin Fernández. *PhD Thesis*. Universidad de Santiago de Compostela. (2007) 65. España.
- [25]- A. Hasanovic, C. Hollick, K. Fischinger, C. Valenta. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 75 (2010) 148.
- [26]- International Standard ISO 13321, Particle size analysis, Part 8: Photon Correlation Spectroscopy, International Organization of Standardization (1996).
- [27]- K. Zielinska, K. Wilk, A. Jezierski, T. Jesionowski. *Journal of Colloid and Interface Science*. 321 (2008) 408.
- [28]- R. Tantra, P. Schulze, Paul Quincey. *Particuology*. 8 (2010) 279.
- [29]- P. Paolicelli, F. Corrente, D. Serricchio, F. Cerreto, S. Cesa, B. Tita, F. Vitali, F. D’Auria, G. Simonetti, M. Casadei. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 3 (2011) 410.
- [30]- B. Deryagin, L. Landau. *Acta Physicochimica*. 14 (1941) 633.
- [31]- E. Verwey, J. Overbeek “*Theory of Stability of Lyophobic Colloids*”. Elsevier, (1948). Amsterdam.
- [32]- M. Antunes-Madeira, R. Videira, M. Klüppelb, V. Madeira. *International Journal of Cardiology*. 48 (1995) 211.
- [33]- M. Laniaoa, M. Luzardo, R. Laborde, O. Sánchez, Y. Cruz-Leal, F. Pazos, M. Tejuca, A. Valle, M.E. Alonso, L.E. Fernández, C. Alvarez. *Revista Cubana de Física*. 26 (2009) 23.
- [34]- J. Alonso, C. Llhcer, A. Vila, J. Figueruelo, F. Molina. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 95 (1995) 11.
- [35]- S. Palma, R. Manzo, D. Allemandi, L. Fratoni, P. Lo Nostro. *Langmuir*. 18 (2002) 9219.

- [36]- J. Sabín, G. Prieto, J. Ruso, R. Hidalgo-Álvarez, F. Sarmiento. *European Physical Journal E*. 20, (2006) 401.
- [37]- J. Sabin Fernández. *PhD Thesis*. U. de Santiago de Compostela. (2007) 93. España.
- [38]- H. Ohshima, Y. Inoko, T. Mitsu. *Journal of Colloid Interface Science*. 86 (1982) 57.
- [39]- J. Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd Ed. Academia Press. San (1991) 190. Diego.
- [40]- J. Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd Ed. Academic Press. (1991) 196-197. San Diego.
- [41]- J. Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd Ed. Academic Press. (1991) 260-287. San Diego.

Capítulo 7

Conclusiones Generales

Las conclusiones generales de este trabajo de tesis se pueden resumir en los siguientes puntos:

a) El Palmitato de Ascorbilo (Asc_{16}) en solución acuosa y con cosolvente (PEG_{400}) presenta diferentes mesofases que dependen de la concentración de surfactante, la temperatura y la proporción del cosolvente en la solución. El agregado de este último no solo disminuye las temperaturas de transición sino que también genera la aparición o corrimiento de mesofases cúbicas hacia zonas de menor concentración de surfactante. Estas mesofases aparecen a mayores concentraciones cuando se usa solo agua como solvente y no habían sido informadas en bibliografía hasta ahora.

Para el reconocimiento del tipo de fases e intervalos en las cuales se encuentran se realizó un estudio global del comportamiento de Asc_{16} en solución mediante la realización de cuatro diagramas de fases completos correspondientes a los sistemas: Asc_{16} - agua pura, Asc_{16} - (75% agua y 25% PEG_{400}), Asc_{16} - (50% agua y 50% PEG_{400}), Asc_{16} - (25% agua y 75% PEG_{400}) los cuales no habían sido descriptos previamente en la bibliografía.

b) El Asc₁₆ se auto-organiza en monocapas de Langmuir con propiedades electrostáticas altamente dependientes del pH y de las condiciones de salinidad de la subfase. A través del BAM fue observada la formación de dominios de alta uniformidad, más cristalinos y otros en forma de flores los cuales se producen por una repulsión mayor entre los grupos polares del surfactante. Esta diferencia se debe a las distintas condiciones de la subfase. Se realizó un estudio de interacción entre Asc₁₆ en interfases con fosfolípidos. Las monocapas de fosfolípidos proveen una matriz favorable de adsorción-inserción de las moléculas de Asc₁₆. Un estudio de estas características no había sido descrito en bibliografía hasta el momento.

c) El estudio del clorhidrato de amiodarona (AMI) proveyó información confiable sobre el comportamiento de esta molécula en soluciones y sus propiedades de agregación. Con esta información se desarrolló un diagrama fases, el cual no había sido informado en bibliografía hasta ahora.

d) Luego de conocer el comportamiento del Asc₁₆ y la AMI se desarrollaron liposomas utilizando DMPC y estos dos compuestos, obteniéndose resultados alentadores. El tamaño de partícula, potencial ξ y los estudios de estabilidad de membrana por polarización generalizada (GP) obtenidos permiten suponer que estos compuestos pueden compartir la formación de la misma membrana. Además, esto sirve como plataforma para la incorporación de diferentes drogas con características similares y el uso de otros lípidos.

Capítulo 8

Perspectivas

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos como así también una serie de ensayos en curso, que no han sido incluidos en el presente trabajo, se pueden plantear las siguientes perspectivas de trabajo:

a) Se ha estudiado el comportamiento del Asc_{16} en agua y con el agregado de cosolventes, los cuales disminuyen la temperatura de transición de algunas de las fases formadas. Estas fases siguen apareciendo a temperaturas superiores a las de uso y almacenamiento, por lo que sería importante poder llegar a reducirlas aún más con el agregado de otros cosolventes o cosurfactantes. Dentro de los cosurfactantes, es posible utilizar derivados de vitamina C de cadenas más cortas, como los que tienen 10 y 12 átomos de carbono. Estos compuestos tienen temperaturas de transición menores que el Asc_{16} . Trabajando a concentraciones fijas, se podría observar como son afectadas las fases formadas en presencia de estos, para lo cual sería necesario determinar previamente un diagrama de fases completo con el derivado seleccionado que va a actuar como cosurfactante. De esta manera se puede tener la certeza de cuales son las mesofases formadas entre este compuesto y el agua a diferentes temperaturas y concentraciones y no generar problemas de interpretación.

b) El análisis topológico por la metodología de monocapas y BAM ha demostrado que puede brindar información muy útil para el derivado de vitamina C estudiado, que lleva a la comprensión del comportamiento superficial del Asc₁₆. Estas técnicas podrían ser utilizadas con alguno de los otros derivados, como el decanoato de Ascorbilo (Asc₁₀), para establecer las propiedades superficiales en dos dimensiones y las características de los dominios que se van formando. Luego se podrían realizar monocapas mixtas para observar diferencias entre los dominios de la mezcla respecto los de las monocapas puras. Hasiendo liposomas

c) Utilizando monocapas formadas con fosfolípidos y el Asc₁₆ y mediante BAM se podría observar como varía la formación de microdominios con el agregado de colesterol y esto se podría extrapolar a la formación de liposomas con el agregado de diferentes proporciones del esteroide.

d) Dado que no se han realizado estudios mediante BAM para las monocapas con Asc₁₆ y fosfolípidos, ni utilizando estos dos compuestos y AMI, sería muy útil encarar el estudio de estos sistemas mediante esta técnica. De esta manera se podría visualizar que tipo de interacciones se producen entre estas tres moléculas por encima y debajo de la temperatura de transición del lípido.

e) Los liposomas obtenidos utilizando Asc₁₆, AMI y DMPC podrían servir como modelo para el desarrollo de otros liposomas que posean lípidos insaturados y cuenten con un antioxidante que los proteja de los agentes agresores.

f) Se pueden ensayar liposomas con mayores concentraciones de Asc₁₆; para el sistema Asc₁₆, AMI y DMPC; con el fin de aumentar su estabilidad, como lo predice la teoría DLVO.

g) Se podrían realizar las pruebas de estabilidad y toxicológicas de los liposomas que contienen AMI como principio activo, de manera de garantizar un sistema confiable como transportador de drogas que pueda llegar a formar un medicamento.

Capítulo 9

Publicaciones

Trabajos surgidos de esta de tesis presentados en congresos nacionales e internacionales:

Congreso Iberoamericano de Química. Cuzco, Perú. Título: “Propiedades coloidales de Clorhidrato de Amiodarona en solución acuosa”. Autores: Luciano Benedini, Santiago Palma, Paula Messina, Daniel Allemandi, Pablo Schulz. Modalidad: Presentación de póster. Del 13 al 17 de Octubre. Cuzco 2008.

XVI Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Título: “Propiedades de Autoagregación de la Amiodarona en soluciones acuosas”. Autores: Luciano Benedini, Santiago Palma, Rubén Manzo, Daniel Allemandi, Paula Messina, Pablo Schulz. Modalidad: Presentación de póster. Del 18 al 21 de Mayo. Salta 2009.

XI Congreso y XXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Título: “Efecto de la Amiodarona sobre la deformabilidad de la membrana del glóbulo rojo”. Autores: Isabel Spengler, Leonardo Popp, Luciano Benedini, Santiago Palma, Paula Messina, Daniel Allemandi, Pablo Schulz, Ruben Manzo. Modalidad: Presentación de

póster. Del 3 al 4 de Diciembre. Rosario 2009. La revista *Biocell* publicó en formato de acta de congreso la totalidad de los trabajos aceptados.

XIX Congreso Farmacéutico Argentino y XIII Congreso de la Confederación Farmacéutica Sudamericana. Título: “Comportamiento de fases del sistema Palmitato de Ascorbilo-Agua”. Autores: Benedini Luciano, Palma Santiago, Messina Paula, Allemandi Daniel, Schulz Pablo. Modalidad: Presentación de póster. Del 29 al 31 de Octubre. San Juan 2009.

1ª Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Título: “Phase behavior of Ascorbyl Palmitate in PEG 400 solution”. Autores: Luciano Benedini, Paula Messina, Pablo Schulz, Daniel Allemandi, Santiago Palma. Modalidad: presentación de póster. Del 24 al 25 de Junio. Córdoba 2010. La revista *AAPS Pharm Sci Tech* publicó en formato de acta de congreso la totalidad de los trabajos aceptados para RICiFa 2010.

1ª Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Título: “Interaction between Ascorbyl Palmitate and water”. Autores: Erica Schulz, Luciano Benedini, Paula Messina, Pablo Schulz, Daniel Allemandi, Santiago Palma. Modalidad: presentación de póster. Del 24 al 25 de Junio. Córdoba 2010. La revista *AAPS Pharm Sci Tech* publicó en formato de acta de congreso la totalidad de los trabajos aceptados para RICiFa 2010.

XXVIII Congreso Argentino de Química 4to. Workshop de Química Medicinal. Título: “Comportamiento de fases del sistema Palmitato de Ascorbilo en solución de PEG400”. Autores: Luciano Benedini, Paula Messina, Pablo Schulz, Daniel Allemandi, Santiago Palma. Modalidad: Presentación de póster. Del 13 al 17 de Septiembre. Lanús 2010.

Congreso Peruano de Química. Lima, Perú. Título: “El sistema Palmitato de Ascorbilo-Agua: diagrama de fases y estado del agua”. Autores: Luciano Benedini, Erica Schulz, Santiago Palma, Paula Messina, Daniel Allemandi, Pablo Schulz. Modalidad: Presentación de póster. Del 14 al 16 Octubre. Lima 2010.

XVII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Título: “Comportamiento de fases de monocapas de palmitato de ascorbilo”. Autores: Benedini Luciano, Laura Fanani, Bruno Maggio, Palma Santiago, Allemandi Daniel, Messina Paula, Schulz Pablo. Modalidad: Presentación de Póster. Del 3 al 6 de Mayo. Córdoba 2011.

Artículos surgidos de este trabajo de tesis publicados en revistas internacionales con referato:

Luciano Benedini, Paula Messina, Rubén Manzo, Daniel Allemandi, Santiago Palma, Erica Schulz, Marisa Frechero, Pablo Schulz, “Colloidal properties of amiodarone in water at low concentration”, *Journal of Colloid and Interface Science* 342 (2010) 407-414. (ISSN: 0021-9797)

Luciano Benedini, Erica Schulz, Paula Messina, Santiago Palma, Daniel Allemandi, Pablo Schulz, “The Ascorbyl Palmitate – Water System: Phase Diagram And State Of Water”, *Colloids Surf. A: Physicochem Eng Aspects* 375 (2011) 178–185 (ISSN: 09727-7757).

Luciano Benedini, Maria Laura Fanani, Bruno Maggio, Natalia Wilke, Paula Messina, Santiago Palma, Pablo Schulz, “Surface Phase Behavior and Domain Topography of Ascorbyl Palmitate Monolayers”, *Langmuir* 27 (2011) 10914–10919 (ISSN 0743-7463)

Luciano Benedini, Paula Messina, Santiago Palma, Daniel Allemandi, Pablo Schulz. “The ascorbyl palmitate–polyethyleneglycol 400–water system phase behavior”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 89 (2012) 265– 270 (ISSN: 0927-7767).